



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

ANALÝZA VAZBY PROTEINU IF116 NA DNA

ANALYSIS OF IF116 PROTEIN BINDING TO DNA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Libuše Kratochvilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1889/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Libuše Kratochvilová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Analýza vazby proteinu IFI16 na DNA

Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše o proteinu IFI16 a vazbě k DNA se zaměřením na G–kvadruplexy
- Biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G–kvadruplexu
- Izolace a purifikace proteinu IFI16
- Studium vazby proteinu IFI16 na DNA in vitro
- Studium interakce proteinu IFI16 s DNA v jednohybridním kvasinkovém systému

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Libuše Kratochvilová
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vazbou interferonem gama indukovatelného proteinu 16 (IFI16) na DNA s potenciálem tvorby G-kvadruplexu. Protein IFI16 obsahuje dvě tandemově umístěné DNA-vazebné HIN domény vykazující rozdílnou vazbu ke strukturám DNA. Bylo prokázáno, že protein IFI16 preferenčně váže struktury G-kvadruplexů oproti jiným strukturám DNA. G-kvadruplexy jsou nekanonické sekundární lokální struktury DNA (nebo RNA), které se snadno formují za fyziologických podmínek v řadě významných regulačních oblastech genomu, nebo jsou součástí genomů řady virů a patogenů. Schopnost rozpoznání, specifické vazby a stabilizace struktur G-kvadruplexů odráží zapojení proteinu IFI16 do buněčných procesů replikace, transkripce a translace a iniciaci vrozených imunitních odpovědí. V první části diplomové práce byly vybranými biofyzikálními metodami charakterizovány sekvence syntetických oligonukleotidů s potenciálem tvorby G-kvadruplexu a izolován protein IFI16 plné délky, který byl následně použit pro *in vitro* vazebné a kompetitivní vazebné experimenty s charakterizovanými oligonukleotidy. V poslední části práce byly kvasinkové isogenní kmeny lišící se sekvencemi responzivního elementu transformovány plazmidovými vektory pro expresi proteinů p53 a IFI16 s konstitutivními i GAL indukibilními promotory a optimalizován model jednohybridního kvasinkového systému pro studium interakcí proteinu IFI16 *in vivo*. Z výsledků vyplývá, že většina analyzovaných sekvencí je schopna *in vitro* tvořit struktury G-kvadruplexu, a to i za přítomnosti pouze jednoho opakování tří a více G-bází. Zatímco přítomnost několika opakování guaninových bází oddělených jednonukleotidovým *spacerem* vedla k tvorbě intermolekulárních struktur G-kvadruplexů, mutace v původní sekvenci G-kvadruplexu indukovala tvorbu intramolekulárních struktur s rozdílnými konformacemi. *In vitro* vazebné a kompetitivní vazebné experimenty prokázaly specifickou vazbu proteinu IFI16 ke strukturám G-kvadruplexů bez rozdílů preference vazby proteinu k určité konformaci G-kvadruplexu. Stabilizace struktur G-kvadruplexu *in vivo* za responzivním elementem transkripčního faktoru (p53) v promotoru reportérového genu indukovala represi transkripce daného genu. Při absenci jakéhokoliv vazebného místa proteinu IFI16 docházelo k protein-proteinové interakci mezi proteiny IFI16 a p53, která vedla ke zvýšení transaktivačního potenciálu proteinu p53, přičemž vazba proteinu p53 a iniciace transkripce reportérového genu byla ovlivněna nejen přítomností motivu G-kvadruplexu a jeho stabilizací, nýbrž i sekvencí DNA sousedící s responzivním elementem p53.

KLÍČOVÁ SLOVA

IFI16, G-kvadruplex, p53, interakce DNA-protein, interakce protein-protein, cirkulární dichroismus, elektroforetický test posunu mobility, isogenní kvasinkový systém, luciferázové reportérové testy

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the binding of interferon gamma-inducible protein 16 (IFI16) to DNA with the potential of G-quadruplex formation. The IFI16 protein contains two tandemly located DNA-binding HIN domains showing differential binding to DNA structures. IFI16 protein has been shown to preferentially bind G-quadruplex structures over other nucleic acid secondary structures. G-quadruplexes are secondary local structures of DNA (or RNA) that are easily formed under physiological conditions in a number of important regulatory regions of the genome, or are part of the genomes of a number of viruses and pathogens. The ability to recognize, specifically bind and stabilize G-quadruplex structures explains the involvement of the IFI16 protein in the cellular processes of replication, transcription and translation and the establishment of innate immune responses. In the first part of the thesis, the sequences of synthetic oligonucleotides with the potential for G-quadruplex formation were characterized by selected biophysical methods and the full-length IFI16 protein was isolated, which was subsequently used for *in vitro* binding and competitive binding experiments with characterized oligonucleotides. In the last part of the work, isogenic yeast strains differing in the sequences of the responsive element were transformed with plasmid vectors for the expression of p53 and IFI16 proteins with constitutive and GAL inducible promoters, and the one-hybrid yeast system model was optimized for the study of IFI16 protein interactions *in vivo*. The results show that most of the analyzed sequences are able to form G-quadruplex structures *in vitro*, even in the presence of only one run of three or more G-bases. While the presence of several G-runs separated by a single nucleotide spacer led to the formation of intermolecular G-quadruplex structures, mutation in the original G-quadruplex sequence induced the formation of intramolecular structures with different conformations. *In vitro* binding and competitive binding experiments demonstrated specific binding of the IFI16 protein to G-quadruplex structures without differences in protein binding preference to a particular G-quadruplex conformation. Stabilization of G-quadruplex structures *in vivo* behind the transcription factor responsive element (p53) in the gene promoter induced repression of the transcription of the given gene. In the absence of any binding site of the IFI16 protein, a protein-protein interaction between the IFI16 and p53 proteins occurred, which led to an increase in the transactivation potential of the p53 protein, while the binding of the p53 protein and initiation of reporter gene transcription was influenced not only by the presence of the G-quadruplex motif and its stabilization, but also by the DNA sequence adjacent to the p53 responsive element.

KEYWORDS

IFI16, G-quadruplex, p53, DNA-protein interaction, protein-protein interaction, circular dichroism, electrophoretic mobility shift assay, isogenic yeast system, luciferase reporter assays

KRATOCHVILOVÁ, Libuše. *Analýza vazby proteinu IFI16 na DNA*. Brno, 2023. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Václav Brázda.

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

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za vedení této práce, cenné rady, odborné připomínky, vstřícný a profesionální přístup a poskytnuté prostředky. Dále bych ráda poděkovala kolegům z Oddělení biofyzikální chemie a molekulární onkologie a Oddělení biofyziky nukleových kyselin Biofyzikálního ústavu Akademie věd České republiky za jejich čas, ochotu pomoci a cenné rady. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým nejbližším přátelům EP a ML za psychickou podporu a trpělivost po dobu celého mého vysokoškolského studia.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Protein IFI16	9
2.1.1	Struktura proteinu IFI16.....	9
2.1.2	Biologické funkce proteinu IFI16.....	12
2.1.3	Vazebné vlastnosti proteinu IFI16.....	16
2.2	G-kvadruplexy	18
2.2.1	Struktura G-kvadruplexů.....	18
2.2.2	Výskyt G-kvadruplexů v genomech organismů.....	20
2.2.3	Interakce proteinů s G-kvadruplexy.....	24
2.2.4	G-kvadruplexy ve vztahu k léčbě rakoviny.....	25
2.3	Vybrané metody vhodné pro charakterizace struktur G-kvadruplexů a studium interakcí proteinů s DNA	27
2.3.1	Spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD spektroskopie).....	27
2.3.2	ThT fluorescenční vazebný test.....	29
2.3.3	Test posunu elektroforetické mobility (EMSA).....	29
2.3.4	Kvasinkové reportérové testy.....	31
2.4	Protein p53	32
2.4.1	Struktura proteinu p53.....	32
2.4.2	Biologické funkce proteinu p53.....	33
2.4.3	Vazebné vlastnosti proteinu p53.....	35
3	Cíle diplomové práce	37
4	Experimentální část	38
4.1	Materiály	38
4.1.1	Kmeny kvasinek a bakterií.....	38
4.1.2	Genetický materiál.....	38
4.1.3	Antibiotika.....	39
4.1.4	Protilátky.....	39
4.1.5	Chemikálie.....	39
4.1.6	Přístrojové vybavení a další pomůcky.....	40
4.2	Složení použitých médií a dalších roztoků	41
4.2.1	Média použitá při kultivaci bakterií.....	41
4.2.2	Média použitá při kultivaci kvasinek.....	41
4.2.3	Roztoky použité při izolaci proteinu IFI16.....	42
4.2.4	Roztoky použité při Western blotu.....	43
4.2.5	Roztoky použité při vazebných a kompetitivních vazebných experimentech.....	44
4.2.6	Roztoky použité při elektroforetických testech posunu mobility.....	44
4.2.7	Roztoky použité při transformaci kvasinek.....	45
4.3	Metody	45
4.3.1	Testy cirkulárního dichroismu (CD spektroskopie).....	45
4.3.2	ThT fluorescenční vazebný test.....	46
4.3.3	Elektroforetický test posunu mobility (EMSA).....	46

4.3.4	Izolace proteinu IFI16 proteinovou afinitní chromatografií	46
4.3.5	Western blot po izolaci proteinu IFI16 proteinovou afinitní chromatografií	48
4.3.6	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu IFI16.....	49
4.3.7	Hybridizace oligonukleotidů pro vazebné a kompetitivní vazebné experimenty ...	49
4.3.8	Vazebné experimenty	50
4.3.9	Kompetitivní vazebné experimenty	50
4.3.10	Izolace plazmidové DNA	50
4.3.11	Transformace kvasinkových kmenů lithium-acetátovou metodou.....	51
4.3.12	Luciferázové reportérové testy	52
5	Výsledky a diskuze.....	53
5.1	Biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu	53
5.1.1	Charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu CD spektroskopií.	53
5.1.2	Charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu ThT vazebným fluorescenčním testem	65
5.1.3	Elektroforetický test posunu mobility (EMSA).....	69
5.1.4	Shrnutí biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu	71
5.2	Izolace, purifikace a stanovení koncentrace proteinu IFI16	72
5.3	Studium vazby proteinu IFI16 na DNA <i>in vitro</i>	76
5.3.1	Vazebné experimenty	76
5.3.2	Kompetitivní vazebné experimenty	78
5.4	Studium interakce proteinu IFI16 s DNA v jednohybridním kvasinkovém systému .	86
6	Závěr	95
7	Seznam použitých zdrojů.....	97
8	Seznam použitých zkratk	128
9	Přílohy.....	133

1 ÚVOD

Interferonem gama indukovaný protein 16 (IFI16) náleží do vysoce homologní rodiny lidských proteinů HIN-200, pro níž je charakteristická přítomnost jedné nebo dvou tandemově umístěných DNA-vazebných HIN domén. Protein IFI16 plní v buňce řadu funkcí – rozeznává poškozenou nebo cizorodou DNA, podílí se na regulaci buněčné proliferace, tkáňové diferenciaci a procesech buněčného stárnutí a apoptózy [1]. Vlivem své vazebné aktivity a subcelulární lokalizace indukuje protein IFI16 aktivaci různých signálních drah zapojených do nespecifických imunitních reakcí. Stejně jako řada dalších restrikčních faktorů, protein IFI16 rozpoznává specifické vzory ve virové DNA [2–4] a je schopen inhibovat virovou infekci přímou interakcí s DNA virů před zahájením exprese interferonů [5]. Bylo prokázáno, že k řízení vrozené imunitní odezvy je nezbytná přítomnost proteinu IFI16 plné délky, kdy dochází k tvorbě homo- a heterodimerních komplexů a kooperativnímu sestavení inflamazomu [6]. Protein IFI16 plné délky je schopen reprimovat transkripci DNA a modulovat aktivitu některých transkripčních faktorů jako jsou proteiny p53 a pRb [7]. V poslední době je zkoumáno zapojení proteinu IFI16 do dalších metabolických drah prostřednictvím jeho vazebných interakcí během nádorové suprese [8–11]. Domény proteinu IFI16 vykazují odlišné vazebné vlastnosti k různým strukturám DNA vlivem rozdílné distribuce povrchového náboje při vysoce konzervované topologii obou HIN domén [12]. Přestože protein IFI16 interaguje *in vitro* s jednořetězcovou i dvouřetězcovou DNA prostřednictvím elektrostatických interakcí kladně nabitých proteinových reziduí se záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA [13], upřednostňuje protein strukturálně specifickou vazbu k nadšroubovicové dsDNA [14] a různým křížovým strukturám. Protein IFI16 vykazuje specifickou vazbu k tzv. strukturám G-kvadruplexů, které je schopen svou vazbou účinně stabilizovat [13]. G-kvadruplexy jsou sekundární nekanonické lokální struktury DNA a RNA, které se snadno tvoří *in vitro* i *in vivo* ze sekvencí bohatých na guaninové báze. Struktury G-kvadruplexů se podílí na udržování stability genomu a zapojují se do procesů replikace DNA, transkripce i translace. Jejich výskyt byl prokázán v oblastech promotorů onkogenů, telomer, 5' a 3' nepřekládaných oblastech DNA a mediátorové RNA [15–19]. Vzhledem k lokalizaci struktur G-kvadruplexů ve významných oblastech DNA se G-kvadruplexy staly předmětem zájmu jako potenciální terapeutické cíle. Byla vyvinuta řada léčiv schopných interagovat se strukturami G-kvadruplexů a je zkoumáno jejich zapojení při výrobě biosenzorů [20, 21], biokatalyzátorů [22] a biomateriálů [23, 24]. Tvorba struktur G-kvadruplexů v nevhodné oblasti genomu, nebo čase může naopak zvyšovat nestabilitu genomu a indukovat tvorbu rakovinného bujení. Byla vyvinuta řada metod pro identifikaci a charakterizaci struktur G-kvadruplexů a jejich interakcí s proteiny nebo G-kvadruplexovými ligandy – např. nukleární magnetická rezonance [25], tepelná a izotermická diferenční spektrometrie [26], spektroskopie cirkulárního dichroismu [27], testy posunu elektroforetické mobility nebo *in vivo* experimenty založené na kvasinkovém isogenním systému využívající trans-aktivační potenciál proteinu p53.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Protein IFI16

Interferonem gama indukovaný protein 16 (IFI16) se řadí do vysoce homologní rodiny savčích proteinů HIN-200. Proteinová rodina HIN-200 zahrnuje mj. čtyři lidské členy, kteří sdílí jednu nebo dvě tandemově umístěné konzervované C-terminální HIN domény o délce 200 aminokyselin, jež se podílejí na vazbě proteinu k DNA a protein-proteinových interakcích během regulace transkripce [8–11]. Spolu s proteinem IFI16 jsou mezi lidské členy rodiny HIN-200 řazeny proteiny MNDA (nukleární diferenační antigen myeloidních buněk; z angl. myeloid cell nuclear differentiation), AIM2 (interferonem indukovatelný protein chybějící v melanomu; z angl. absent in melanoma 2) a IFIX (interferonem gama indukovaný protein X; z angl. interferon gamma inducible protein X) [28–31]. Všechny lidské proteiny rodiny HIN-200 sdílejí motiv homotypické N-terminální α -helikální PYRIN domény [32, 33] a řadí se do rodiny cytosolických DNA receptorů podobným AIM2 (ALR; z angl. AIM2 like receptors) [34].

Exprese proteinu IFI16 byla detekovatelná v epiteliálních i endoteliálních buňkách, fibroblastech a buňkách hematopoetického původu [35–38]. Rovněž bylo diskutováno možné zapojení proteinu IFI16 do aktivace lidských dendritických buněk a aktivaci adaptivního imunitního systému [38]. Protein IFI16 byl původně označován jako jaderný protein, protože ve své struktuře obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS, z angl. nuclear localization signal) [39]. Později byla jeho přítomnost v různých typech buněk detekována nejen v jádře (včetně jadérka a nukleoplazmy), ale rovněž v cytoplazmě a obou kompartmentech současně, čímž se odlišuje od ostatních členů rodiny HIN-200 s výlučně jaderným nebo cytoplazmatickým výskytem [40]. Rovněž bylo prokázáno, že protein IFI16 je schopen za určitých podmínek translokovat z jádra do cytoplazmy, jako tomu je např. po vystavení buněk keratinocytů UV-B (ultrafialové B; z angl. ultraviolet B) zářením [41]. Přestože bylo charakterizováno několik faktorů, které mohou regulovat subcelulární lokalizaci proteinu IFI16, nebyly dosud molekulární mechanismy regulace jeho redistribuce objasněny [40].

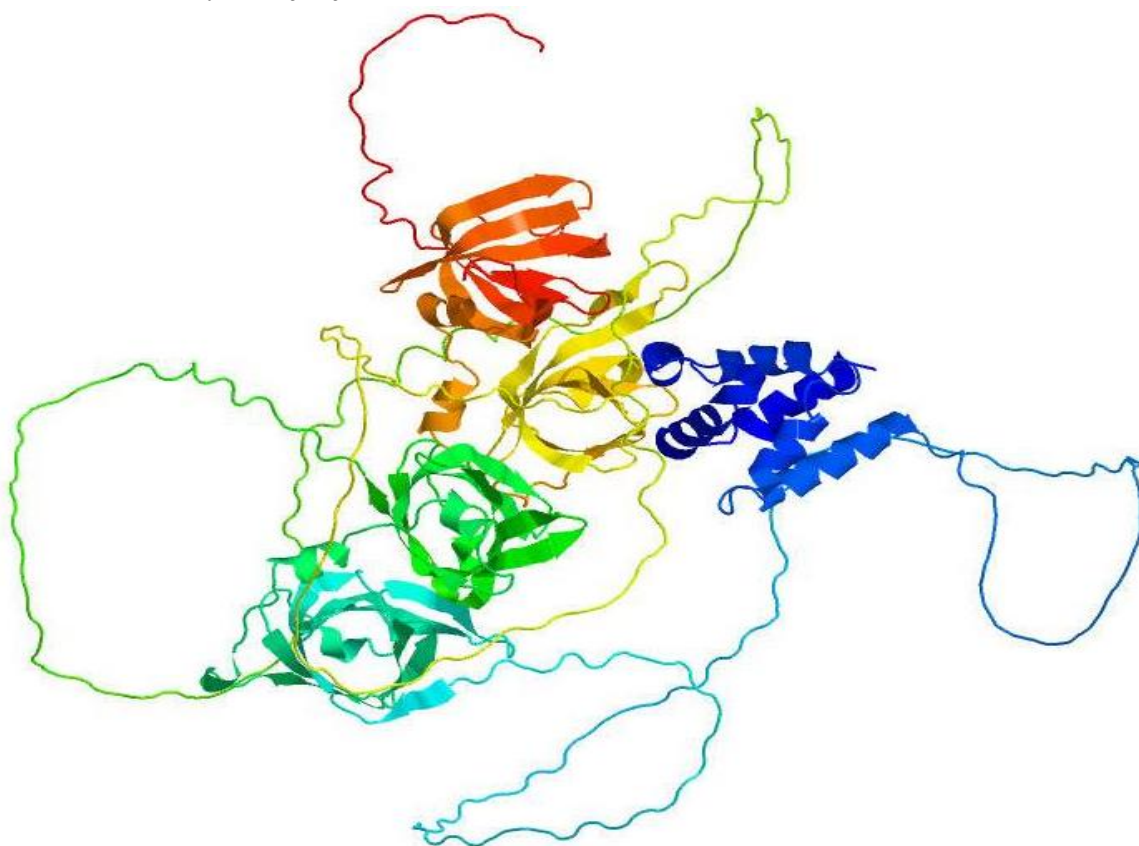
Translokace proteinu IFI16 v buňce pravděpodobně nastává i v důsledku jeho interakcí s adaptorovým proteinem ASC (adaptorový protein spojený s apoptózou obsahující CARD; z angl. apoptosis-associated speck-like protein containing CARD). Protein ASC je primárně detekován v jádrech lidských monocytů a makrofágů. V důsledku infekce buněk dochází k jeho redistribuci z jader do cytosolu [42]. Bylo prokázáno, že během infekce lidských endoteliálních buněk virem KSHV (herpesvirus spojený s Kaposiho sarkomem; z angl. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), dochází k interakci proteinu IFI16 s proteinem ASC, která indukuje tvorbu inflamazomu translokujícího z jádra do perinukleární oblasti. [43]. Kromě výše zmíněných, ovlivňuje subcelulární lokalizaci proteinu IFI16 i samotný typ (myeloidní vs. epiteliální buňky) a fenotyp buněk (normální vs. transformované buňky), exprimované hladiny proteinu (endogenní vs. ektopicky exprimovaný) a léčba interferonem responzivními buňkami [40].

2.1.1 Struktura proteinu IFI16

Protein IFI16 se vyskytuje ve třech izoformách (A, B a C), které vznikají alternativním sestřihem mRNA (mediátorová RNA; z angl. messenger RNA) genu *IFI16* [35, 36]. K sestřihu dochází v místě kódující oblasti tzv. raménka (*linker*) oddělujícího obě HIN domény. Oblast linkeru je bohatá

na aminokyseliny serin-threonin-prolin (S/T/P) a může obsahovat až tři kopie vysoce konzervované 56-aminokyselinové S/T/P domény kódované odlišnými exony [44]. Přestože může být protein IFI16 fosforylován na serinových a threoninových residuích, nebyly dosud objeveny *up-stream* proteinkinázy nebo význam fosforylace proteinu [39].

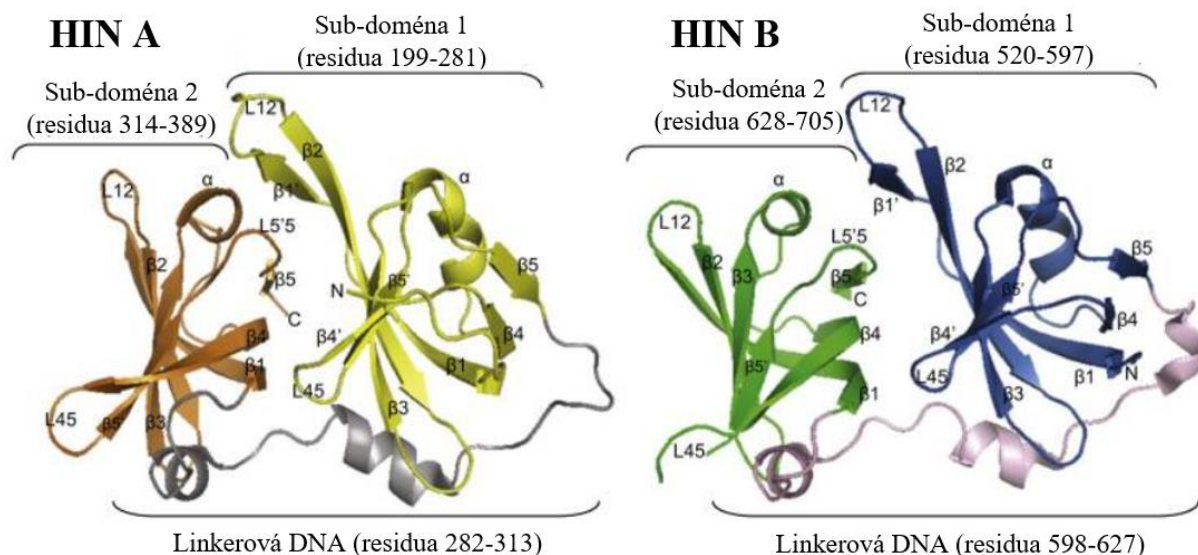
Protein IFI16 obsahuje dvě vysoce konzervované tandemově umístěné DNA vazebné HIN domény (HIN-A a HIN-B) a konzervovanou N-terminální α -helikální PYRIN doménu odpovědnou za převážnou část jeho protein-proteinových interakcí. PYRIN doména bývá označována jako „doména smrti“ a je přítomna u nadrodiny proteinů zapojených do apoptózy a imunitních reakcí [32, 33]. C-terminální HIN domény se podílí jak na vazbě k DNA, tak na interakci s proteiny regulujícími transkripci [8–11]. Obě HIN domény se vzájemně liší v oblastech smyček a v orientaci blízkých sekundárních strukturních prvků. HIN-A a HIN-B domény jsou tvořeny aminokyselinovými residui 192–393 (HIN-A) a 515–710 (HIN-B) a obě obsahují dvě v tandemu umístěné subdomény [12], jak je znázorněno na obrázku 2.1.1.



Obrázek 2.1.1: Bioinformaticky předpovězená struktura proteinu IFI16 plné délky. Protein IFI16 obsahuje dvě tandemově umístěné C-terminální DNA-vazebné HIN domény (HIN-A a HIN-B) a N-terminální PYRIN doménu (tmavě modrá). Obě HIN domény jsou tvořeny dvěma sub-doménami (HIN-A sub-doména 1 je značena žlutě, sub-doména 2 červeně, HIN-B sub-doména 1 je značena světle modře a subdoména 2 zeleně). Vizualizace pdb souboru AF-Q16666-F1-model_v4 byla provedena v programu Jmol.

Sub-domény 1 se rozkládají na aminokyselinových zbytcích 199–281 (HIN-A) a 520–597 (HIN-B) a jsou tvořeny osmi β -skládanými listy a jedním α -helixem, které společně vytváří strukturu globulárního soudku o rozměrech $13 \times 18 \times 36 \text{ \AA}^3$ (HIN-A sub-doména 1) a $14 \times 18 \times 35 \text{ \AA}^3$

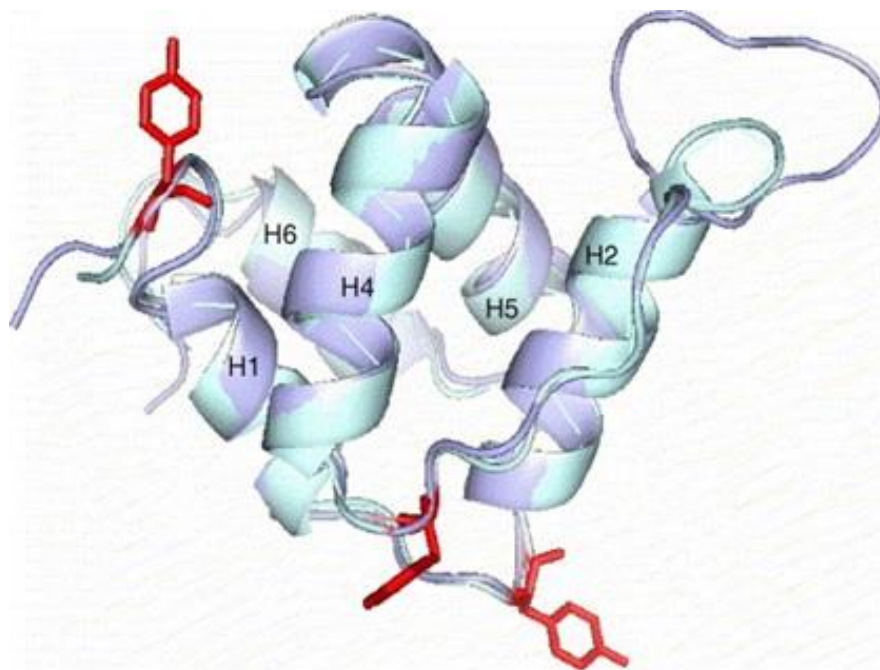
(HIN-B sub-doména 1). Sub-domény 2 obou domén jsou tvořeny aminokyselinovými zbytky 314–389 (HIN-A) a 628–705 (HIN-B). Sub-domény 2 tvoří sekundární struktury jednoho α -helixu a šesti β -skládaných listů, které se formují do struktury kulovitého soudku o rozměrech $11 \times 19 \times 21 \text{ \AA}^3$ (HIN-A sub-doména 2) a $10 \times 20 \times 22 \text{ \AA}^3$ (HIN-B sub-doména 2). Sub-domény obou domén jsou vzájemně spojeny mezidoménovým raménkem (*linkerem*) [12]. Struktura obou domén s příslušnými sub-doménami je zobrazena na obrázku 2.1.2.



Obrázek 2.1.2: Struktura DNA vazebných HIN domén proteinu IFI16. Obě domény jsou dále rozděleny na dvě sub-domény, které jsou spojeny mezidoménovým linkerem [45] (upraveno).

Na základě bioinformatické analýzy modelových sekvencí proteinů HIN-200 bylo zjištěno, že HIN domény obsahují dva vysoce konzervované OB záhyby schopné asociovat s oligonukleotidovými nebo oligosacharidovými řetězci (z angl. oligonucleotide/oligosaccharide binding folds) [46]. OB záhyby jsou tvořeny dvěma třívláknovými vzájemně antiparalelními β -skládanými listy, které se formují do struktury uzavřeného β -soudku. Důležitou funkci při rozpoznání a vazbě proteinu IFI16 k řetězcům oligonukleotidů nebo oligosacharidů plní smyčky L12 a L45. Zatímco smyčky dalších proteinů nesoucích motivy OB-záhybů, jako např. AspRS (tRNA (transferová RNA) syntetáza kyseliny asparagové; z angl. Aspartic acid transfer RNA synthetase), RPA70 (podjednotka replikačního proteinu A o velikosti 70 kDa vázající jednořetězcovou DNA; z angl. replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit) nebo a-TEBP (protein *Arabidopsis thaliana* vázající responzivní element obsahující ethylen; z angl. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein), mohou být tvořeny i více než 15 aminokyselinovými zbytky, OB-záhyby proteinu IFI16 čítají nejvíce pět aminokyselinových residuí [47]. Rovněž byly u OB-záhybů proteinu IFI16 objeveny změny ve spojovacích vláknech $\beta 3$ a $\beta 4$ α -helixu [47, 48]. K zajištění správné strukturní stability obou domén je nezbytná přítomnost obou vzájemně interagujících sub-domén. Mezi sub-doménami dochází k tvorbě nekovalentních a aromatických interakcí konzervovaných napříč proteiny rodiny HIN-200 [12].

Intenzita represe indukované DNA vazebnými HIN doménami je pravděpodobně podpořena přítomnou N-terminální PYRIN doménou proteinu IFI16, která se rovněž může vázat k molekulám DNA [49]. PYRIN doména označována rovněž jako PAAD nebo DAPIN doména se řadí do nadrodiny tzv. domén smrti. Domény smrti jsou obsaženy v proteinech, které se podílí na apoptóze, resp. pyroptóze a zánětlivých odpovědích [50]. Pyroptóza je druh prozánětlivé programované buněčné smrti. Její aktivace je zprostředkována enzymem kaspázou-1 a nastává v důsledku patologických vlivů jako jsou např. mrtvice, srdeční infarkt nebo rakovina [51]. Pyroptóza je nezbytná pro kontrolu mikrobiálních infekcí. Její dysregulace může vést k rozvoji autoimunitních onemocnění [52]. Do nadrodiny domén smrti patří rovněž domény CARD/DED a DD [50]. Proteiny nesoucí doménu PYRIN sdílejí pouze nízkou sekvenční podobnost (15 %), s výjimkou proteinu IFI16 a MNDA, které sdílejí sekvenční podobnost 50 %. Struktura domény PYRIN byla charakterizována nukleární magnetickou rezonancí. Doména je tvořena svazky šesti α -helixů s neuspořádaným helixem 3 tvořícími topologii řeckého klíče [33, 53]. Bioinformatický model PYRIN domény vytvořený homologním modelováním na základě NMR dat struktury proteinu NAP1L1 (nucleosome assembly protein 1 like 1) je znázorněn na obrázku 2.1.3



Obrázek 2.1.3: Trojdimenzionální struktura PYRIN domény. Homologické modelování domény NAP1L1-PYRIN je znázorněno fialově. Model PYRIN domény proteinu IFI16 modelovaný programem Modeller je zobrazen světle zelenou. Červeně jsou zobrazeny molekuly tyrosinu [54] (upraveno).

2.1.2 Biologické funkce proteinu IFI16

Protein IFI16 je senzor virové a bakteriální DNA [40, 55], který se zapojuje mj. do procesů regulace buněčné proliferace, tkáňové diferenciaci, buněčného stárnutí a apoptózy [1]. Protein IFI16 je součástí BASC DNA opravného multiproteinového komplexu (komplex proteinů asociovaný s genem BRCA1 pro protein náchylnosti k rakovině prsu typu 1; z angl. a super complex of BRCA1 (breast cancer type 1)-associated proteins), jehož tvorba je indukována v důsledku poškození DNA UV zářením [49]. Vzniklý proteinový komplex indukuje vazbu na DNA v oblasti promotorů represe transkripce [56].

Rovněž byla prokázána souvislost mezi proteinem IFI16 a patogenezi některých imunitních onemocnění, jako je systémový lupus erythematosus (SLE; z angl. lupus erythematosus disseminatus), kdy je protein IFI16 vylučován buňkami v podobě alarminu, kde tvoří autoantigen [41, 57–60].

2.1.2.1 Protein IFI16 jako senzor cizorodé DNA

Imunitní odpověď je zprostředkována prostřednictvím složek přirozené a specifické imunity. Přirozená imunita je vývojově starší, vrozená, neadaptivní a antigenně nespecifická. Je přítomna u všech mnohobuněčných organismů. Buněčnou složku vrozené imunity představují fagocyty, makrofágy a NK-buňky a složku humorální tvoří komplement a interferony. Oproti tomu specifická imunita je vývojově mladší (přítomna pouze u obratlovců), adaptivní a disponuje imunologickou pamětí. Buněčnou složku specifické imunity představují T-buňky, které jsou schopny aktivovat B-lymfocyty (složka humorální), které produkují protilátky [61, 62]. V posledních několika letech došlo k vyčlenění tzv. „vnitřní imunity“, která zahrnuje skupinu interferonů (zvláště interferon typu I) a cytokiny, tedy původně složky nespecifické imunity [63]. Buněčné proteiny, které se zapojují do antivirových obranných mechanismů (jako protein IFI16) jsou označovány jako restriční nebo omezující faktory (RF, z angl. restriction factors) [64]. Řada těchto restričních faktorů rozpoznává specifické vzory ve virové DNA [2–4]. Oproti *Toll-like* nebo RIG (gen indukovatelný kyselinou retinovou; z angl. retinoic acid-inducible gene) receptorům, mohou RF inhibovat virovou infekci přímou interakcí s virovou DNA ještě před samotnou indukcí exprese interferonů [5].

Bylo prokázáno, že protein IFI16 plní nepostradatelnou funkci restričního faktoru proti virové replikaci [30, 31]. Vazebná aktivita proteinu IFI16 vede k aktivaci různých signálních drah a spolu s jeho subcelulární lokalizací určují aktivaci konkrétní signální dráhy. Během řízení vrozené imunitní odezvy je nezbytná přítomnost proteinu IFI16 plné délky, tedy proteinu s oběma DNA-vazebnými doménami a PYRIN doménou, která zprostředkovává interakci s dalšími molekulami proteinů za tvorby homo- i heterodimerů, což indukuje kooperativní sestavení vláken a aktivaci signálních drah [6]. V případě, že PYRIN doména proteinu IFI16 chybí, dochází pouze ke slabé afinitní asociaci s dvouřetězcovou DNA (dsDNA; z angl. double-stranded DNA) [65]. Detekce dsDNA proteinem IFI16 v cytoplasmě vede k aktivaci dráhy STING-TBK-IRF3 (stimulátor interferonových genů; z angl. stimulator of interferon genes-TANK vazebná kináza; z angl. TANK-binding kinase-interferonový regulační faktor; z angl. interferon regulatory factor), která indukuje jadernou expresi interferonu typu I [66]. Podrobný molekulární mechanismus aktivace STING a indukce sestavení inflamazomu proteinem IFI16 ovšem nebyl dosud zcela objasněn [13]. Přestože se protein IFI16 řadí do rodiny receptorů podobných AIM2, existuje hypotéza, že u nich dochází k odlišnému sestavení komplexu inflamazomu vlivem rozdílných povah jejich PYRIN domén [12].

Dosud byla imunitní reakce zprostředkovaná proteinem IFI16 nejlépe popsána u virů z čeledi *herpesviridae* a viru lidské imunodeficiency (HIV; z angl. human immunodeficiency virus). Po rozpoznání α -herpesviru HSV-1 (virus herpes simplex typ 1; z angl. herpes simplex virus 1) v jádře hostitelské buňky proteinem IFI16, dochází k translokaci proteinu do cytoplazmy, kde dochází ke stimulaci signální dráhy STING-TBK-IRF3, která indukuje expresi interferonu typu I v jádře hostitelské buňky – stejně jako tomu je v případě detekce patogenní DNA přímo v cytoplasmě [34, 67]. Rovněž dochází k interakci proteinu IFI16 s adaptorovým proteinem ASC a prokaspázou-1 (proCasp-1; z angl. procaspase-1) za vzniku proteinového komplexu inflamazomu, jehož tvorba aktivuje štěpení kaspázy-1 (Casp-1; z angl. caspase 1) [68]. Stejně jako HSV-1 je i DNA

β -herpesviru HCMV (lidský cytomegalovirus; z angl. human cytomegalovirus) detekována v jádře. Protein IFI16 blokuje replikaci HCMV virového promotoru UL-54 prostřednictvím aktivace Sp1 (protein specifčnosti 1; z angl. specificity protein 1) transkripčních faktorů [69, 70], nebo aktivuje expresi antivirových cytokinů zprostředkovanou signální dráhou STING [71]. Oproti tomu, po rozpoznání dsDNA γ -herpesviru KSHV, dochází k sestavení komplexu inflamazomu a zrání interleukinů IL-1 β a IL-18 nezávisle na ALR [12]. V případě detekce DNA viru EBV (virus Epstein-Barrové; z angl. Epstein-Barr virus) proteinem IFI16 v průběhu latentní infekce viru, dochází k tvorbě komplexu ASC-IFI16-proCasp-1 přímo v jádře. Následně dochází k translokaci vzniklého komplexu inflamazomu do cytoplazmy a aktivaci Casp-1, která štěpí prointerleukin pro-IL-1p za vzniku IL-1 β [72].

Během infekce viru HIV-1 byly dosud pozorovány tři možné scénáře zapojení proteinu IFI16 do imunitních odpovědí. Během infekce makrofágů interaguje protein IFI16 s dsDNA vzniklou reverzní transkripcí virové RNA. Dochází k aktivaci signální dráhy STING-TBK1-IRF3 nebo IRF7, která indukuje expresi interferonu typu I. Rozpoznání virové dsDNA v aktivovaných CD4+ T-lymfocytech (skupina T-lymfocytů s diferenciací skupinou povrchových glykoproteinů lokalizovaných převážně na vnější straně cytoplazmatické membrány) vede k aktivaci signální dráhy STING-TBK1. V buňkách nedochází k produkci interferonů vlivem poškození signálního mechanismu, což vede k nastolení produktivní infekce. Oproti tomu v klidových buňkách CD4+ T-lymfocytů dochází k aktivaci inflamazomu a tvorbě aktivní molekuly IL-1p, která indukuje buněčnou smrt pyroptózou [73–75].

2.1.2.2 *Protein IFI16 jako represor transkripce*

Stejně jako řada aktivátorů transkripce jsou i transkripční represory často modulární proteiny schopné interagovat s jinými buněčnými a virovými proteiny a strukturními oblastmi schopnými vázat DNA. Během represe přitom nedochází ke kompetici aktivátoru a represoru o vazebné místo, nýbrž k interakci daného represoru se složkami bazálního transkripčního aparátu, nebo k interakci se samotnými aktivátory transkripce [76]. Transkripční represory mohou vázat DNA sekvenčně specifickým způsobem, nebo interagovat s proteiny vázající DNA, které řídí přenos daného represoru na konkrétní vazebné místo [7].

Biologické vlastnosti proteinu IFI16 jako indukce exprese interferonů α a γ , jaderná lokalizace a schopnost interakce proteinu s DNA prostřednictvím HIN domén ukazují na schopnost proteinu regulovat transkripci DNA a možnost modulace aktivity některých transkripčních faktorů [77–80]. Experimenty provedené na systému využívající model GAL4 (galaktózou indukovatelný promotor) transkripčního faktoru IFI16 prokázaly silné potlačení transkripce reportérového genu po vazbě proteinu IFI16 do promotorové oblasti modelového systému. K represí transkripce docházelo po vazbě proteinu do *up-stream* oblasti vzdálené do 760 bp (párů bazí; z angl. base pairs) a *down-stream* oblasti do vzdálenosti 1 000 bp od místa počátku transkripce, a to beze změny hladiny represe proteinem v závislosti na délce [49]. V daném systému docházelo k významnému potlačení transkripce pouze v případě ekvimolekulárního množství obou proteinů. GAL4 transkripční faktor váže molekulu DNA jako dimer, v takovém případě dochází k signifikantnímu potlačení pouze v případě vazby dvou molekul proteinu IFI16. Protein IFI16 může rovněž interagovat s transkripčními regulačními proteiny jako jsou p53 (buněčný nádorový antigen, „strážce genomu“; z angl. cellular tumor antigen p53) a pRb (protein související s retinoblastomem; z angl. retinoblastoma-related protein) a podílí se na modulaci

jejich transkripční aktivity [7]. Jak protein p53, tak protein pRb vykazují aktivní represi [81–83] s případnou korepresí v komplexu s proteinem IFI16 [49].

Represe proteinu IFI16 a celé proteinové rodiny HIN-200 je podmíněna přítomností amino-koncové DNA-vazebné oblasti. K účinnému potlačení transkripce je nezbytné zapojení proteinu IFI16 plné délky. Exprese samotné HIN-A nebo HIN-B DNA-vazebná domény nebo exprese C-terminální oblasti obsahující současně obě HIN domény s pantovou oblastí neindukují represi transkripce [49].

2.1.2.3 Rozpoznání vlastní a cizorodé DNA proteinem IFI16

Mechanismy rozpoznání patogenní DNA i RNA prostřednictvím vrozeného imunitního systému byly předmětem řady výzkumů. Zvláštní pozornost byla věnována mechanismu rozpoznání vlastní DNA od cizorodých nukleových kyselin nebo poškozené DNA hostitele [84].

K první detekci cizorodé nebo poškozené DNA může dojít již v cytoplazmě. Imunitní systém vyhodnotí veškerou přítomnou DNA jako cizorodou, protože za normální podmínek se endogenní DNA hostitele v cytoplazmě nenachází. Většina DNA virů těmito mechanismům detekce uniká z důvodu obnažení patogenní DNA až v okamžiku vstupu do jádra hostitelské buňky [2, 3]. V reakci na přítomnost patogenní DNA v jádře dochází k sestavení signálních drah, které indukují zánětlivé reakce vůči DNA patogenu, ale nikoliv vůči vlastní dsDNA v jádře [43, 68, 85]. Jedním z klíčových faktorů umožňující proteinu rozlišit vlastní a cizorodou DNA v jádrech hostitelských buněk je chromatinizace DNA [43, 85–89]. Bylo prokázáno, že transfekovaná chromatinizovaná DNA viru SV40 (opičí vakuolizující virus 40; z angl. simian vacuolating virus 40) je schopna se účinně vyhnout rozpoznávacímu mechanismu proteinu IFI16 [88]. K účinné oligomerizaci proteinu na molekule dsDNA dochází za předpokladu, že DNA dosahuje délky alespoň 50–70 bp, přičemž velikost *linkeru* vyskytujícího se mezi dvěma komplexy nukleozomů se pohybuje v rozmezí 20–30 bp [90]. Nukleozomy v genomu hostitelské buňky omezují 1D (jednorozměrnou; z angl. one-dimensional) difuzi proteinu a zamezují oligomerizaci proteinu IFI16 a signálních ohnisek na molekule dsDNA [84].

K vytvoření funkčního mechanismu sestavení prozánětlivého proteinového komplexu musí být molekuly proteinu IFI16 schopné vzájemné lokalizace na molekulách patogenní DNA a nesmí inhibovat vlastní dsDNA. V případě přetrvávající signalizace proteinem IFI16 může dojít k rozvoji autoimunitních onemocnění jako je např. Sjögrenův syndrom [44, 44, 58, 59, 91]. Rychlost sestavení proteinových komplexů se zvyšuje nelineárně (až 50krát) s rostoucí délkou dsDNA až do 600 bp, kdy dosahuje rychlost sestavení proteinového komplexu konstantní hodnoty. K iniciaci tvorby komplexu je nezbytná přítomnost alespoň čtyř kopií proteinu IFI16 a k optimální oligomerizaci je nutná přítomnost přibližně deseti proteinových molekul [84]. Ke zvýšení pravděpodobnosti vzájemné lokalizace molekul proteinu IFI16 na molekule DNA protein jednorozměrně skenuje podél dsDNA. Jednotlivé molekuly proteinu IFI16 difundují na dsDNA. Difuzní koeficient proteinu IFI16 se zvyšuje s rostoucí iontovou silou prostředí [92]. Naopak ke snížení difuzního koeficientu dochází s rostoucím množstvím molekul proteinu IFI16 navázaným do vznikajícího komplexu [84]. Delší molekuly DNA umožňují rychlejší tvorbu oligomerů proteinu IFI16 než kratší molekuly dsDNA, kde dochází k 1D difuzi proteinu. Delší molekuly DNA rovněž neumožňují rychlou lokalizaci již navázaných molekul proteinu IFI16 na DNA [93–95].

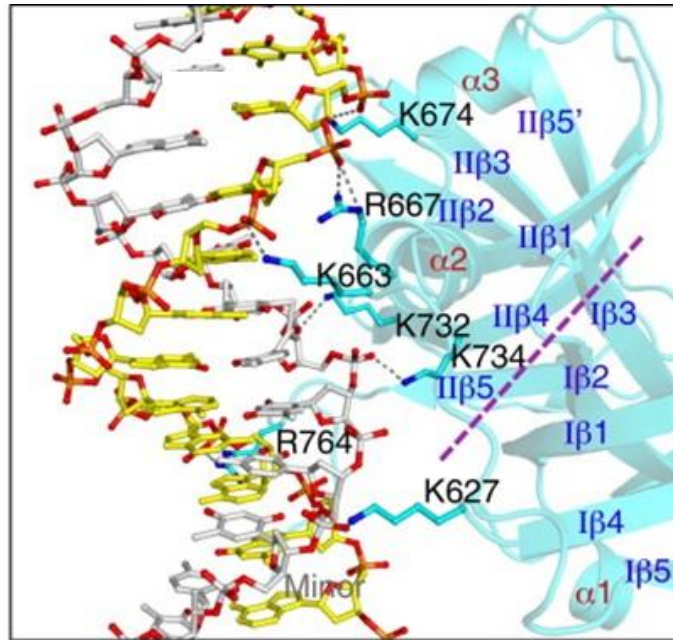
2.1.3 Vazebné vlastnosti proteinu IFI16

HIN domény všech členů ALR vykazují vysoce konzervovanou topologii s rozdílnou distribucí povrchového náboje, který ovlivňuje povrch a vazbu domén k DNA [12]. Rozdíly vazebných vlastností obou DNA-vazebných domén proteinu IFI16 se projevují nejen při snímání DNA, ale i během aktivace vrozených imunitních reakcí [13]. Přestože protein IFI16 interaguje *in vitro* s ssDNA (jednořetězcová DNA; z angl. single-stranded DNA) i dsDNA různé délky, k optimální indukci tvorby interferonu *in vivo* je nezbytná transfekce buněk dsDNA alespoň o délce 70 bp [34]. Kromě vrozených imunitních odpovědí se vazebné vlastnosti proteinu IFI16 projevují rovněž při opravě DNA a regulaci aktivity transkripčního faktoru p53 [10, 12]. Bylo prokázáno, že protein IFI16 prostřednictvím HIN-A domény interagující s C-koncem proteinu p53 a přispívá ke zvýšení jeho sekvenčně specifické vazby na DNA během transkripce [12].

Obě HIN domény proteinu IFI16 interagují *in vitro* s ssDNA i dsDNA [10, 34] prostřednictvím elektrostatických interakcí [13], které jsou ovlivněny koncentrací solí [96]. K elektrostatické interakci dochází mezi kladně nabitými postranními řetězci aminokyselin a záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA [13]. Obě DNA-vazebné HIN domény proteinu IFI16 společně vykazují vyšší schopnost vazby než samotná doména HIN-A nebo HIN-B [34].

Výsledky NMR strukturní analýzy ukázaly, že HIN-A doména k vazbě na DNA využívá primárně residua z vlákna $\beta 4$ a smyčky druhého záhybu L45 spojujícího vlákno $\beta 4$ s $\beta 5$. Vzniklý shluk kladně nabitých proteinových zbytků z druhého záhybu spojuje páteř jednoho řetězce DNA a tvoří pseudošroubovicovou spirálu, která se páruje s dalším řetězcem DNA. Pseudošroubovicová spirála je zachycena mezi dvěma postranními řetězci aminokyselin K371–K372 a N373–Q374, přičemž k interakci s DNA dochází primárně u pozitivně nabitých aminokyselin R368–K377. Druhou oblastí vázající DNA na HIN-A doméně je asymetrická jednotka tvořená primárně aminokyselinami z kanonické smyčky L34 záhybu 1 a C-konce HIN-A domény. Zatímco mezi aminokyselinovým zbytkem K256 a kyslíkem fosfátové skupiny kostry DNA dochází k tvorbě vodíkové vazby, K214 umístěná na smyčce mezi vlákny $\beta 1$ s $\beta 2$ interaguje s řetězcem DNA [13].

DNA-vazebný povrch HIN-B domény je předem formován a není ovlivněn přítomností dsDNA, jak ukázala analýza její struktury v případě absence i přítomnosti molekuly DNA. HIN-B doména interaguje s DNA převážně prostřednictvím aminokyselinových reziduí umístěných na samotném záhybu OB₂ (K732, K734 a R764) a na *linkeru* mezi oběma OB záhyby (K663 a R667) [96], jak je znázorněno na obrázku 2.1.4.



Obrázek 2.1.4: Interakce HIN-B domény proteinu IFI16 s DNA. Interakce DNA:HIN-B prostřednictvím vodíkových můstků jsou prezentovány šedými tečkovanými čarami, řetězce DNA jsou znázorněny žlutou a šedou barvou a hranice obou OB záhybů jsou značeny fialovou přerušovanou linií [96] (upraveno).

Aminokyseliny s DNA interagují prostřednictvím vodíkových vazeb a Van der Waalesových elektrostatických sil s fosfáty hlavního řetězce DNA. Ukazuje se, že zvláště důležitou oblastí pro vazbu HIN-B domény na molekulu DNA představuje oblast záhybu OB₂. Přestože mutace v záhybu OB₁ a oblastí *linkeru* mezi oběma záhyby nemají výrazný vliv na interakci domény HIN-B s DNA, mutace v záhybu OB₂ výrazně narušují vazebnou afinitu celé HIN-B domény. Aminokyselinové zbytky K663 a R667 v HIN-B doméně jsou posunuty ve vyšších polohách oproti zbytkům lokalizovaným v HIN-A doméně. Rovněž residua K734 a R764 v HIN-B doméně nejsou shodná s residui v HIN-A doméně [96]. Tyto rozdíly pravděpodobně způsobují nižší DNA vazebnou afinitu HIN-A domény [34].

HIN-A doména váže ssDNA i dsDNA s podobnou afinitou, zatímco doména HIN-B a obě HIN domény současně vykazují nižší afinitu k ssDNA bohatou na adenin a thymin. Přestože doména HIN-A oproti HIN-B vykazuje rychlejší tvorbu komplexu, váže samotná doména HIN-B DNA bohatou na páry GC bází (guanin a cytosin) pevněji než HIN-A, což prokazuje nižší rychlost disociace komplexu s HIN-B. Na rozdíl od HIN-B, dochází u HIN-A domény k tvorbě stabilního komplexu s ssDNA v roztoku, což bylo potvrzeno kombinací NMR titračních studií a studiemi krystalových struktur komplexu HIN domén s DNA [13].

Vazebné vlastnosti obou DNA-vazebných HIN domén jsou rovněž ovlivněny mutacemi v jejich strukturách. Zatímco mutace aminokyselinových residuí HIN-B domény interagujících s DNA vedou ke snížení indukce promotoru IFN- β a delece celé HIN-B domény způsobí úplné narušení aktivace promotoru [96], mutace proteinu IFI16 plné délky v oblastech HIN-A domény K252A/N254A/K256A/K257A, nebo R368A, K370A, K372A, N373A, Q374A indukují zvýšenou aktivaci promotoru IFN- β [13].

Molekula DNA neformuje pouze pravotočivou nebo levotočivou dvouřetězcovou sekundární strukturu, nýbrž může vytvářet i struktury označované jako vlásenky (palindromy), i-motivy, triplexy

nebo kvadruplexy. Bylo prokázáno, že protein IFI16 upřednostňuje vazbu na tzv. *supercoiled* DNA před vazbou na lineární DNA stejné sekvence [14]. Rovněž bylo prokázáno, že protein IFI16 vykazuje preferenční vazbu k sekundární struktuře G-kvadruplexu (G4, z angl. G-quadruplex). Protein IFI16 je schopen rozpoznat strukturu G-kvadruplexu, specificky se na ni vázat a touto vazbou ji stabilizovat, třebaže je lokalizována v omezeném množství v molekule *supercoiled* DNA. Během specifické vazby dochází k tvorbě globulárních struktur, zatímco vazba na ss- nebo dsDNA indukuje oligomerizaci proteinu podpořenou prostřednictvím PYRIN domény. Stabilizace sekundárních struktur G-kvadruplexů cMYC (sekvence odvozená z promotoru genu cMYC) a HTEL (sekvence odvozená z lidské telomerické DNA; z angl. human-like telomeric DNA) vedla v molárním poměru DNA:protein 1:1 k vyšší stabilizaci, než přidavek 50 mmol·l⁻¹ KCl. Interakce proteinu IFI16 se strukturou G4 způsobuje konformační změny u všech tří proteinových domén a vede ke zneprístupnění aminokyselin R611 až S614 HIN-B domény [97], které tvoří polární kontakty s DNA [96]. Komplexní pohled na problematiku vazebných preferencí proteinu IFI16 ukazuje, že protein vykazuje rostoucí preference od ssDNA, dsDNA, křížové struktury až po motiv G-kvadruplexu, kdy dochází k vazbě až 90 % přítomného proteinu již při molárním poměru DNA:protein 1:4. Dosud nebyla pozorována preference proteinu IFI16 ke konkrétní konformaci G-kvadruplexu [97].

2.2 G-kvadruplexy

Přestože je molekula DNA známa především v podobě dvoušroubovice, projekt ENCODE prokázal, že DNA a RNA může vytvářet nekanonické sekundární struktury se zásadním biologickým významem. Mezi tyto struktury náleží mj. i tzv. G-kvadruplexy (G4) [98].

G-kvadruplexy jsou nekanonické sekundární lokální struktury DNA a RNA, které se snadno tvoří *in vitro* i *in vivo* ze sekvencí bohatých na guaninové báze. Bylo prokázáno, že G-kvadruplexy se zapojují do řady významných buněčných procesů, jako je genová replikace DNA, transkripce, translace a udržování stability genomu. Vyskytují se ve specifických sekvencích s funkčním významem jako jsou telomery a oblasti promotorů onkogenů nebo 5' a 3' nepřekládaných oblastech (UTR; z angl. untranslated region) mRNA.

Existuje řada proteinů, které jsou schopny interagovat s motivem G-kvadruplexu [15–19]. Vzhledem k jejich významným biologickým funkcím se G-kvadruplexy staly vynikajícími potenciálními terapeutickými cíli. Byla vyvinuta řada léčiv schopných interagovat s G4 strukturami, diskutuje se i o jejich využití při výrobě biomateriálů [23, 24], biosenzorů [20, 21] a biokatalyzátorů [22].

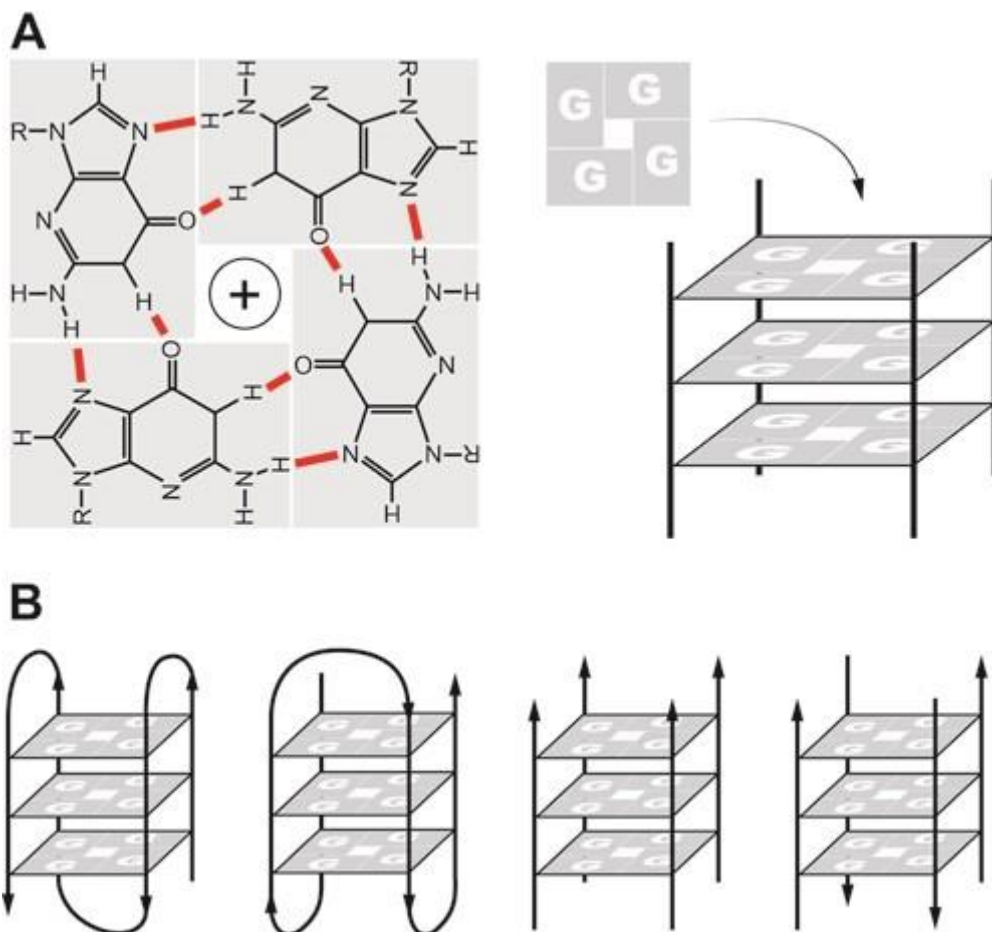
2.2.1 Struktura G-kvadruplexů

G-kvadruplexy se skládají z tzv. guaninových tetrad (G-tetrad). G-tetrydy jsou rovinné platformy složené ze čtveřice guaninových bází, které se vzájemně párují nekovalentními vazbami (vodíkovými můstky) dle tzv. Hoogsteenova párování. Jestliže se dvě a více (nejčastěji tři) G-tetrydy poskládají vzájemně nad sebe, může vzniknout struktura G-kvadruplexu, která je stabilizována sodnými nebo draselnými kationty [99–101]. Oba typy iontů jsou koordinované v kvartetu s kyslíkovými atomy guaninů O6 a stabilizují negativní elektrostatický potenciál ve středech G-tetrad, přičemž stabilizace struktur G-kvadruplexů draselnými ionty je účinnější, než stabilizace ionty sodnými [102].

G-tetrády mohou zaujímat *anti* nebo *syn* glykosidickou konformaci. Jestliže směřují řetězce tvořící G-tetrády stejným směrem a zaujímají glykosidickou konformaci, hovoříme o tzv. paralelních řetězcích. Oproti tomu řetězce směřující opačným směrem jsou tzv. antiparalelní a mohou zaujímat různé glykosidické konformace [103]. V závislosti na počtu řetězců, ze kterých jsou G-kvadruplexy složeny, rozlišujeme intramolekulární a intermolekulární G-kvadruplexy. Intramolekulární G-kvadruplexy jsou tvořeny jedním vláknem (monomery) DNA příp. RNA, zatímco intermolekulární G-kvadruplexy jsou multimery, což znamená, že jsou tvořeny dvěma až čtyřmi různými vlákny nukleových kyselin. Většina biologicky významných G-kvadruplexů je *in vivo* tvořena intramolekulárními strukturami G4. Intramolekulární G4 se oproti tetramolekulárním strukturám tvoří rychleji a vykazují vysokou míru konformační diverzity, která je dána odlišnou strukturou čepičky, topologiemi konformací smyček a různými způsoby jejich skládání.

Na základě skladby řetězců nukleových kyselin tvořících G-kvadruplex rozlišujeme tři základní typy G-kvadruplexů, a to paralelní, antiparalelní a hybridní G-kvadruplexy. Ve struktuře paralelního G-kvadruplexu jsou všechny čtyři řetězce orientovány stejným směrem 5'–3'. Antiparalelní G-kvadruplex je tvořen vzájemně antiparalelními sousedními řetězci nukleových kyselin. Hybridní G-kvadruplex (3 + 1) obsahuje jak paralelní, tak antiparalelní vlákna, kdy tři vlákna směřují zpravidla stejným směrem a čtvrté vlákno je vůči těmto třem antiparalelní. Jak již bylo zmíněno výše, G-kvadruplexy vykazují vysokou diverzitu ve skladbě smyček. Při spojení paralelních řetězců dochází k tvorbě smyčky označované jako vrtule, spojením sousedních antiparalelních vláken vzniká laterální smyčka a při spojení antiparalelních řetězců, kdy je řetězec nukleové kyseliny veden přes jádro G-tetrády hovoříme o tzv. diagonální smyčce. Charakterizaci konkrétní struktury G-kvadruplexu rovněž stěžuje fakt, že stejná sekvence DNA může zaujímat různé konformace jako je tomu např. u lidské telomerické DNA nebo může vytvářet více struktur jako v případě některých promotorů genů [104].

Znalost přesné 3D (trojrozměrné; z angl. three-dimensional) struktury G-kvadruplexů je nezbytná pro návrh ligandů určených k jejich stabilizaci, zvláště při jejich následném použití jako protirakovinné léčivo cílící na G-kvadruplexy v promotorech onkogenů a telomerech a při studiu vlivu G-kvadruplexů na buněčné procesy jako je replikace a transkripce DNA [105]. Struktura G-kvadruplexů je schematicky znázorněna na obrázku 2.2.1.



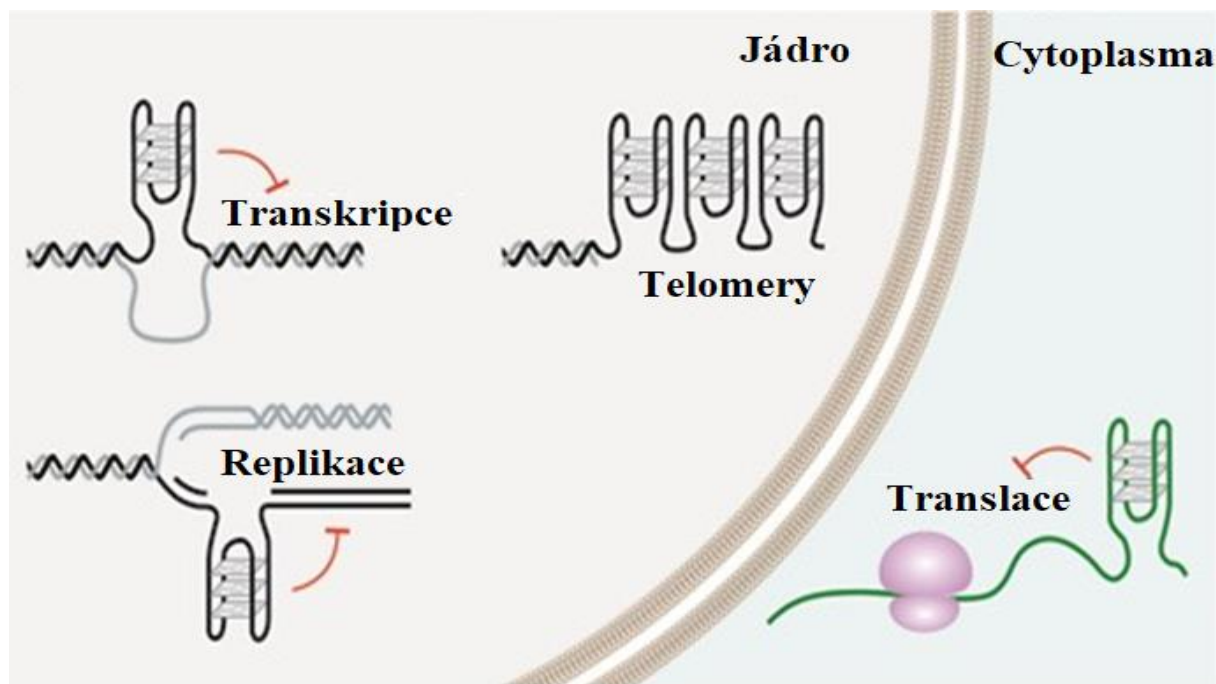
Obrázek 2.2.1: Struktura G-kvadruplexů. G-kvadruplexy jsou složeny ze dvou a více nad sebou položených rovinných G-tetrád stabilizovaných sodnými nebo draselnými monovalentními kationty. G-tetrády jsou tvořeny čtyřmi guaninovými bázemi, které jsou vzájemně spojeny nekovalentními vodíkovými vazbami dle Hoogsteenova párování (A). Struktury G-kvadruplexů jsou polymorfni a mohou zaujímat různé konformace v rámci jedné (intramolekulární) nebo více (intermolekulární) molekul [106].

2.2.2 Výskyt G-kvadruplexů v genomech organismů

Bioinformatické analýzy lidského genomu odhalily více než 300 000 sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu s konsenzuální sekvencí $G_{3+N_{1-7}G_{3+N_{1-7}G_{3+N_{1-7}G_{3+}}$ [14]. *In vivo* nevznikají G-kvadruplexy pouze z uvedené sekvence DNA [107], a tak jejich počet může stanovenou hodnotu významně převyšovat. Bylo prokázáno, že lokalizace struktur G-kvadruplexů není náhodná a mají významný vliv ve funkčních oblastech genomu. Vysoká konzervovanost struktur mezi různými druhy [108] naznačuje selekční tlak na sekvence s potenciálem tvorby G-kvadruplexu v přesně daných místech genomu. Nejvíce struktur s potenciálem tvorby G-kvadruplexů bylo nalezeno v genomech savců a jejich počet úměrně klesá s evolučním stářím organismů [109].

K formování struktury G-kvadruplexů z dsDNA může docházet během replikace, transkripce a v průběhu oprav DNA. Během těchto dějů dochází k rozrušení vodíkových vazeb Watson-Crickova párování, které umožní alternativní párování guaninových bází dle Hoogsteena [110, 111]. Dále je předpokládána tvorba struktur G4 jako důsledek působení tzv. superhelikálního stresu, molekulovým shlukem [112] a proteiny schopnými specificky vázat struktury G4 [113]. Ukazuje se,

že G4 by mohly sloužit jako místa rekombinace DNA. Pozitivní role struktur G4 *in vivo* není doposud dobře prostudována [114, 115]. Lokalizace struktur G-kvadruplexů v genomu je znázorněna na obrázku 2.2.2.



Obrázek 2.2.2: Umístění struktur G-kvadruplexů v rámci genomu. Struktury s potenciálem tvorby G-kvadruplexu byly identifikovány v oblastech promotorů a telomer. K tvorbě struktur G4 v buněčném jádře může dojít během transkripce, replikace a na jednovláknových převiscích DNA bohatých na guaninové báze. Mimo jádro mohou být struktury G4 tvořeny v mRNA a účastnit se translační kontroly. Jejich přítomnost během replikace, transkripce i translace může inhibovat daný proces (červené T-čáry) [106](upraveno).

2.2.2.1 G-kvadruplexy přítomné na telomerách

První výskyt G-kvadruplexů *in vivo* byl pozorován na telomerách DNA. Telomery se nachází na koncích lineárních chromozomů a tvoří specifické komplexy s proteiny. Vzniklé struktury brání poškození DNA při buněčném dělení, atacích nukleáz a při chromozomálním nehomologním spojování konců [116–118]. Telomerické G-kvadruplexy byly popsány na jednovláknových telomerních sekvencích několika organismů jako intramolekulární struktury párů guaninových bází [119] a jako guaninové tetrády mezi vlásenkovými smyčkami [120]. Později bylo prokázáno na modelech telomerické DNA, že na stabilizaci struktur G-kvadruplexů má významný vliv i přítomnost některých monovalentních kationtů [99].

Lidské telomery dosahují délky 5 000–10 000 bází a jsou tvořeny tandemovými repeticemi hexanukleotidu $d(\text{TTAGGG})_n$ [121]. Zatímco na koncích telomer se tvoří převážně intramolekulární struktury G4, na invazních komplexech T-smyček může docházet i k tvorbě struktur intermolekulárních [122, 123]. Intramolekulární struktury telomerních G-kvadruplexů mohou přijmout různé konformace. V prostředí draselných iontů to mohou být ekvilibrační struktury hybridního typu [124–130], dvoutetradové [131–133] a paralelní struktury [134]. V prostředí sodných iontů byly pozorovány G4 struktury košíkového typu [135]. G-kvadruplexy rovněž tvoří na koncích telomer

hybridní struktury nebo sbalené multimery [124, 136]. U vyšších eukaryot se ukazuje, že strukturní polymorfismus je vnitřní vlastností vysoce konzervované telomerické sekvence, zvláště pro sekvenci smyčky TTA [137]. Přestože jsou energetické rozdíly mezi jednotlivými telomerními G-kvadruplexy velmi nízké, vzájemný přechod mezi nimi je velmi pomalý a naznačuje tvorbu vysokoenergetického meziprojektu [124, 132, 138–140].

Oproti telomerám ve zdravých somatických buňkách, se telomery rakovinných buněk při replikaci nezkracují vlivem aktivace reverzní transkriptázy – telomerázy, která udržuje délku telomer a maligní fenotyp [141–143] jejich opětovným prodloužením na koncích chromozomů [141]. V nedávné době byl identifikován RNA G-kvadruplex, který obsahuje telomerickou repetici (TERRA; z angl. telomeric repeat-containing RNA), u kterého bylo prokázáno, že inhibuje činnost telomerázy [144, 145]. Rovněž bylo u RNA obsahující telomerní repetice prokázáno, že přijímají strukturu G4 s paralelním uspořádáním řetězců [146–148].

2.2.2.2 *G-kvadruplexy v promotorech genů*

G-kvadruplexy přítomné v sekvencích promotorů genů působí jako regulátory transkripce [149, 150]. Přítomnost struktur DNA, vzniklých ze sekvencí bohatých na guaninové báze, byla poprvé popsána v roce 1982 na základě hypersenzitivity prvků promotoru na nukleázu u genu pro kuřecí β -globulin [151–153].

Do současné doby byl potvrzen výskyt struktur G4 v lidských promotorech genů pro expresi inzulinu [154], c-MYC [150, 155], VEGF (cévní endoteliální růstový faktor; z angl. vascular endothelial growth factor) [156, 157], HIF-1 α (hypoxií indukovatelný faktor 1-alfa; hypoxia-inducible factor 1-alpha) [158], BCL-2 (lymfom B-buněk 2; z angl. B-cell lymphoma 2) [159–161], MtCK (mitochondriální kreatin kináza; z angl. mitochondrial creatine kinase) [162], K-RAS (protein genu *K-RAS* poprvé identifikován jako onkogen sarkomu způsobeného krysím virem Kirsten; z angl. Kirsten rat sarcoma virus) [163, 164], c-KIT (tyrosinkinázový receptor KIT) [165, 166], RET (receptorová kináza; z angl. rearranged during transfection) [167], PDGF-A (destičkový růstový faktor; z angl. platelet-derived growth factor) [168], c-MYB (protein z rodiny transkripčních faktorů MYB) [169], hTERT (lidská telomerázová reverzní transkriptáza; z angl. human telomerase reverse transcriptase) [170] a PDGF-R β [171, 172]. Rovněž byl prokázán potenciální výskyt G-kvadruplexů v promotorech genů, které jsou zapojeny do regulace růstu a proliferace buněk [149, 173, 174]. U všech těchto genů byly nalezeny úseky bohaté na guaninové nebo cytosinové báze v proximálních oblastech promotorů bez přítomnosti sekvence TATA. Potenciál pro tvorbu G-kvadruplexů je vyšší u onkogenů oproti genům pro represí nádorů [175]. Významný výskyt sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexů byl predikován v promotorových oblastech v blízkosti počátků transkripce [176]. Tvorba G-kvadruplexů v těchto oblastech je pravděpodobně indukována dynamickou negativní superhelicitou způsobenou transkripcí [177–180].

Sekvence tvořící v promotorech struktury G-kvadruplexů se vzájemně odlišují počtem a délkou G-traktů a intervenujícími guaniny na jednom G-traktu. Běžná je přítomnost více než čtyř G-traktů s nestejným počtem guaninů a tvorba více možných struktur G-kvadruplexů různou kombinací G-traktů a smyček [104]. G-kvadruplexy s třítetradovým jádrem nejčastěji přijímají paralelní konformace, které nejsou uniformní a odlišují se různým vedením smyček a vazbou čepičky v závislosti na konkrétní sekvenci [181–184]. Pro promotorové G4 je charakteristická převaha motivu G₃NG₃, který obsahuje robustní paralelní vlákno se strukturním motivem smyčkové vrtule o délce

jednoho nukleotidu. Dosud se experimenty zaměřené na vliv G4 v promotorech zaměřovaly nejvíce na promotor genu *c-MYC* [150, 151], u kterého byl motiv G₃NG₃ poprvé pozorován [183], a ve kterém je daný motiv přítomen v repetici, přičemž z obou motivů G₃NG₃ promotoru *c-MYC* mohou vznikat struktury G4 mezi nimiž se nachází dlouhá střední smyčka [161, 185, 186]. Vysoce konzervovaná oblast bohatá na G v proximální oblasti promotoru *c-MYC* označovaná jako III₁ vykazuje vysokou konformační dynamiku [187]. Tvorba struktur G4 v této oblasti indukuje represí transkripce [150, 155] a řídí 80–90 % transkripční aktivity genu *c-MYC* [188–191].

Byly pozorovány struktury G-kvadruplexů s přerušným řetězcem [192, 193], vloženým koncem [194] nebo dalšími konformacemi vlásečkové smyčky [161, 170]. Struktury G4 mohou vznikat na samostatných oblastech i v rámci jedné překrývající se oblasti. V proximální oblasti promotoru genu *BCL-2* jsou přítomny dvě oblasti označované jako Pu39 a P1G4, které jsou vzájemně odděleny 13 nukleotidy. V oblasti Pu39 se mohou tvořit dvě konkurenční struktury G4, a to hybridní [159, 195] a paralelní [186], zatímco v oblasti P1G4 se mohou tvořit dva rovnovážné paralelní G4 [161]. Podobný jev se vyskytl i u promotoru genu *K-RAS* [163, 164, 196–198], *c-KIT* [165, 166, 192, 199, 200], *PDGFR-β* [171, 172, 193, 194] a *hTERT* [170, 201–203].

Různé variace G-kvadruplexů v promotorových oblastech mohou být specificky rozpoznány proteiny nebo ligandy, jejichž vazba následně poskytuje další úroveň modulace transkripce stejně tak jako inherentní polymorfismus a rovnováha mezi jednotlivými konformacemi [174].

2.2.2.3 G-kvadruplexy v dalších oblastech lidského genomu

Kromě již výše zmíněných promotorů genů a oblastí telomer, byly G-kvadruplexy nalezeny i v jiných oblastech lidského genomu, jako např. v oblastech přepínající třídy imunoglobulinů [204–206], ribozomální [207], mitochondriální DNA [208–211], v oblastech iniciace replikace [212] nebo v retrotransposou LINE-1 [213–215]. Mimo DNA mohou být G4 tvořeny i v molekule RNA, kde mohou zapříčinit inhibici translace. G4 se tvoří v RNA intronech a regulují aktivní sestřih genů jako je *TP53* [216] nebo *Bcl-XL* [217]. Rovněž byly objeveny hybridní DNA:RNA G4 vznikající během procesu transkripce [218], nebo v sekvencích rozšířených repetit u neurodegenerativních onemocnění, příp. jako repetice (CGG)_n v 5'-UTR genu *FMR1* (messengerový ribonukleoprotein fragilního X; z angl. fragile X messenger ribonucleoprotein 1) u tzv. syndromu fragilního X (FXS; z angl. fragile X syndrome) [219, 220]. V posledních letech se ukazuje, že struktury G4 se podílejí na nestabilitě genomu a poškození DNA [221–223]. Hexanukleotidová repetice (GGGGCC)_n byla detekována v genu *C9orf72* (otevřený čtecí rámec 72 chromosomu 9; z angl. chromosome 9 open reading frame 72) u amyotrofické laterální sklerózy a frontotemporální demence [224].

2.2.2.4 Další výskyt G-kvadruplexů v biologických systémech

G-kvadruplexy byly identifikovány i v genomech dalších organismů a lidských patogenů. Stejně jako v lidském genomu, byla u dalších biologických systémů tvorba G4 spojena s regulací buněčných dějů. Výskyt G4 byl ve významné míře detekován u lidských patogenů [225], zvláště pak u virů jako jsou herpesviry [226–228], virus lidské imunodeficiency (HIV) [229–232], virus hepatitidy, virus lidského papilomaviru [233], virus těžkého akutního respiračního syndromu (SARS; z angl. severe acute respiratory syndrome) [234] nebo viry Zika [235] a Ebola [236]. Kromě virových genomů byly G4 identifikovány rovněž v genech bakterií *Escherichia coli* [237], *Neisseria gonorrhoeae* [115],

Neisseria meningitidis [238], *Mycobacterium tuberculosis* [239] a *Deinococcus radiodurans* [227] nebo v genomech nálevníků [99], parazitů malárie [240, 241] a v rostlinných genomech [242].

2.2.3 Interakce proteinů s G-kvadruplexy

Proteiny schopné interagovat se strukturami G-kvadruplexů jsou děleny do tří skupin, a to na proteiny vazebné, stabilizující a proteiny schopné rozplétat struktury G4 (helikázy BLM, WRN helikáza Wernerova syndromu; z angl. Werner syndrome helicase), BRIP1/FANCI (protein Fanconiho anémie skupiny J; z angl. Fanconi anemia group J protein) a PIF1 (ATP dependentní DNA helikáza PIF1; z angl. ATP-dependent DNA helicase PIF1) [243]. Mutace nebo úplná absence exprese těchto proteinů vede ke změnám v tvorbě struktur G4, které mohou indukovat transkripční změny v biologických drahách a zvyšovat nestabilitu genomu [107, 244–247].

Identifikace proteinů specificky regulujících tvorbu a rozvíjení struktur G-kvadruplexů poskytla pohled na výskyt a funkci G4 *in vivo*. Kinetika skládání struktur G-kvadruplexů je závislá na sekvenci DNA a pohybuje se v řádech milisekund až minut. Lidské telomerické repetice jsou schopny se formovat do struktury G4 rychlostí replikace DNA [248]. Rychlost formování G4 může být výrazně navýšena zapojením chaperonů [249], jak bylo prokázáno u vazebného proteinu telomerické DNA Rap1 kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [250] a regulační podjednotky kvasinkové telomerázy Est1 (telomerázový elongační protein EST1; z angl. telomere elongation protein EST1) [251] nebo lidského telomerického vazebného proteinu TRF2 (vazebný faktor telomerické repetice; z angl. telomeric repeat binding factor 2) [252]. V závislosti na buněčném cyklu je tvorba telomerických G4 regulována proteinem TEBPβ (protein vázající konce telomer; z angl. telomere end-binding protein) [253]. Struktury G4 se formují rovněž v některých oblastech ribozomální DNA. G4 ribozomální RNA interaguje s nukleofosminem NPM1 (z angl. nucleophosmin 1) podílejícím se na zrání a translokaci ribozomů.

Helikázy schopné rozvíjet struktury G-kvadruplexů hrají zásadní roli při udržování stability chromozomů, sestřihu mRNA a podpoře translace. Přestože bylo prokázáno, že změny některých helikáz, které interagují se strukturami G-kvadruplexů, jsou spojeny s tumorigenezí a progresí rakovinného bujení, nebyla prokázána souvislost mezi mutacemi helikáz ve spojitosti s tvorbou G-kvadruplexů [243]. Helikáza kvasinek *Saccharomaces cerevisiae* Sgs1 (supresor pomalého růstu; z angl. slow growth suppressor 1) a lidské helikázy WRN (helikáza Wernerova syndromu; z angl. Werner syndrome helicase) a BLM se podílejí na udržování telomer a obsahují konzervovanou doménu RQC, která váže struktury G4 s vysokou afinitou [113]. Jejich mutace je spojena s výskytem závažných onemocnění jako je Wernerův (mutace WRN) a Bloomsův syndrom (mutace BLM), které vedou k předčasnému stárnutí a zvýšenému riziku vzniku rakoviny. Další lidská helikáza FANCI (protein Fanconiho anémie skupiny J; z angl. Fanconi anemia group J protein) je spojována s inklinací k rozvoji Fanconyho anémie [221, 244, 246].

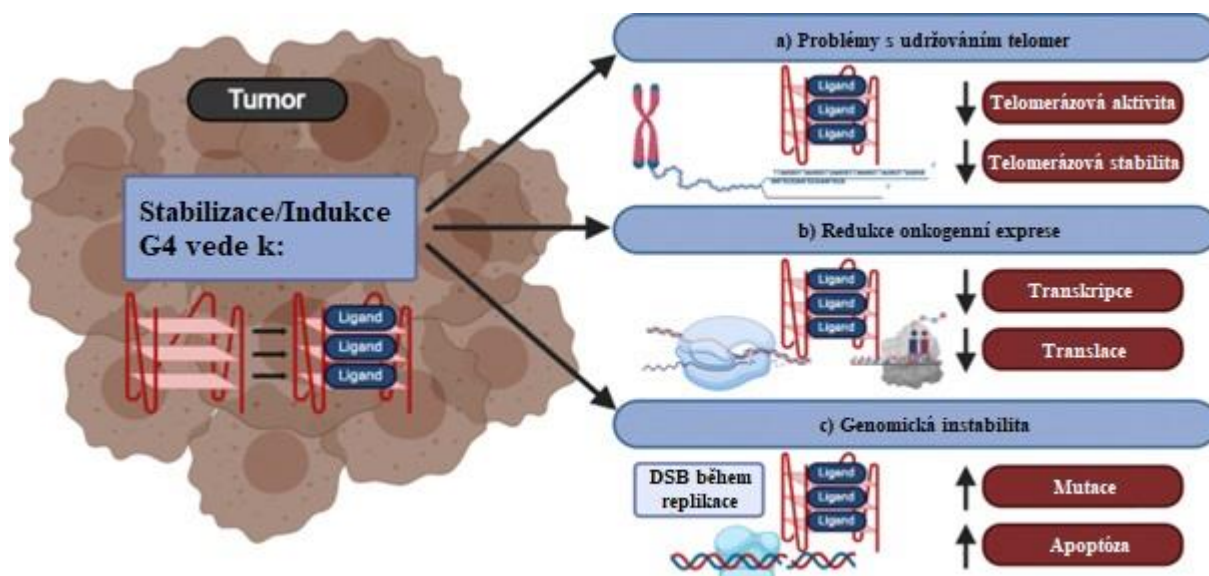
Při absenci helikáz schopných rozplétat struktury G-kvadruplexů, působí na G4 řada nukleáz, jejichž aktivita vede k delecím G-traktů. Schopnost štěpit G-kvadruplexní struktury *in vitro* byla prokázána u lidských nukleáz FEN1 (endonukleasa chlopně 1; z angl. flap endonuclease 1), EXO1 (exonukleasa 1; z angl. exonuclease 1) a DNA2 (ATP-dependentní helikáza/nukleáza DNA2 replikující DNA; z angl. DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2) [254] nebo kvasinkové Kem1 (kvasinková exonukleáza XRN1) [255]. K rozplétání G4 napomáhá

i jednovláknový replikační protein RPA (z angl. replication protein A), který se podílí na udržování telomer posunem rovnovážného stavu složené struktury G4 do stavu nesloženého [256].

2.2.4 G-kvadruplexy ve vztahu k léčbě rakoviny

V posledních několika letech byly G-kvadruplexy pro svou strukturální stabilitu a přítomnost ve většině lidských onkogenních promotorů a telomerech DNA studovány jako slibné potenciální cíle při léčbě rakoviny. Individuální zacílení nádorových buněk prostřednictvím struktur G4 a jejich stabilizace by mohly v budoucnu podporovat rozvoj personalizovaných léčebných přístupů [257]. Ve většině případů se výzkumy zaměřovaly na tvorbu a možnou stabilizaci struktur G-kvadruplexů prostřednictvím G4 ligandů [258–260].

Použití většiny G4 ligandů vede ke zpomalení růstu rakovinných buněk. Tyto změny v buněčném růstu nastávají v důsledku změn v biologických procesech buněk. Doposud bylo identifikováno kolem 1 000 různých G4 ligandů, které se vzájemně liší svou specifitou, vazebným povrchem a buněčnou permeabilitou [261, 262]. Některé G4 ligandy jsou schopny cílit na více struktur G-kvadruplexů v rámci celého genomu nebo interagovat i s jinými nekanonickými strukturami DNA jako je např. i-motiv. Tento jev byl pozorován u G4 ligandu BRACO19 [263, 264]. To naznačuje, že některé účinky stabilizace G4 pozorované *in vivo* mohou být indukovány jinými metabolickými vlivy a vyvolává otázky kolem vazebných preferencí a selektivity G4 ligandů. I přes velmi slibné výsledky nebylo dosud schváleno použití G4 ligandů v klinických aplikacích a probíhají intenzivní výzkumy s cílem jejich charakterizace a selektivního cílení na specifické struktury G4 s minimálními vedlejšími účinky, ale vysokou protinádorovou aktivitou [265, 266]. V současné době jsou známy tři možné přístupy, které využívají struktury G4 při léčbě rakovinných onemocnění [257]. Schematicky jsou tyto přístupy znázorněny na obrázku 2.2.3.



Obrázek 2.2.3: Schématické znázornění účinků G4 ligandů na rakovinné buňky [257] (upraveno).

Jedním z možných přístupů použití G4 ligandů je blokování aktivity telomerázy prostřednictvím tvorby a stabilizace G4. U 85–90 % všech rakovinných buněk je aktivita telomerázy upregulována.

To znamená, že u dělících se rakovinných buněk nedochází ke zkracování telomer, jako tomu je u zdravých buněk [142], ale jsou vlivem telomerázy opětovně obnovovány. Absence tohoto regulačního mechanismu dělení buněk umožňuje rakovinným buňkám jejich nekontrolovatelné dělení. Bylo prokázáno, že tvorba struktury G-kvadruplexu na telomerách má vliv na vazbu telomerázy a blokuje její aktivitu jak *in vitro* [267], tak *in vivo* [268–270]. Blokování telomerázové aktivity by tak mohlo bránit nekontrolovatelné replikaci DNA u nádorových buněk. Výhodou tohoto přístupu je, že zdravé somatické buňky neexprimují telomerázu, takže by nedocházelo k jejich ovlivnění.

Výzkumy zabývající se stabilizací G-kvadruplexů na telomerách rakovinných buněk byly prováděny s využitím různých typů ligandů [271], z nichž většina způsobovala snížený růst rakovinných buněk v důsledku ovlivnění různých faktorů udržování telomer [271, 272]. Již byly provedeny experimenty, které využívaly při léčbě rakovinných buněk G4 ligand Telomestatin [273] nebo deriváty 2,6-diamidoanthrachinonu. Při současném ošetření rakovinných buněk G4 ligandy RHPS4 a inhibitory PARP1 GPI-15427 dochází k výraznějšímu snížení růstu buněk než v případě použití samotného ligandu RHPS4, což ukazuje na významný potenciál tohoto léčebného přístupu [274]. Nově se zvažuje i použití specifické skupiny G4 ligandů, které působí jako fotosenzibilizátory k usnadnění fotodynamické terapie [275]. Fotosenzibilizátor je schopen specificky zacílit nádorové buňky a indukovat zvýšenou produkci ROS (radikály kyslíku; z angl. oxygen-containing reactive species) po fotoozaření. Zvýšená produkce ROS má za následek zvýšení cytotoxického účinku pro nádorové buňky a tím i inhibici jejich růstu a množení. Dobře známé fotosenzibilizátory využívané při fotodynamické terapii jsou porfyriny. Jedny z možných příkladů porfyrinových derivátů cílících na telomerické G-kvadruplexy jsou TMPipEOPP [276] a ZnP1 [277]. V případě TMPipEOPP dochází po fotoindukci ke štěpení míst, která ligand váže, což vede ke zvýšení hladiny ROS a následně k buněčné smrti [276]. ZnP1 oproti tomu tvoří singletový kyslík, který následně řídí štěpení a produkci ROS, což v konečném důsledku opět vede k buněčné smrti [277].

Druhým možným přístupem protirakovinné terapie je ovlivnění genové exprese onkogenů [105, 266, 278, 279]. Bylo prokázáno, že většina promotorů onkogenů obsahuje více motivů G-kvadruplexů, než tomu je u promotorů regulačních nebo tumorsupresorových genů [105, 280]. Rovněž bylo prokázáno, že změny v tvorbě struktury G4 v promotorech korelují se snížením genové exprese jako je tomu např. u genů *MYC* [150], *VEGF* [156], *BCL2* [160], *KRAS* [164] a *KIT* [165, 211, 281]. Zvláštní pozornost byla věnována zejména změnám v G4 struktuře genu *MYC* [150, 281], který kóduje transkripční faktor *MYC* řídící onkogenezi změnou buněčné proliferace a imunitním únikem [282–284], a který je upregulován u 70 % všech výskytů rakoviny [282]. Tvorbou struktur G4 v promotoru genu *MYC* by bylo možné regulovat jeho expresi [150, 281, 285]. Nevýhodou tohoto přístupu je neselektivnost řady dostupných ligandů indukujících tvorbu G4. Přestože tak při jejich použití dochází ke snížení exprese genu *MYC* a dalších onkogenů [142, 286], nelze zatím s určitostí říci, zda nedochází při jejich použití ke snížení růstu nádorových buněk v důsledku jiného mechanismu [287].

Za určitých podmínek může tvorba struktur G-kvadruplexů zvyšovat nestabilitu genomu [288, 289]. Tvorba G-kvadruplexů na nevhodných místech genomu, nebo v nesprávném okamžiku vede ke změnám v replikaci, poškození a rekombinaci řetězců DNA [290–292]. Zvýšená mutagenita vyvolaná tvorbou struktur G-kvadruplexů byla pozorována zejména u buněk, bez funkčních helikáz schopných G4 struktury rozplétat [244, 293–296]. Protirakovinná léčba využívající

ligandy ke stabilizaci G-kvadruplexů umožňuje stimulaci tumorigeneze a navození tvorby některých genetických a epigenetických změn, které byly u mnoha případů výskytu rakoviny pozorovány [257]. Při léčbě G4 ligandy dochází k aktivaci kontrolního bodu poškození DNA prostřednictvím ATM (serin/threonin kinasa ATM; z angl. ataxia-telangiectasia mutated), stejně tak jako ke zvýšení dysfunkčnosti telomer. Zvýšení nestability genomu lze využít k indukci apoptózy a autofagii nádorových buněk [245, 297–299, 300]. Jedním z ligandů, u kterého byla prokázána upregulace genů spojených s apoptózou a autofagií, byl G4 ligand 20A [299]. Dalších slibných výsledků bylo dosaženo u buněk deficientních na homologní rekombinaci s využitím ligandu PDS. Stabilizací struktur G4 docházelo ke zpomalení růstu, dvouvláknovým zlomům na molekule DNA, zvýšení křehkosti telomer a aktivaci kontrolních bodů [300]. Zvýšení nestability genomu indukuje zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M a buněčnou smrt [301]. Kromě ligandu PDS cílí na buňky deficientní k homologní rekombinaci i G4 ligand CX-5461 [302, 303], který způsobuje tvorbu DNA zlomů inhibicí topoizomerázy II [304]. Použití PDS spolu s inhibitorem PRKDC NU7441 vede k poruchám růstu PRKDC (DNA-PK), který se významně podílí při mechanismu nehomologního spojování konců [305], což ukazuje na využití G4 ligandů v kombinaci s terapiemi poškození DNA. Při použití G4 ligandů PDS, CX-5461 nebo CX-3543 v kombinaci s činidly poškozujícími DNA dochází k urychlení cytotoxického účinku [90] zvláště u gliomových buněk s deficitem helikázy ATRX (regulátor transkripce ATRX také známý jako ATP-dependentní helikáza ATRX, nebo X-vázaná helikáza II; z angl. ATP-dependent helicase) [296, 306–308].

2.3 Vybrané metody vhodné pro charakterizaci struktur G-kvadruplexů a studium interakcí proteinů s DNA

Detekované G-kvadruplexy v buňkách tvoří méně než 1 % genomových míst, která byla predikována s využitím bioinformatických analýz nebo identifikována pomocí G4-seq [309]. První přímá identifikace struktury G4 *in vivo* byla provedena na telomerách nálevníka *Stylonychia lemnae* s využitím specifického jednořetězcového variabilního fragmentu protilátky (scFv) [310]. Endogenní potenciální místa výskytu G4 byla detekována v lidských živých buňkách tzv. chemickým otiskem spolu s vysoce výkonným sekvenováním [311]. Pro charakterizaci sekundárních struktur G-kvadruplexů *in vitro* jsou využívány např. nukleární magnetická rezonance [25], spektroskopie cirkulárního dichroismu [27], analýzy křivek tání [312] nebo elektroforetický test posunu mobility [313–317]. Řadu těchto metod je možné využít rovněž ke sledování interakcí proteinů s DNA. V následujících podkapitolách budou blíže představeny metody použité v této diplomové práci.

2.3.1 Spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD spektroskopie)

V současné době je metoda spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD spektroskopie; z angl. circular dichroism spectroscopy) jednou z nejpoužívanějších metod ke studiu různých konformací G-kvadruplexů [318, 319]. Cirkulární dichroismus je jev, ke kterému dochází při průchodu lineárně polarizovaného světla opticky aktivními materiály, které ho absorbují. Opticky aktivní materiály obsahují chirální molekuly, které otáčí rovinu polarizovaného světla díky různým indexům lomu levé a pravé kruhově polarizované složky. V důsledku toho dochází k optické rotaci. Jestliže daná chirální molekula absorbuje světlo, jsou obě složky absorbovány různou měrou a dochází ke změně charakteru

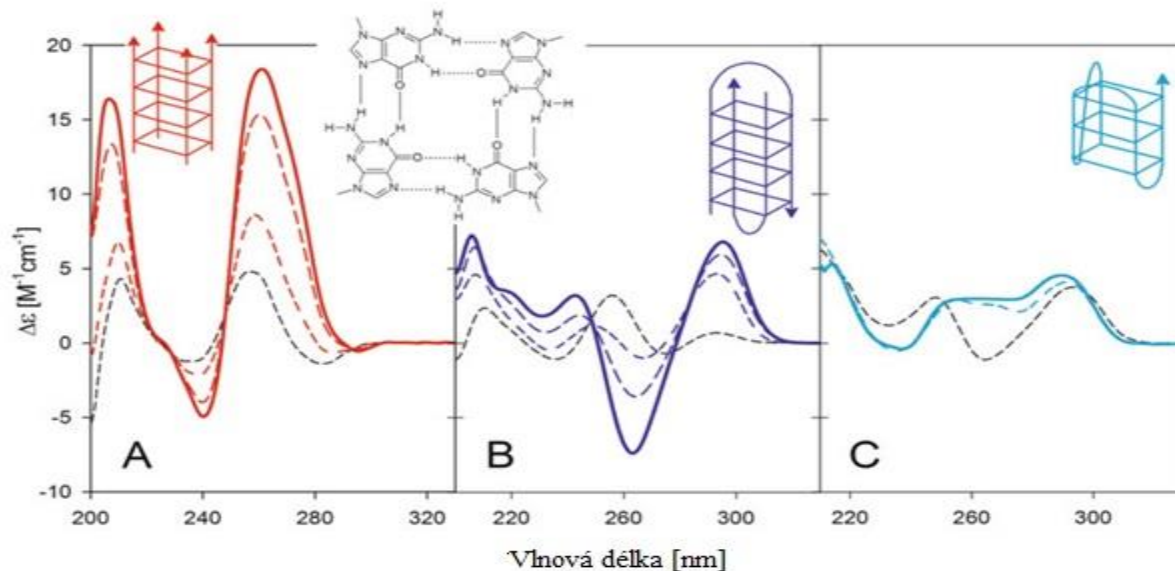
světla z původního lineárně polarizovaného na světlo elipticky polarizované. Rozdíl v absorpci levého a pravého kruhově polarizovaného světla bývá označován jako cirkulární či kruhový dichroismus. Kruhový dichroismus je vyjádřen vztahem (1):

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L \cdot \varepsilon_R \quad (1)$$

kde ε_L a ε_R označují molární absorpční koeficienty dvou složek světla. Další měřenou veličinou bývá tzv. elipticita, která vyjadřuje úhel, jehož tečna tvoří poměr mezi hlavní a vedlejší osou elipticky polarizovaného světla [27].

Při analýze DNA metodou cirkulárního dichroismu dochází k absorpci světla prostřednictvím dusíkatých bází nukleových kyselin a chiralita vzorku je dána přítomností asymetrického uhlíku deoxyribózy C10. Běžně jsou CD spektra měřena v rozsahu vlnových délek 200–330 nm, které spadají do UV oblasti světelného spektra. DNA může na základě sledu dusíkatých bází a jejich vzájemného párování vytvářet různé sekundární struktury, které se odlišují od B-formy DNA (model Watsona a Cricka). Tyto nekanonické struktury se vzájemně odlišují párováním bází, počtem a vzájemnou orientací oligonukleotidových řetězců a vinutím šroubovice.

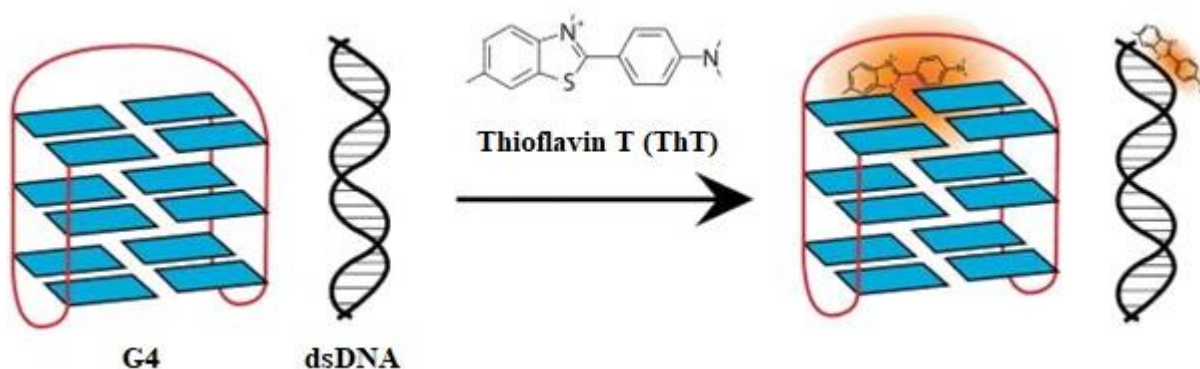
Při studiu sekundárních struktur DNA je hlavním zdrojem chiralidy skladba absorbujících základů do asymetrických šroubovicových uspořádání. Pro každou z těchto struktur jsou známa charakteristická CD spektra. I přes širokou škálu různých konformací G-kvadruplexů [318] rozlišujeme dva základní typy CD spekter (paralelní a antiparalelní), které odrážejí orientaci vláken ve struktuře G4. CD spektroskopie byla první metoda s predikcí tvorby hybridní struktury G-kvadruplexu (3 + 1), která se vytváří v oblasti lidských telomer [320], a jejíž tvorba byla později potvrzena nukleární magnetickou rezonancí [124, 128]. CD spektra základních topologií G-kvadruplexů jsou uvedena na obrázku 2.3.1.



Obrázek 2.3.1: CD spektra paralelní, antiparalelní a hybridní struktury G-kvadruplexu. Přerušovaně jsou vyznačeny CD spektra struktur stabilizovaných v prostředí pufrů o různé koncentraci stabilizujících iontů. Paralelní struktura G-kvadruplexu vykazuje na CD spektrech výrazné pozitivní píky při vlnových délkách 210 a 260 nm a negativní pík při vlnové délce 240 nm (A). Antiparalelní struktura G-kvadruplexu je charakteristická pozitivními píky při vlnových délkách 210, 240 a 295 nm a negativním píkem při 260 nm (B). Hybridní struktura G-kvadruplexu nevykazuje žádný negativní pík, ale nabývá pozitivních píků při vlnových délkách 210, 260 a 295 nm (C) [27] (upraveno).

2.3.2 ThT fluorescenční vazebný test

ThT fluorescenční vazebný test je metoda využívaná pro rychlou detekci sekundárních struktur G-kvadruplexů za použití G4 ligandu Thioflavinu T (ThT; z angl. thioflavin T). ThT je benzothiazol, který byl použit k identifikaci amyloidních fibril, a u něhož byla prokázána schopnost rozpoznání lidského telomerického motivu G-kvadruplexu [321]. Thioflavin T je při experimentech smíchán přímo s analyzovanými vzorky DNA a po excitaci vzorků při 425 nm je sledována emise fluorescence při 490 nm, která je přepočtena vzhledem k intenzitě fluorescence samotného pufru s ThT. Experimenty zabývající se studiem Thioflavinu T jako spolehlivé G4 sondy byly provedeny na různých strukturách DNA (G-kvadruplexy, duplexy, ssDNA, triplexy). U všech sekvencí, které prokazatelně tvořily struktury G-kvadruplexů s výjimkou TBA, byla naměřena významná intenzita fluorescence, stejně tak jako u duplexu s paralelním řetězcem, triplexu a oligothymidylátu. ThT testem byla rovněž potvrzena přítomnost struktur G-kvadruplexů aptamerů s dosud nedefinovanou strukturou. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek oligonukleotidu c-myc, který prokazatelně formuje strukturu G4, a jehož signál odpovídal průměrnému signálu detekovanému při předcházejících experimentech. Jako negativní kontrola byl použit duplex ds26. V provedeném experimentu dosahovaly všechny studované sekvence vyššího signálu, než ds26 a v případě tří vzorků aptamerů byla intenzita fluorescence dokonce vyšší než u samotné pozitivní kontroly. ThT se tak ukázal jako spolehlivá G4 sonda, což potvrdila i následná charakterizace sledovaných vzorků IDS a 1D nukleární magnetickou rezonancí [25]. Princip ThT testu je schematicky znázorněn na obrázku 2.3.2.

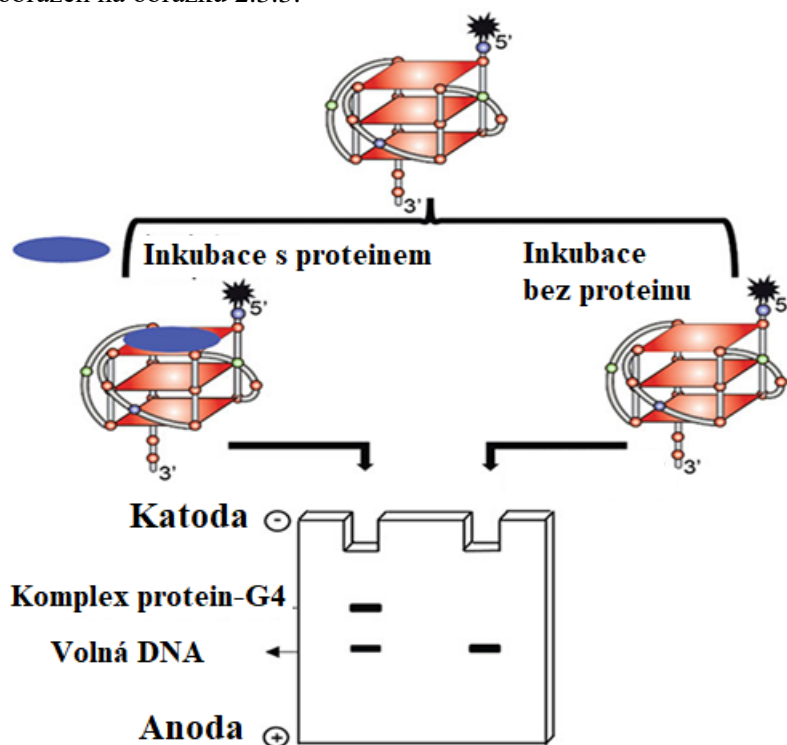


Obrázek 2.3.2: Princip ThT testu. Thioflavin T se specificky váže na struktury tvořící G-kvadruplexy a emituje vyšší signál fluorescence, než při vazbě na jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou molekulu DNA [25] (upraveno).

2.3.3 Test posunu elektroforetické mobility (EMSA)

Test posunu elektroforetické mobility (EMSA; z angl. electrophoretic mobility shift assay) bývá hojně využíván pro studium interakce DNA-protein. Jedná se o jednu z nejcitlivějších a nejrobustnějších metod, která může být použita i pro stanovení vazebných parametrů a relativních afinit proteinu ke strukturám G-kvadruplexů [313–317]. Metoda je vhodná i při studiu triplexní, vlásenkové nebo kruhové DNA [322]. Princip metody spočívá v rozdílné elektroforetické mobilitě molekul při separaci na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu v závislosti na jejich velikosti a náboji [323]. Komplexy protein-DNA nebo intermolekulární struktury DNA vykazují nižší

elektroforetickou mobilitu, než molekuly volné DNA nebo struktury intramolekulární. Princip EMSA je schematicky zobrazen na obrázku 2.3.3.



Obrázek 2.3.3: Schéma elektroforetického testu posunu mobility. Vazbou proteinu na molekulu DNA nebo RNA dochází k tvorbě komplexu, který je oproti samotné molekule nukleové kyseliny větší. Komplex kvůli větší velikosti putuje při separaci v gelu pomaleji, než molekuly samotné DNA a RNA [324] (upraveno).

Metoda je vysoce citlivá, zvláště při použití radioizotopově značených nukleových kyselin a funguje s purifikovanými proteiny, ale i surovými buněčnými extrakty [323]. Další výhodou je nízká spotřeba biologického materiálu (nukleových kyselin a proteinů) [322]. Při nižších nárocích na citlivost metody je možné využít řadu kovalentních i nekovalentních fluoroforů [325, 326] a biotinem [327] značené sondy. Rovněž byly popsány metody pro získání zdánlivých rovnovážných konstant vazebných reakcí [328]. Strukturu DNA v komplexu DNA-protein lze dále studovat metodou zvanou DMS (dimethylsulfid; z angl. dimethyl sulfide) *footprinting*. DMS *footprinting* umožňuje měřit relativní reaktivity jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA s využitím DMS. Tyto informace mohou dále sloužit ke strukturální charakterizaci DNA [329]. Methylace DMS probíhá na N₇ guaninových (N₇-methylguanin) a N₃ (N₃-methyladenin) adeninových nukleotidech [329, 330]. Methylocí purinů dochází k destabilizaci glykosidické vazby, což v alkalickém prostředí při vysokých teplotách (více než 90 °C) vede k jejímu lomu a štěpení cukr-fosfátové kostry [330, 331]. Methylace guaninových bází probíhá pětkrát rychleji než methylace bází adeninu. Rozdíl v rychlosti methylace bází se při separaci fragmentů generovaných DMS s konci značenými ³²P projeví přítomností tmavších pruhů (bandů) [330, 332]. Metoda poskytuje zásadní informace pro existenci sekundárních struktur a jiných specifických konstrukčních prvků a umožňuje identifikovat dynamické oblasti molekul nukleových kyselin a přítomnost více typů konformací [158, 161, 333–336]. DMS *footprinting*

Lze rovněž použít při studiu komplexů s navázanými ligandy nebo proteiny, čímž je možné identifikovat změny v konformaci struktury po vazbě ligandu [172, 337].

2.3.4 Kvasinkové reportérové testy

Kvasinkové reportérové testy jsou funkční testy, které byly vyvinuty na základě zjištění, že savčí protein p53 se může ve vhodně modifikovaných kvasinkových kmenech chovat jako transkripční faktor. Kvasinkové testy jsou využívány pro studium vlivu malých molekul, koexprimovaných proteinů a mutací genu *TP53* na transkripční potenciál proteinu p53. Reportérové testy umožňují rovněž sledovat vazebnou a transkripční specifitu ektopicky exprimovaných proteinů [338]. To z nich dělá vynikající nástroj pro sledování vazby proteinu IFI16 na sekvence s rozdílným potenciálem tvorby G-kvadruplexu a vlivu této vazby na transkripční potenciál proteinu p53 *in vivo*.

Reportérové kmeny jsou isogenní kvasinkové kmeny lišící se pouze v sekvenci responzivního elementu. Responzivní elementy jsou cis-působící elementy o délce několika bází nukleotidů (zpravidla 6–10), které jsou specificky rozpoznávány transkripčními faktory [339]. Transkripční faktory spolu s příslušnými druhy kofaktorů umožňují nábor a modulaci RNA polymeráz během procesu transkripce [340]. Pro studium mechanismů působení lidských transkripčních faktorů je jako modelový organismus využívána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* [341–343]. *Saccharomyces cerevisiae* umožňuje snadnou editaci genomu a rychlou konstrukci kvalitativních nebo kvantitativních reportérových systémů. Ektopická exprese proteinu p53 je umožněna díky široké škále dostupných regulačních systémů. Vektor pro expresi proteinu p53 může obsahovat indukovatelný, represibilní nebo konstitutivní promotor [344–346]. Zatímco vektor s konstitutivním promotorem exprimuje sledovaný protein nepřetržitě, indukovatelný GAL1 promotor umožňuje bazální nebo variabilní expresi proteinu v závislosti na koncentraci galaktózy v médiu [338].

Konstrukce reportérových kmenů zahrnuje editaci genomu metodou *Delitto Perfetto* a vhodnou adaptaci [347–350]. Běžně jsou užívány reportérové geny *URA3* (gen pro orotidin 5-fosfát dekarboxylázu), *HIS3* (gen pro imidazolglycerol-fosfát dehydratázu) a *ADE2* (gen pro fosforibosylaminoimidazolkarboxylázu), které jsou pro selekci mutovaných kvasinkových kmenů nezbytné, protože indukují prototrofii na adenin (*ADE2*) a aminokyseliny uracil (*URA3*) a histidin (*HIS3*) [338]. Expresí mutovaného reportérového genu *URA3* jsou kvasinkové kmeny pozitivně selektovány na přítomnost kyseliny 5-fluoroorotové. Jestliže buňky exprimují funkční gen *URA3*, dochází v přítomnosti kyseliny 5-fluoroorotové k tvorbě toxického produktu [351]. Reportér *ADE2* kromě selekce umožňuje rovněž kvalitativní rozlišení kvasinkových kolonií exprimujících divoký typ proteinu p53 (bílé kolonie i na pevném médiu s minimem adeninu) od buněk s expresí mutovaného nebo poškozeného proteinu p53. U homologu proteinu p53 s mutovaným systémem pro expresi *ADE2* dochází k akumulaci meziproductu P-ribosylamino-imidazolu v biosyntetické dráze adeninu. Hromadící se meziproduct se přeměňuje na červený pigment, který barví kvasinkové kolonie do růžova příp. červena. Reportérový gen *ADE2* byl v minulosti kombinován i s reportérem *lacZ*. Výsledný systém umožňoval subklasifikaci mutantních forem proteinu p53 dle úrovně jejich zbytkové funkčnosti [352]. Později byl do reportérových kvasinkových kmenů zaveden i gen *LUC1* (gen pro produkci luciferázy) pro kvantitativní charakterizaci transkripčního potenciálu odvozený od *Photinus pyralis*, (světluška velká) [347, 353]. Všechny výše zmíněné systémy umožnily jemnou klasifikaci alel proteinu p53 spojených se zárodečnými mutacemi [17–19] a rakovinou [354–356].

Nevýhodu kvasinkových reportérových testů představují zpomalený růst, zástava buněčného cyklu [357, 358] a buněčná smrt [359], k nimž dochází při zvýšené expresi proteinu p53, který moduluje transkripci endogenních kvasinkových genů zapojených do buněčného růstu [338].

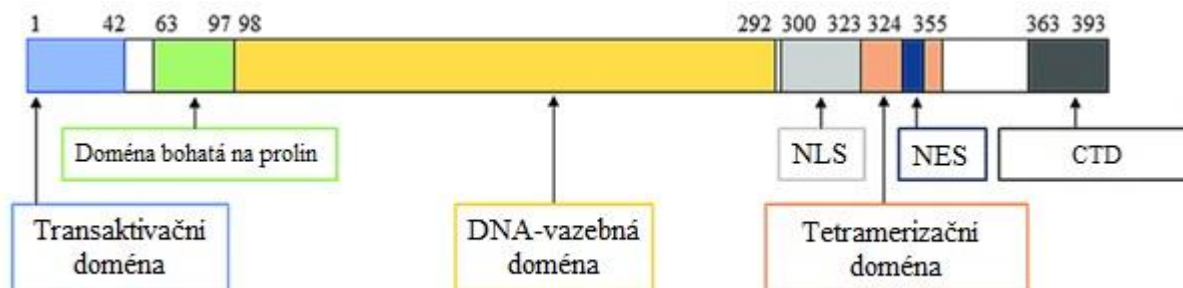
2.4 Protein p53

Protein p53 je savčí nádorový supresor a jeden z nejvíce studovaných sekvenčně specifických transkripčních faktorů. Protein p53 se podílí na kontrole stability genomu, indukci apoptózy, regulaci buněčného cyklu, angiogenezi a buněčném stárnutí. Exprese jeho mutantní formy byla zaznamenána v mnoha případech výskytu rakoviny [360–362]. Rovněž je protein p53 schopen modulovat procesy autofagie, signalizaci mTOR (proteinkináza; z angl. mammalian target of rapamycin), buněčnou mobilitu a migraci, metabolismus aminokyselin nebo imunitní reakce [361–364]. Ke správné funkci proteinu p53 je nezbytná přísná regulace jeho exprese [363, 365].

Protože kvasinkové reportérové testy použité v této práci ke studiu interakce proteinu p53 s DNA *in vivo* využívají schopnost proteinu p53 působit v isogenním kvasinkovém systému jako transkripční faktor, budou v následujících podkapitolách popsány jeho základní vazebné, strukturální a biologické vlastnosti.

2.4.1 Struktura proteinu p53

Správná konformace proteinu p53 je nezbytná pro vhodnou regulaci jeho biologických funkcí. Protein p53 je flexibilní biomolekula tvořená oligomerním čtyř shodných polypeptidových řetězců [366]. Každý monomer proteinu p53 je rozdělen do pěti domén, které se vzájemně liší svým složením, strukturou a funkcí. Každá z těchto oblastí obsahuje místa, jejichž mutace se vyskytují u několika typů rakoviny [367]. Schematicky znázorněná struktura monomeru proteinu p53 je popsána na obrázku 2.4.1.



Obrázek 2.4.1: Schematické znázornění struktury monomeru proteinu p53. Protein je popsán od N-terminálního (1) k C-terminálnímu konci a jednotlivé domény jsou od sebe barevně odlišeny: transaktivační doména 1 a 2 (TAD1/2), doména bohatá na prolin (PRD), DNA vazebná doména (DBD), jaderný lokalizační signál (NLS), tetramerizační doména (TD) a C-terminální doména (CTD) [368] (upraveno).

Na N-terminálním konci polypeptidového řetězce je lokalizována transaktivační doména (TAD; z angl. trans-activation domain), která je odpovědná za vazbu proteinu p53 k různým kofaktorům. Doména je rozdělena na dvě podjednotky – subdomény TAD1 a TAD2 nezbytné k zprostředkování potlačení tumorigeneze v reakci na poškození DNA, aktivaci onkogenů, hypoxie a replikačního nebo translačního stresu. Protein p53 si zachovává obdobné funkce indukující apoptózu

a zástavu buněčného cyklu po delecí subdomény TAD2, ale nikoliv po ztrátě subdomény TAD1, kdy dochází k přerušení jeho buněčných odpovědí [369]. Negativní regulace proteinu p53 je zprostředkována proteinem MDM2 (z angl. mouse double minute 2 homolog). MDM2 je E3 ubikvitin ligáza kódovaná genem *MDM2*, která po vazbě na TAD indukuje ubikvitinaci C-terminálního konce proteinu p53 a reguluje tak jeho proteolýzu komplexem zvaným proteasom. Rovněž bylo prokázáno, že lidský protein MDM2 vazbou na TAD p53 negativně reguluje jeho transkripční aktivitu [370, 371].

Další oblast proteinu p53, která má významný vliv na jeho transkripční potenciál [372, 373], zastavení buněčného cyklu a aktivaci apoptózy v důsledku poškození DNA, je subdoména bohatá na prolin (PRD; z angl. proline-rich domain) [374]. Subdoména PRD je podstatná pro stabilizaci proteinu p53. Mutace v této oblasti nebo úplná delece domény vede ke zvýšení náchylnosti proteinu p53 k ubikvitinaci proteinem MDM2 [375]. Centrální jádro monomeru proteinu p53 obsahuje DNA vazebnou doména (DBD; z angl. DNA-binding domain). Doména formuje sekundární strukturu antiparalelního β skládaného listu strukturovaného do dvou α -helixů. Oblast váže zinečnaté ionty nezbytné ke správné vazbě proteinu p53 k DNA a je vysoce odolná vůči proteázám [366].

Pro plnou transkripční funkci proteinu p53 je nezbytná přítomnost tetramerizační domény, jenž odpovídá rovněž za oligomerizaci monomerů nádorového supresoru p53 do struktury tetrameru. [376]. Tetramer p53 vzniká ze dvou dimerů, ve kterých jsou obsaženy dva monomery spojené prostřednictvím antiparalelního β listu a antiparalelního rozhraní helix-helix [377, 378]. Tvorba struktury tetrameru stíní vliv jaderného exportního signálu proteinu p53 (NES; z angl. nuclear export signal) a brání translokaci z prostředí jádra. Oligomerizace proteinu p53 je nezbytná pro jeho správnou schopnost potlačení nádoru. Delece tetramerizační domény má negativní vliv na vazbu proteinu p53 k molekulám DNA a jeho protein-proteinové interakce [379, 380]. Vazba dimeru i tetrameru proteinu p53 na DNA je vysoce kooperativní proces. Ztráta schopnosti oligomerizace vede ke snížení afinity k DNA [381] a narušení účinku posttranslačních modifikací a proteinové degradace indukované ubikvitinací proteinu p53 proteinem MDM2 [382].

Poslední doména proteinu p53 je označována jako C-terminální doména. Doména je tvořena řadou bazických aminokyselin a reguluje specifickou vazbu proteinu p53 ke konsenzuálním sekvencím DNA nebo jeho nespecifickou vazbu na jiné formy DNA (DNA zlomy nebo vnitřní neshody) [383]. Posttranslační modifikace (zejména acetylace a fosforylace) C-terminální domény jsou nezbytné ke změně jeho konformace, která umožňuje DNA vazebné doméně vázat specifické sekvence DNA [384]. Funkce jaderného transkripčního faktoru a schopnost migrace proteinu p53 do cytoplazmy z důvodu degradace jsou podmíněny jadernými lokalizačními a jadernými exportními signály [385, 386].

2.4.2 Biologické funkce proteinu p53

Kontrola buněčné proliferace a buněčného stárnutí jsou jedny z nejdůležitějších funkcí proteinu p53. Bylo prokázáno, že řada genů a proteinů zapojených do signalizačních drah závislých na proteinu p53 byla při rozvoji rakovinného bujení pozměněna. Buněčné dělení představuje vysoce koordinovaný a regulovaný proces, jehož cílem je předání kompletní a přesné kopie genomu buněk mateřských buňkám dceřiným. Proces je možné zastavit v kontrolních bodech, kde plní důležitou regulační úlohu

protein p53 [387, 388]. Narušení procesu buněčného dělení vede k nekontrolovatelnému množení buněk a tvorbě dalších mutací [366].

Zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 je indukováno p53 dependentní transkripcí proteinu p21, který inhibuje cyklinové komplexy nebo cyklindependentní kinázy (CDK; z angl. cyklin-dependent kinase) [389]. Inhibice jejich kinázové aktivity znemožňuje fosforylaci retinoblastomu (Rb; z angl. retinoblastoma) asociovaného s proteinem E2F. Rb v komplexu s E2F (skupina transkripčních faktorů zapojených do regulace buněčného cyklu a syntézy DNA v savčích buňkách) brání aktivaci genů závislých na proteinu E2F a způsobuje zástavu buněčného cyklu v kontrolní bodě G1. Buněčný cyklus je možné rovněž přerušit nepřímo potlačením transkripce genů *CDK1*, *CDC20*, *BIRC5* (bakulovirový inhibitor repetice apoptózy obsahující 5; z angl. baculoviral IAP repeat containing 5) nebo cyklinů A, B1 a B2 [390]. Regulace buněčného cyklu v kontrolním bodě G2/M proteinem p53 může být realizována třemi různými způsoby. Prvním mechanismem je p53 indukovaná transkripce genu *Gadd45* (gen pro protein odpovědný za zastavení růstu a opravy poškozené DNA alfa; z angl. growth arrest and DNA damage inducible alpha). Protein *Gadd45* narušuje komplex cyklin B1/Cdc2 nebo inhibuje aktivitu cyklin B/Cdc2 kinázy [391, 392]. K zastavení buněčného cyklu v bodě G2 dochází rovněž transkripcí proteinu 14-3-3 [393, 394]. Protein 14-3-3 sekvstruje fosforylovaný protein Cdc2 v cytoplazmě a brání v jeho aktivaci [395]. Třetím možným mechanismem je down-regulace samotného cyklinu B1 [396–400]. Působením stresových faktorů a některých fyziologických procesů dochází k zástavě růstu a potlačení proliferace i při normálních růstových podmínkách. Proces je označován jako buněčné stárnutí a brání rozvoji rakovinného bujení. Buněčná senescence plní důležitou funkci nejen při nádorové supresi, nýbrž i při hojení ran a ochraně před tkáňovou fibrózou [401].

Stupeň poškození DNA rozhoduje o zahájení opravných mechanismů buňky nebo navození apoptózy. Jestliže není poškození příliš závažné, zastavuje protein p53 buněčný cyklus v kontrolním bodě G1 a podporuje expresi proteinů zapojených do opravy DNA. Opravné mechanismy buněk zahrnují kromě homologních rekombinací a nehomologního spojování konců (NHEJ; z angl. non-homologous end joining) i excize nukleotidů (NER; z angl. nucleotide excision repair), báží (BER; z angl. base excision repair) a opravu chybného párování *mismatch* (MMR; z angl. DNA mismatch repair), do kterých je protein p53 zapojen [402, 403]. Rozsáhlé léze DNA je možné opravit excizemi nukleotidů. K tvorbě lézí o délce 2–30 nukleotidů zkreslujících strukturu dvoušroubovice dochází vlivem působení mutagenů z prostředí, jako jsou UV záření a některé chemické sloučeniny [404]. Méně rozsáhlé léze DNA generované převážně působením reaktivních forem kyslíku je možné opravit vícefázovým procesem excizí báží. Poškozené báze jsou odstraněny apurinovými a apyrimidinovými (AP)-endonukleázami, které odpovídají rovněž za opravu poškozených míst. *Mismatch* opravné proteiny zajišťují stabilitu genomu a podílí se na opravě drobných inzercí, delecí nebo substitucí báží, k nimž dochází během replikace DNA, nebo vlivem působení některých exogenních činidel (např. cisplatina, alkylační činidla). Pokud je poškození DNA natolik rozsáhlé, že ji již nelze opravit, indukuje protein p53 expresi proteinů odpovědných za buněčné stárnutí a apoptózu [405]. Apoptóza je druh programované buněčné smrti. Mechanismus navození apoptózy proteinem p53 je komplikovaný a zahrnuje více drah. Jeho ztráta přispívá k rozvoji rakoviny vlivem nahromadění mutací a aberantních buněčných funkcí. Apoptóza je indukována proteiny rodiny Bax (z angl. BCL2 associated X), Bcl-2, Fas/APO1 (receptor pro programovanou buněčnou smrt, Fas

receptor; z angl. apoprotein 1 nebo fas cell surface death receptor), KILLER/DR5 (receptor buněčné smrti 5 označován rovněž jako KILLER (z angl. death receptor 5) a PIG [406].

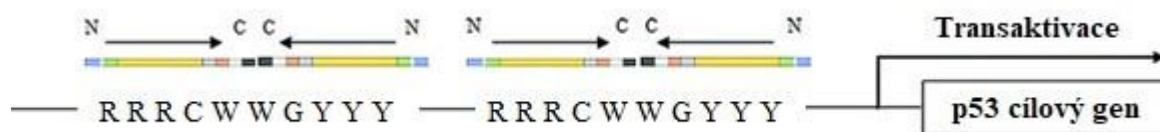
Protein p53 má zásadní vliv při modulaci imunitního systému a ovlivňuje humorální i buněčné složky imunitních odpovědí [407]. Bylo prokázáno, že protein p53 řídí expresi proteinů ERAP1 (aminopeptidáza 1 endoplazmatického retikula; z angl. endoplasmic reticulum aminopeptidase 1), TAP1 (transportér spojený se zpracováním antigenu 1; z angl. transporter associated with antigen processing 1), ULBP1 a 2 (UL16 vazebný protein 1; z angl. UL16 binding protein 1), a TLR3 a 9 (receptor pro rozpoznávání vzorů vrozeného imunitního systému; z angl. toll-like receptor), které jsou zapojeny do imunitních odpovědí [408]. Protein p53 rovněž negativně ovlivňuje STAT3 (převodník signálu a aktivátor transkripce 3; z angl. signal transducer and activator of transcription 3) a související signální dráhy [407] a podílí se na regulaci aktivity cytokinů (IL-6) [409], chemokinů a chemokinových receptorů [410, 411]. V případě narušení funkce proteinu p53 může docházet ke zvýšení aktivity cytokinů a jejich receptorů, angiogenezi, degradaci matrice a navození podmínek prostředí podporujících progresi nádoru [412–414]. V místech chronického zánětu stimulují interferony funkce proteinu p53, který u postižených buněk zastavuje buněčný cyklus, nebo iniciuje apoptózu [415]. Byly prokázány případy, kdy radikály vzniklé působením neutrofilů v místě zánětu indukovaly mutaci proteinu p53. Mutace proteinu p53 může být spojena se zvýšenou proliferací nádoru, angiogenezí a vznikem imunosupresivního mikroprostředí jako tomu je např. mutantní formy proteinu p53 R273H, která se váže na podjednotku p65 proteinu NF- κ B (nukleární faktor kappa B; z angl. nuclear factor kappa B) a vyvolává hyperaktivaci IL-1 β signalizace [416]. Programovaná buněčná smrt může nastat nejen v důsledku poškození DNA, nýbrž i jako důsledek infekce buněk patogeny. Protein p53 v takovém případě aktivuje transkripci intracelulárních toll-like receptorů TLR3 a 9, které váží nukleové kyseliny virů a lipidy nebo proteiny bakterií a hub [417, 418]. Klony T buněk reagující na epitopy proteinu p53 neindukují autoimunitní reakci a snižují růst nádorů vyvolaných dysfunkcí proteinu p53 [419, 420]. Oproti tomu klony T buněk rozpoznávající specifické neoepitopy mutantní formy proteinu p53 vyvolávají imunitní odpověď a představují základ potenciální protirakovinné imunoterapie orientované na protein p53 [421].

2.4.3 Vazebné vlastnosti proteinu p53

Jak již bylo výše zmíněno, protein p53 váže molekulu DNA ve formě tetrameru. Transaktivační potenciál proteinu p53 je silně ovlivněn sekvencí responzivního elementu [422]. Responzivní elementy proteinu p53 se nacházejí v oblastech opakujících se motivů [423], promotorů a proximálních [424] i distálních [425] oblastech *enhancerů* cílových genů proteinu p53. Oblasti responzivních elementů proteinu p53 mj. slouží i jako faktory dostupnosti chromatinu a přispívají ke zvýšení stability genomu [426].

Protein rozpoznává konsenzuální sekvenci dvou dekamerů oddělených krátkou libovolnou sekvencí několika nukleotidů označovanou jako *spacer*. Sekvence 5'-3' je zpravidla tvořena motivem R₃CW₂GY₃-N-R₃CW₂GY₃, kde R označuje purinové báze, Y – báze pyrimidinu, W – adenin nebo thymin a N je oblast *spaceru* [427, 428]. Na základě *in vitro* experimentů bylo zjištěno, že oblast *spaceru* může obsahovat 13–20 nukleotidů bez větších změn ve vazebné afinitě DNA [422, 429], ale výsledky funkčních a kompetitivních testů a studie interakce proteinu p53 s chromatinem prokázaly vyšší afinitu a transaktivační potenciál proteinu k páru dekamerů bez oblasti

spaceru [430, 431]. Bylo prokázáno, že klíčovou roli při vazbě proteinu p53 hraje motiv CW₂G, který je znázorněn na obrázku 2.4.2.



Obrázek 2.4.2: Mechanismus transkripční aktivace cílových genů vazbou proteinu p53 ke konsenzuální sekvenci DNA. R označuje purinové báze, Y báze pyrimidinu a W báze adeninu nebo thyminu [368] (upraveno).

Stanovený trend transaktivačního potenciálu proteinu p53 klesá od sekvence CATG k CAAG, CTTG a CTAG. Dále byl objeven významný vliv okrajových nukleotidových motivů purinů a pyrimidinů lemujících motiv CW₂G, kdy páry GG a CC indukují vyšší transaktivační potenciál proteinu p53 a páry AG a CT naopak nižší [422]. V biologických systémech se většina responzivních elementů odchyluje od výše uvedeného motivu a sekvence s nízkou afinitou zajišťují citlivě regulovanou aktivaci drah indukovaných proteinem p53 [422, 431–433]. Odlišnosti v sekvencích responzivních elementů byly objeveny i mezi blízkce příbuznými druhy. Vysoká sekvenční identita byla pozorována u myších i lidských proteinů p53 [434], které se shodovaly svými biochemickými vlastnostmi i transaktivačním potenciálem [435].

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Literární rešerše k tématu
2. Biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu
3. Izolace a purifikace proteinu IFI16
4. Studium vazby proteinu IFI16 na DNA *in vitro*
5. Studium interakce proteinu IFI16 s DNA v jednohybridním kvasinkovém systému

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

Kmeny kvasinek a bakterií, genetický materiál, antibiotika, protilátky, chemikálie, přístrojové vybavení a další pomůcky použité v této diplomové práci byly poskytnuty ze zdrojů Oddělení biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i., kde také probíhaly veškeré experimenty.

4.1.1 Kmeny kvasinek a bakterií

- **yLFM-PUMA** (*MAT α* ; *leu2-3,112*; *trp1-1*; *his3-11,15*; *can1-100*; *ura3-1*; *RE::pCyc1::LUC1*), *S. cerevisiae*, kmen byl poskytnut Mgr. Natálií Bohálovou z Biofyzikálního ústavu, AV ČR.
- **yLFM-PUMA-KSHV** (*MAT α* ; *leu2-3,112*; *trp1-1*; *his3-11,15*; *can1-100*; *ura3-1*; *RE::pCyc1::LUC1*), *S. cerevisiae*, kmen byl poskytnut Mgr. Natálií Bohálovou z Biofyzikálního ústavu, AV ČR.
- **yLFM-RE** (*MAT α* ; *leu2-3,112*; *trp1-1*; *his3-11,15*; *can1-100*; *ura3-1*; *RE::pCyc1::LUC1*), *S. cerevisiae*, kmeny připravené v rámci bakalářské práce *Využití kvasinkového isogenního systému pro studiu interakcí proteinu IFI16 s DNA* metodou *Delitto Perfetto*. Sekvence responzivních elementů (RE) jsou uvedeny v tabulce 4.1.1.
- **Stb13 kompetentní buňky**, *E. coli*; Thermo Fischer Scientific.
- **BL21-CodonPlus kompetentní buňky**, *E. coli*; Thermo Fischer Scientific.

Tabulka 4.1.1: Sekvence responzivních elementů (RE) klonované metodou Delitto Perfetto do kvasinkového kmene S. cerevisiae yLFM-ICORE.

Označení	Sekvence RE ve směru 5'–3'
PUMA-KSHV-1no	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAAGCGGGGGACGGGGGAGGGG
PUMA-KSHV-2no	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAAGCGAAAGACGGGGGAGGGG
PUMA-KSHV-3no	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAAGCGAAAGACGAAAGAGGGG
PUMA-KSHV-ut1.0	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAGCGGTGGACGGAGGAGTAG
PUMA-KSHV-mut1.5	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAGCGGTGGACGGTGGAGGAG
PUMA-KSHV-mut2.0	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAGCGGTGGACGGAGGGGG

4.1.2 Genetický materiál

- **Nosičová jednořetězcová DNA** – Salmon Sperm ssDNA; Thermo Fisher.
- **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).
- **Vektor pLLS89** (selektovatelný marker kvasinek – LEU2; exprimuje protein p53; obsahuje indukibilní GAL promotor; poskytnut prof. Albertem Ingou z Centra integrativní biologie (CIBIO, University of Trento).

- **Vektor pLS p53 WT** (selektovatelný marker kvasinek – LEU2; exprimuje protein p53 divokého typu; obsahuje konstitutivní (neindukovatelný) promotor).
- **Vektor pTSAG TAD IFI16** (selektovatelný marker kvasinek – TRP1; exprimuje protein IFI16 konjugovaný s transkripčně aktivační doménou (TAD); obsahuje indukovatelný GAL promotor).
- **Vektor pTSAD TAD IFI16** (selektovatelný marker kvasinek – TRP1; exprimuje protein IFI16 konjugovaný s transkripčně aktivační doménou (TAD); obsahuje neindukovatelný ADH (alkoholdehydrogenázový) promotor; připraven v laboratoři Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu, AV ČR).
- **Proteinový žebříček** (10–250 kDa; BioLabs).
- **Syntetické oligonukleotidy neznačené** – oligonukleotidy byly dodány firmou Sigma Aldrich, sekvence oligonukleotidů včetně jejich příslušného *G4Hunter skóre* jsou uvedeny v tabulce 4.1.2.
- **Syntetický oligonukleotid KSHV s fluorescenčním značením** – oligonukleotid byl dodán firmou Sigma Aldrich, sekvence oligonukleotidu včetně *G4Hunter skóre* je uvedena v tabulce 4.1.2.

Tabulka 4.1.2: Sekvence a *G4 Hunter skóre* dodaných syntetických oligonukleotidů bez značení a oligonukleotidu KSHV s fluorescenčním značením (*).

Označení	Sekvence 5'–3'	<i>G4 Hunter skóre</i> [–]
PUMA	CTGCAAGTCCTGACTTGTC	–
RANDOM-22	CCGAGCGATTAAGCGTGACAGC	–
KSHV	GGGGCGGGGACGGGGGAGGGG	3,182
KSHV-1no	GAAGCGGGGACGGGGGAGGGG	2,545
KSHV-2no	GAAGCGAAAGACGGGGGAGGGG	1,727
KSHV-3no	GAAGCGAAAGACGAAAGAGGGG	0,909
KSHV-mut1.0	GGAGCGGTGGACGGAGGAGTAG	0,955
KSHV-mut1.5	GGAGCGGTGGACGGTGGAGGAG	1,091
KSHV-mut2.0	GGAGCGGTGGACGGAGGAGGGG	1,591
KSHV*	GGGGCGGGGACGGGGGAGGGG	3,182

4.1.3 Antibiotika

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

4.1.4 Protilátky

- Primární myší monoklonální protilátka DO-1 (1:1 000)
- Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG s peroxidázou (1:10 000)

4.1.5 Chemikálie

- 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 (SDS)	Serva
• Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	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 (IPTG)	MP Biomedicals
• Kvasinkový extrakt	Duchefa Biochemie
• Kyselina octová	Lach-ner
• Metanol	Penta
• Merkaptoethanol (β -ME)	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 (TEMED)	Sigma Aldrich
• Tris	Serva
• Triton X-100	Roth
• Trypton	Duchefa Biochemie
• Xylencyanová fialová	Sigma Aldrich
• Základ pro kompletní kvasinkové médium; YPD Broth	Sigma Aldrich
• Základní médium s dusíkem pro kvasinky; Yeast Nitrogene Base	Sigma Aldrich

V rámci experimentů byly použity výše uvedené chemikálie a sady. Další chemikálie, které se běžně vyskytují v molekulárně-biologických a biotechnologických laboratořích byly obstarány v nejvyšší možné čistotě a byly ze seznamu vynechány.

4.1.6 Přístrojové vybavení a další pomůcky

• 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 System	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

V rámci experimentů bylo použito výše uvedené přístrojové vybavení a další pomůcky. Další přístroje a vybavení, které se běžně vyskytují v molekulárně-biologických a biotechnologických laboratořích byly ze seznamu vynechány.

4.2 Složení použitých médií a dalších roztoků

4.2.1 Média použitá při kultivaci bakterií

- **LB médium**
 - 1,0 % trypton
 - 0,5 % kvasinkový extrakt
 - 1,0 % NaCl

4.2.2 Média použitá při kultivaci kvasinek

- **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 *Yeast Nitrogene base*
 - 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 s rafinózou (SRItA – luciferázové testy)**
 - 6,7 g·l⁻¹ *Yeast Nitrogene base*
 - 2 % rafinóza
 - 200 mg·l⁻¹ adenin
 - 20 mg·l⁻¹ histidin
 - 90 mg·l⁻¹ lysin
 - 20 mg·l⁻¹ uracil

4.2.3 Roztoky použité při izolaci proteinu IFI16

- **Eluční pufr**
 - 500 mM imidazol
 - 20 mM Tris (pH 8)
 - 500 mM NaCl
 - 1 mM β-ME
 - 5 % glycerol
- **Lyzační pufr**
 - 5 mM imidazol
 - 20 mM Tris
 - 500 mM NaCl
 - 1 mM β-ME
 - 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-ME
 - 5 % glycerol

4.2.4 Roztoky použité při Western blotu

- **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
0,375 M Tris (pH 8,8)
0,1 % SDS
Persíran amonný (0,005x AA)
Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
- **Blokovací roztok**
1x PBS
5 % odtučněné sušené mléko
- **Blotovací pufr; 10x**
25 mM Tris
0,192 M glycin, pH 8,3
- **Coomassie Blue; barvicí roztok**
0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250
50 % metanol
10 % kyselina octová
- **CSB nanášecí pufr; 5x**
100 mM Tris (pH 6,8)
10 % glycerol
4 % SDS
200 mM β -merkaptoethanol
0,1 % bromfenolová modrá
- **Destain; odbarvovací roztok**
40 % methanol
10 % ledová kyselina octová
- **PBS; 10x**
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
100 mM Na_2HPO_3
- **SDS-PAGE Running buffer; 10x**
25 mM Tris
0,192 M glycin
0,1 % SDS, pH 8,3

4.2.5 Roztoky použité při vazebných a kompetitivních vazebných experimentech

- **Akrylamid; 4%**
4 % 19:1 akrylamid:bisakrylamid
0,33x TBE
50 mM KCl
Persíran amonný (0,005x AA)
Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
- **Akrylamid; 8%**
8 % 19:1 akrylamid:bisakrylamid
0,33x TBE
50 mM KCl
Persíran amonný (0,005x AA)
Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
- **Akrylamid; 16%**
16 % 19:1 akrylamid:bisakrylamid
0,33x TBE
50 mM KCl
Persíran amonný (0,005x AA)
Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
- **LB nanášecí pufr; 6x**
40 % sacharóza
0,2 % bromfenolová modrá
0,2 % xylencyanová fialová
- **TBE; 10x**
900 mM Tris
900 mM H₃BO₃
10 mM EDTA (pH 8,3)
- **Vazebný pufr; 20x**
50 mM KCl
5 mM Tris (pH 7)
0,01 % Triton X-100

4.2.6 Roztoky použité při elektroforetických testech posunu mobility

- **Akrylamid; 8%**
8 % 19:1 akrylamid:bisakrylamid
1 mM NaH₂PO₄
0,5 M EDTA
10 mM KH₂PO₄
(50 mM KCl)
Persíran amonný (0,005x AA)
Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)

- **EMSA pufr**
 - 1 mM NaH₂PO₄
 - 500 mM EDTA
 - 10 mM KH₂PO₄
 - (50 mM KCl)
- **Stains-all**
 - 0,005 % Stains-all (formamid)
 - 10 % formamid
 - 0,25 % isopropanol
 - 15 mM Tris-HCl (pH 8)

4.2.7 Roztoky použité při transformaci kvasinek

- **LiAc/TE/PEG**
 - 100 mM dihydrátu octanu lithného
 - 1x TE pufr
 - 58 % PEG
- **LiAc/TE**
 - 100 mM dihydrátu octanu lithného
 - 1x TE pufr
- **TE pufr; 10x**
 - 100 mM Tris-HCl, pH 7,6
 - 10 mM EDTA, pH 8

4.3 Metody

4.3.1 Testy cirkulárního dichroismu (CD spektroskopie)

Měření cirkulárního dichroismu za účelem biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu bylo provedeno dle postupu uvedeném v článku *IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation* [97]. Syntetické oligonukleotidy bez fluorescenčního značení, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4.1.2 byly ředěny ultračistou vodou na koncentraci 100 pmol·μl⁻¹. Ze zásobních roztoků oligonukleotidů byly připraveny vzorky o koncentraci odpovídající 60·10⁻⁶ mol·l⁻¹ na celkový počet oligonukleotidů v roztocích pufrů o složení 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl a 10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl s přídatkem 100 mmol·l⁻¹ KCl. Takto připravené vzorky oligonukleotidů byly denaturovány po dobu 5 minut při 95 °C v termobloku, ve kterém byly postupně ochlazeny na laboratorní teplotu. Spektra byla měřena na dichrografu Jasco 815 v 1cm zúžených křemenných kyvetách umístěných v termostaticky regulovaném držáku při 20 °C. Byly provedeny čtyři skeny každého vzorku při rychlosti skenování 100 nm·min⁻¹ s datovým stoupáním 0,5 nm v rozsahu vlnových délek 220–330 nm, které byly zprůměrovány a výsledná spektra byla vyhlazena pomocí Savitzky-Golayova vyhlazovacího algoritmu s 15bodovým oknem. Signál CD byl vyjádřen jako rozdíl molárního absorpčního koeficientu Δε levotočivého a pravotočivého polarizovaného světla. Koncentrace ssDNA byly stanoveny spektrofotometricky na přístroji NanoDrop DS-11 FX při vlnové délce 260 nm před každým měřením.

4.3.2 ThT fluorescenční vazebný test

Sekundární struktury tvořené sekvencemi s potenciálem tvorby G-kvadruplexu byly analyzovány biofyzikálně s využitím thioflavinu T (ThT) dle postupu uvedeném v článku *Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation* [25]. Syntetické oligonukleotidy bez fluorescenčního značení byly ředěny ultračistou vodou na koncentraci $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Ze zásobních roztoků byly připraveny vzorky o koncentraci $2 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v roztoku pufru o složení $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl o pH 7,5 a $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl o pH 7,5 s přidavkem $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl. Připravené vzorky oligonukleotidů byly denaturovány po dobu 5 minut při $95 \text{ }^\circ\text{C}$ v termobloku, ve kterém byly postupně ochlazeny na laboratorní teplotu. Vzorky byly smíchány s thioflavinem T ředěným ultračistou vodou o koncentraci $1 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v molárním poměru DNA:ThT 1,0:0,5 tak, aby finální koncentrace činila $1,0 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ DNA a $0,5 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ThT o objemu $20 \mu\text{l}$. Emise fluorescence byla snímána při vlnové délce 490 nm po excitaci vzorků při 425 nm v 384jamkové titrační mikrodestičce CORNING při laboratorní teplotě.

4.3.3 Elektroforetický test posunu mobility (EMSA)

Vznik intra- a intermolekulárních struktur G4 z analyzovaných sekvencí DNA byl sledován prostřednictvím nativní vertikální elektroforézy v 8% polyakrylamidovém gelu o tloušťce $1,5 \text{ mm}$. Syntetické oligonukleotidy bez fluorescenčního značení byly ředěny ultračistou vodou na koncentraci $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Ze zásobních roztoků byly připraveny vzorky o koncentraci $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v prostředí pufrů o složení $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 , $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 nebo $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 , $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 s přidavkem $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl. Připravené vzorky oligonukleotidů byly denaturovány po dobu 5 minut při $95 \text{ }^\circ\text{C}$ v termobloku, ve kterém byly postupně ochlazeny na laboratorní teplotu. Na gel bylo naneseno 500 ng vzorků DNA s přidavkem 40% sacharózy (6x koncentrovaný nanášecí pufr bez přidavku bromfenolové modři a xylycyanové fialové). Elektroforéza probíhala $1,5$ hodiny při 50 V v prostředí $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 , $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 nebo $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 , $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 s přidavkem $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Gel po elektroforéze byl barven barvivem Stains-all po dobu 1 hodiny bez přístupu světla a následně odbarvován v ultračisté vodě za stálého třepání a přístupu světla. Maximální emise Stains-all byla snímána na přístroji *Amersham Imager 680* při vlnové délce 609 nm .

4.3.4 Izolace proteinu IFI16 proteinovou afinitní chromatografií

Protein IFI16 byl izolován z již předem připravené bakteriální kultury kompetentních buněk *E. coli* BL21-CodonPlus. Kompetentní buňky byly transformovány plazmidovým vektorem pET15b, který produkuje protein IFI16 fúzovaný s polyhistidinovou kotvou (His-tag). Izolace a purifikace proteinu IFI16 proběhla dle postupu uvedeném v následujících podkapitolách. Výsledná koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky metodou podle Bradfordové.

4.3.4.1 Příprava bakteriální kultury

První den byla do 10 ml LB média s obsahem antibiotik ampicilinu a chloramfenikolu o koncentracích 100 a $25 \mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ začkována bakteriální kultura *Escherichia coli* BL21-CodonPlus z prostředí mrazícího boxu ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$). Inokulant byl kultivován do druhého dne za stálého třepání při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Následující den

bylo 10 ml média s narostlou kulturou převedeno do přehřátého LB média s přidavkem obou antibiotik o objemu 1 000 ml. Nově zaočkované médium bylo kultivováno v 5 000ml kultivační Erlenmeyerově baňce za stálého třepání při 37 °C. V průběhu inkubace byla průběžně sledována hodnota optické hustoty bakteriální kultury UV/VIS spektrofotometru *Specord PLUS 210* při vlnové délce 600 nm proti slepému vzorku (médium bez kultury). Po dosažení optické hustoty (absorbance) 0,6 byl přidán 1,0 ml roztoku 1,0 mol·l⁻¹ IPTG, který indukoval expresi proteinu IFI16 s polyhistidinovou kotvou. Kultura byla inkubována v kultivační Erlenmeyerově baňce přes noc při 16 °C za stálého třepání (98 rpm).

4.3.4.2 Lýze buněk

Z bakteriální kultury po indukci byl odebrán 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. Následovala samotná lýze buněk, která byla provedena 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 s lyzačním pufrem byl resuspendován homogenizátorem, převeden do další kyvety a opět resuspendován. Tento krok byl zopakován 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 30s přestávkami. Zlyzované 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.

4.3.4.3 Izolace proteinu IFI16

Ke 4 ml kuliček *TALON Metal Affinity resin* ve směsi s ethanolem bylo přidáno 40 ml vazebného pufru a směs byla důkladně promíchána a centrifugována při 4 °C a 2 000 g po dobu 5 minut. Supernatant z lýze buněk byl převeden k promývaným kuličkám *TALON Metal Affinity resin* a ponechán při 4 °C na naklánědle Multi Rotstor RS-60 po dobu 1 hodiny. Směs byla stočena při 2 000 g po dobu 5 minut. Ze supernatantu po centrifugaci byl odebrán 1 ml vzorku jako kontrola K4. Zbylý supernatant byl odstraněn. K peletu bylo přidáno 40 ml vazebného pufru. Směs byla důkladně promíchána a centrifugována při 4 °C a 2 000 g po dobu 5 minut. Ze supernatantu byl odebrán 1 ml vzorku jako kontrola K5 a zbylý supernatant byl odstraněn. K peletu bylo přidáno 40 ml promývacího pufru. Směs byla promíchána a centrifugována při 4 °C a 2 000 g po dobu 5 minut. Část supernatantu byla odebrána a zbytek byl spolu s kuličkami kvantitativně převeden do kolony. Z přefiltrovaného promývacího pufru byl odebrán 1 ml vzorku jako kontrola K6. Po přefiltrování veškerého promývacího pufru byla eluce indukována přidavkem 1 ml elučního pufru. Každý přidavek pufru byl odebrán jako jedna eluce. Celkem bylo odebráno pět elucí po 1 ml do 1,5ml mikrozkušavek. Z každé eluce bylo odebráno 50 µl pro následné spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů v eluci a Western blot. Vzorky elucí byly zmrazeny pomocí tekutého dusíku a uchovávány na -80 °C. Následovalo spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu IFI16 metodou podle Bradfordové a Western blot.

4.3.5 Western blot po izolaci proteinu IFI16 proteinovou afinitní chromatografií

K potvrzení izolace proteinu IFI16, a ke zjištění stavu fragmentace a případné kontaminace dalšími proteiny, byl proveden Western blot a barvení gelu barvivem *Coomassie Blue*. Byly připraveny dva polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm s přídavkem SDS (dodecylsírán sodný). Spodní vrstva obou gelů byla připravena z 15% roztoku akrylamidu s SDS. Vrchní vrstvu obou gelů tvořil 5% roztok akrylamidu s přídavkem SDS. U obou vrstev byla polymerace indukována přídavkem APS a Temedu.

4.3.5.1 SDS-PAGE

Objemy proteinových elucí a kontrol byly s 5x koncentrovaným CSB nanášecím pufrem přeneseny do čistých mikrozkuvek dle níže uvedeného postupu. Uvedené objemy byly již vztáhnuty pro přípravu vzorků na oba gely a upraveny s ohledem na možné odchylky v pipetování při přípravě.

Kontrola po indukci byla stočena a supernatant byl přenesen do čisté mikrozkuvky. Ze supernatantu bylo přeneseno 20 μ l vzorku do čisté mikrozkuvky, do které bylo přidáno 80 μ l ultračisté vody (z důvodu předpokladu vysoké koncentrace proteinů) a 20 μ l 5x koncentrovaného CSB nanášecího pufru. Do jamek gelu bylo nanášeno 40 μ l. Vzorky kontrol K3–K6 byly po 30 μ l přeneseny do čistých mikrozkuvek. Ke všem těmto vzorkům bylo přidáno 7,5 μ l 5x koncentrovaného CSB nanášecího pufru. Do jamek gelu bylo nanášeno 18 μ l. Vzorky elucí E1–E5 byly po 10 μ l přeneseny do čistých mikrozkuvek. Následně k nim bylo přidáno 2,5 μ l 5x koncentrovaného CSB nanášecího pufru. Do jamek gelu bylo nanášeno 5 μ l. Jako pozitivní kontrola byla použita již dříve ověřená α -izoforma proteinu p53 rovněž obsahující polyhistidinovou kotvu. Příprava pozitivní kontroly byla shodná s přípravou vzorků elucí.

Připravené vzorky byly inkubovány v termobloku 5 minut při teplotě 95 °C a po inkubaci byly okamžitě přeneseny na led. Do jednotlivých startů obou gelů byly nanášeny: žebříček (10–250 kDa) o objemu 3 μ l, vzorky kontrol K2, K3, K4, K5, K6, vzorky elucí E1, E2, E3, E4, E5, pozitivní kontrola proteinu p53 a žebříček (10–250 kDa) o objemu 1,5 μ l. Byla provedena vertikální elektroforéza v přítomnosti 1x koncentrovaného SDS-PAGE pufru (15 minut při 50 V, 15 minut při 100 V a 60 minut při 150 V). Po skončení elektroforézy byl jeden z gelů použit pro Westernový přenos a u druhého gelu byla ověřena přítomnost separovaných proteinů barvením pomocí *Coomassie Blue*.

4.3.5.2 Barvení gelu barvivem *Coomassie Blue*

Gel určený pro barvení byl přenesen do skleněné vany a zalit barvivem *Coomassie Blue*. Gel s barvivem byl inkubován po dobu 20 minut za stálého třepání (80 rpm) při laboratorní teplotě a následně byl 2x promyt odbarvovacím roztokem *Destain* za stálého třepání (80 rpm) opět při laboratorní teplotě. Interval mezi každým promytím trval 20 minut. Po třetím promytí byl gel s odbarvovacím roztokem inkubován do druhého dne při laboratorní teplotě za stálého třepání (80 rpm). Následující den byl gel opět promyt odbarvovacím roztokem a snímán kolorimetricky na přístroji *Amersham Imager 680*.

4.3.5.3 Westernový přenos

Gel určený pro blotování byl překryt nitrocelulózovou membránou a společně byly přeneseny v prostředí 1x koncentrovaného blotovacího pufru s přídavkem methanolu mezi dvě vrstvy filtračního

papíru po obou stranách a upevněny v blotovacím nástavci. Blotovací přenos probíhal 90 minut při 150 mA v prostředí 1x koncentrovaného blotovacího pufru. Po westernovém přenosu byla provedena imunodetekce na nitrocelulóзовé membráně promyté 1x koncentrovaným roztokem PBS.

4.3.5.4 Imunodetekce nitrocelulóзовé membrány

Nitrocelulóзовá membrána byla inkubována 30 minut v blokovacím roztoku a promyta roztokem 1x koncentrovaného PBS. Následně byla membrána zalita blokovacím roztokem s myší primární monoklonální protilátkou ředěnou v poměru 1:1 000 s afinitou k polyhistidinové kotvě. Membrána byla s roztokem protilátky inkubována při 4 °C do druhého dne za stálého třepání (80 rpm). Druhý den byla nitrocelulóзовá membrána 5x promyta 1x koncentrovaným roztokem PBS za stálého třepání. Interval mezi jednotlivými promytími trval 5 minut. Po promytí byla na membránu aplikována sekundární protilátka *Anti-Mouse IgG* konjugovaná s peroxidázou v 10 ml blokovacího roztoku v poměru 1:10 000. Membrána byla s roztokem sekundární protilátky inkubována za stálého třepání (160 rpm) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla membrána opět 5x promyta 1x koncentrovaným roztokem PBS vždy po 5 minutách za stálého třepání a převrstvena 1 ml detekční směsí *ECL Western Blot detection kit*, která byla smíchána v poměru 1:1. Chemiluminescence byla snímána na přístroji *Amersham Imager 680*. Nejprve bylo provedeno automatické snímání a následně byla doba expozice nastavena na 5 minut.

4.3.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu IFI16

Vzorky elucí určené ke spektrofotometrickému stanovení koncentrace proteinu IFI16 a kalibrační roztoky BSA proteinu v elučním pufru o koncentracích 0,0–0,1–0,2–0,4–0,6–0,8–1,0–1,2–1,4–1,6 mg·ml⁻¹ byly důkladně zhomogenizovány a přeneseny na led. Z každého roztoku byly přeneseny 4 µl do předem připravených mikrozkušavek se směsí 396 µl ultračisté vody a 100 µl 5x koncentrovaného Bradfordova činidla. Vzniklé směsi byly důkladně zhomogenizovány. Vzorky kalibračních roztoků a vzorky elucí byly přeneseny po 200 µl do 96jamkové titrační destičky vždy ve dvou opakováních. Destička byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě a po inkubaci byla stanovena koncentrace proteinu IFI16 ve vzorcích elucí na přístroji *Hybrid Reader* při vlnové délce 595 nm.

4.3.7 Hybridizace oligonukleotidů pro vazebné a kompetitivní vazebné experimenty

Dodané syntetické oligonukleotidy s potenciálem tvorby G-kvadruplexu, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4.1.2 byly hybridizovány dle postupu uvedeném v článku *IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation* [97]. V průběhu hybridizace byly vzorky nesoucí fluorescenční značení chráněny před světlem kvůli možnému vysvěcování značky. Oligonukleotid KSHV značený fluorescenční značkou byl zředěn na koncentraci 10 pmol·µl⁻¹ 1x koncentrovaným TE pufrům s přidavkem 50 mmol·l⁻¹ KCl. Oligonukleotidy bez značení byly zředěny na stejnou koncentraci ultračistou vodou s přidavkem 50 mmol·l⁻¹ KCl. Připravené vzorky byly denaturovány 10 minut při 95 °C. Denaturované vzorky oligonukleotidů byly postupně ochlazeny na laboratorní teplotu. Hybridizované oligonukleotidy byly skladovány při 4 °C.

4.3.8 Vazebné experimenty

Vazba proteínu IFI16 s hybridizovaným oligonukleotidem KSHV (nesoucím fluorescenční značku) a výběr vhodného molárního poměru DNA:protein (pro studium vazby proteínu IFI16 k sekvencím s rozdílným potenciálem tvorby G-kvadruplexu) byly sledovány testem posunu elektroforetické mobility, v prostředí nativního polyakrylamidového gelu. Třívrstvé nativní polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm s přidavkem $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl a 0,33x koncentrovaného TBE pufru byly připraveny z 16, 8 a 4% roztoků akrylamidu, u kterých byla polymerace indukována přidavkem roztoků APS a Temedu. Hybridizovaný oligonukleotid KSHV s fluorescenčním značením byl smíchán s 20x koncentrovaným vazebným pufrem, ultračistou vodou a izolovaným proteinem IFI16 do výsledných molárních poměrů DNA:protein 1:0, 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8. Připravené vzorky byly inkubovány 10 minut při 4 °C. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 2,5 μl 6x koncentrovaného nenedenaturujícího nanášecího pufru a vzorky byly přeneseny do jednotlivých startů gelu. Elektroforéza probíhala 2 hodiny při 50 V v prostředí 0,33x koncentrovaného TBE pufru při 4 °C v podmínkách zamezujících přístupu světla. Gel po elektroforéze byl snímán při vlnové délce 460 nm na přístroji LAS-3 000.

4.3.9 Kompetitivní vazebné experimenty

Vazba proteínu IFI16 k sekvencím dodaných oligonukleotidů s potenciálem tvorby G-kvadruplexu bez fluorescenčního značení byla studována kompetitivními vazebnými experimenty v prostředí nativního polyakrylamidového gelu. Třívrstvé nativní polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm s přidavkem $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl a 0,33x koncentrovaného TBE pufru byly připraveny z 16, 8 a 4% roztoků akrylamidu, u kterých byla polymerace indukována přidavkem roztoků APS a Temedu. Byly připraveny směsi hybridizovaného oligonukleotidu KSHV s fluorescenčním značením, 20x koncentrovaného vazebného pufru a ultračisté vody, ke kterým byl přidán kompetitor s některou ze sekvencí uvedených v tabulce 4.1.2 o koncentracích 0,0–5,0–7,5–10,0–15,0–25,0 pmol a izolovaný protein IFI16 v molárním poměru vůči fluorescenčně značenému KSHV 1:4 (DNA:protein). Smíchané vzorky byly inkubovány 10 minut při 4 °C. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 2,5 μl 6x koncentrovaného nanášecího nenedenaturujícího pufru a vzorky byly přeneseny do jednotlivých startů gelu. Elektroforéza probíhala 2 hodiny při 50 V v prostředí 0,33x koncentrovaného TBE pufru při 4 °C v podmínkách zamezujících přístupu světla. Gel po elektroforéze byl snímán při vlnové délce 460 nm na přístroji LAS-3 000.

4.3.10 Izolace plazmidové DNA

Izolace plazmidové DNA z bakteriální kultury byla provedena pomocí *E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I* dle přiloženého postupu. Plazmidy (pRS314, pRS315, pLLS89, pLS p53WT, pTSAD TAD IFI16 a pTSAG TAD IFI16) byly izolovány z připravených bakteriálních kultur uchovávaných při -80 °C. Jednotlivá bakteriální kultura byla inkubována 14 hodin v 5 ml tekutého LB média s přidavkem antibiotika ampicilinu v poměru 1:1 000 za stálého třepání (100 rpm) při 37 °C. Čistá bakteriální kultura bez média byla z inokulí převedena do mikrozkuřavky opakovanou centrifugací při 10 000 g po dobu 1 minuty. Následovala lýze buněk, kdy k připraveným peletům bylo přidáno 250 μl Roztoku 1 s obsahem RNázy A. Směsi byly důkladně homogenizovány vortexem a přeneseny do nových mikrozkuřavek. Následně bylo ke směsím přidáno 250 μl Roztoku 2 obsahujícího lyzační

enzymy. Po jemném promíchání obsahů zkumavek bylo přidáno 350 μ l neutralizační Roztoky 3. Po jemném promíchání došlo k utvoření bílé sraženiny. Aby se oddělila sraženina obsahující proteiny a zbytky lyzovaných buněk od supernatantu s plazmidovou DNA, byly směsi centrifugovány 14 000 g po dobu 10 minut. Následovala vazba plazmidové DNA na fritu filtrační kolony. Supernatant byl převeden do kolony tak, aby nedošlo k dotyku a přenesení části peletu (potenciální kontaminace izolované pDNA proteiny) nebo poškození povrchu frity. Vzorky ve filtračních kolonách byly centrifugovány při 14 000 g po dobu 1 minuty, kdy došlo k vazbě pDNA na fritu kolony a supernatant bez pDNA byl převeden do sběrné zkumavky a následně odstraněn. Navázaná plazmidová DNA byla promyta 500 μ l HBC pufru s přídavkem 100 % izopropanolu (14 000 g po dobu 1 minuty) a 700 μ l DNA promývacího pufru s přídavkem 100% ethanolu (14 000 g po dobu 30 sekund). Pro zajištění vyšší koncentrace vzorku a odstranění nadbytečného množství promývacích roztoků byl zopakován předcházející krok bez přídavku dalšího množství promývacího roztoku. Filtrační kolona byla přenesena do nové mikrozkušavky a těsně nad fritu bylo nanášeno 75 μ l elučního pufru. Po minutové inkubaci byly kolony centrifugovány při 14 000 g po dobu 1 minuty. Koncentrace a čistota byly stanoveny na přístroji *NanoDrop* proti elučnímu pufru jako slepému vzorku. Stav izolovaných plazmidů byl ověřen horizontální elektroforézou v 1% agarózovém gelu s přídavkem interkalačního činidla *GelRed*. Vzorky byly nanášeny do jednotlivých startů ve stejné koncentraci (10 μ l pDNA na koncentraci 100 ng· μ l⁻¹ s vhodným přídavkem 6x koncentrovaného *Loading Bufferu*). Rovněž byl nanášen DNA žebříček o velikosti 1 kb a pozitivní kontrola – ověřený vzorek plazmidu pTSAD TAD IFI16. Elektroforéza probíhala při 90 V po dobu 45 minut v prostředí 1x koncentrovaného TAE pufru.

4.3.11 Transformace kvasinkových kmenů lithium-acetátovou metodou

Kvasinkové kmeny byly transformovány plazmidovou DNA obsahující prázdné vektory, vektory pro produkci proteinů p53 a IFI16 s transaktivační doménou proteinu p53 a jejich vzájemnou kombinací. Byly založeny kvasinkové kultury z jedné kolonie kvasinkových kmenů v 5 ml YPDA tekutého média. Založené kultury byly inkubovány při 30 °C za stálého třepání do druhého dne. Kvasinková inokula byla následující den převedena do YPDA tekutého média o objemu 40 ml a za stejných podmínek kultivována do dosažení optické hustoty 0,8–1,0 při vlnové délce 600 nm. Narostlé kvasinkové kultury byly centrifugovány 9 000 g po dobu 3 minut při laboratorní teplotě. Pelet byl 2x promyt ultračistou vodou (50 a 10 ml) a směsí LiAc/TE (3 ml). Takto připravené kompetentní buňky byly zakoncentrovány směsí LiAc/TE na objem 600 μ l. K 50 μ l kompetentních buněk byly přidány 2 μ l plazmidů (500 ng pDNA) umožňující selekci kvasinek na aminokyseliny leucin a tryptofan a 5 μ l denaturované jednořetězcové nosičové DNA o koncentraci 10 mg·ml⁻¹. Ke směsím kompetentních buněk s plazmidy bylo přidáno 300 μ l směsi LiAc/TE/PEG a směsi byly inkubovány po dobu 30 minut za stálého třepání při 30 °C a následně 15 minut při 42 °C. Směsi byly stočeny a pelety byly resuspendovány v 100 μ l ultračisté vody. Transformační směsi o objemu 50 μ l byly nanášeny na leucin-tryptofan selektivní agarové plotny s obsahem adeninu (ItA miský) a inkubovány po dobu 3 dnů při 30 °C.

4.3.12 Luciferázové reportérové testy

Z kvasinkových transformantů bylo odebráno 6 kolonií, které byly rozetřeny na ItA misky do tvaru tzv. *Patches*. Nově připravené roztěry byly inkubovány po dobu 3 dnů při 30 °C. Po 3 dnech inkubace bylo odebráno malé množství z pěti vybraných roztěrů *Patches* každého transformantu, které bylo resuspendováno v 200 µl syntetického leucin-tryptofan selektivního tekutého média s rafinózou (SRItA médium) v 96jamkové titrační destičce. Následně bylo 60 µl z těchto zásobních kultur přeneseno do SRItA média o objemu 60 µl a SRItA média s přídatkem 0,24 % galaktózy (výsledná koncentrace galaktózy činila 0,12 %). Kvasinkové kultury byly inkubovány při 30 °C. V časech T₀, T₆ a T₂₄ (0, 6 a 24 hodin od začátku inkubace) bylo k 20 µl vzorků přidáno 20 µl 2x koncentrovaný lyzační pufr *Passive Lysis Buffer* v poměru 1:1 a směsi byly za stálého třepání (300 rpm) inkubovány 15 minut v 384jamkové titrační mikrodestičce při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 20 µl luciferázového substrátu *Bright Glo Luciferase assay* a okamžitě byla změřena bioluminiscence a optická hustota kultury při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀) na přístroji *Synergy Hybrid Multi-Mode Microplate Reader*.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu

Detekce G-kvadruplexů v molekule DNA a charakterizace jejich konformace je nezbytnou podmínkou při studiu vlivu těchto sekundárních struktur na buněčné mechanismy a vazebné, nebo jiné biologické vlastností proteinů. Charakterizace vybraných sekvencí oligonukleotidů (Tabulka 4.1.2) byla provedena s využitím CD spektroskopie, ThT vazebných fluorescenčních testů a elektroforetického testu posunu mobility v prostředí bez přídavku a s přídavkem stabilizujících draselných kationtů.

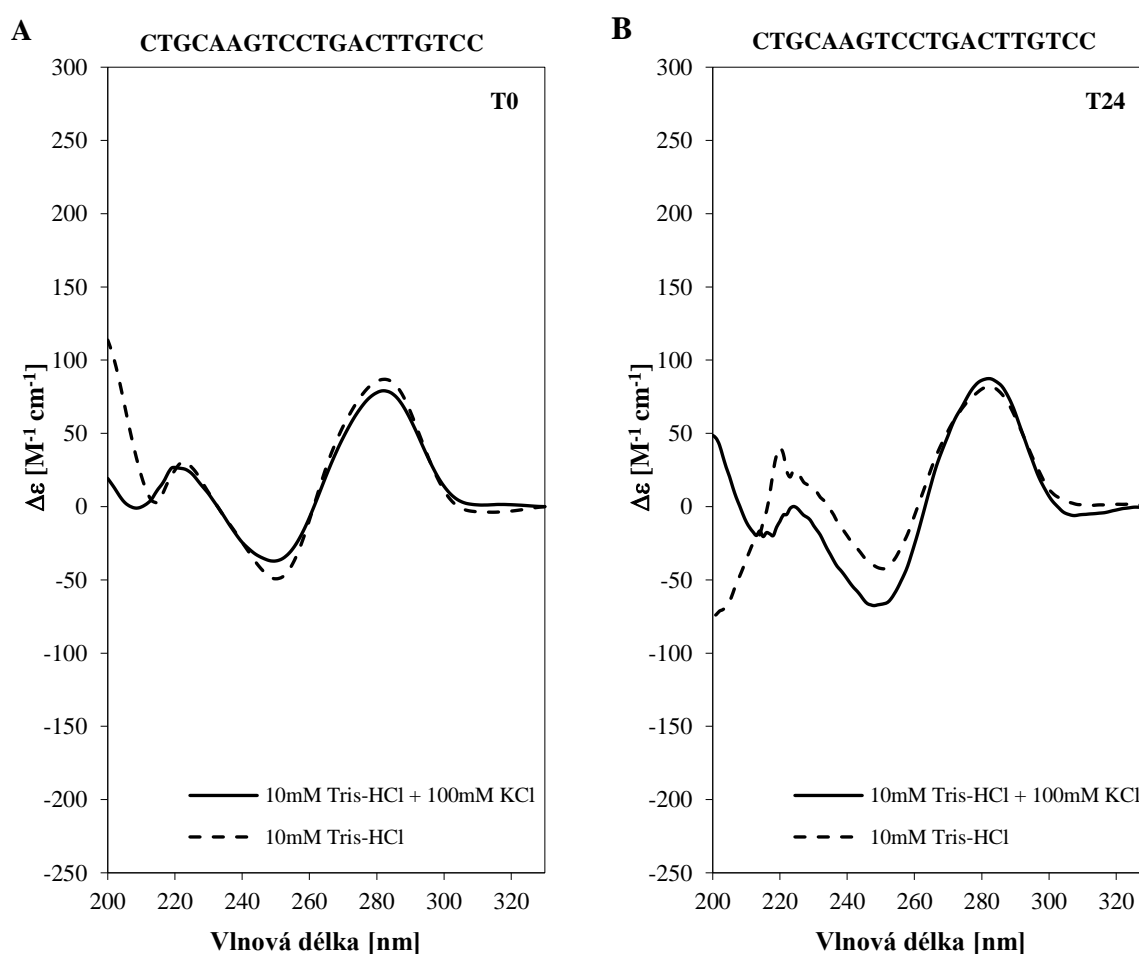
5.1.1 Charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu CD spektroskopii

Metoda měření cirkulárního dichroismu umožňuje detekovat přítomnost různých sekundárních struktur nukleových kyselin a proteinů. Konformace G-kvadruplexů je možné určit na základě srovnání naměřených spekter s již charakterizovanými modelovými spektry G-kvadruplexů, která vykazují charakteristické pozitivní a negativní píky při určitých vlnových délkách [318, 319].

Vzorky analyzovaných oligonukleotidů o koncentraci přibližně $60 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ přepočtené na jeden nukleotid z celkového počtu nukleotidů (optimální koncentrace pro měření cirkulárního dichroismu [27]) v sekvenci byly hybridizovány v roztocích $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přídavkem $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl, jehož přítomnost měla indukovat snadnější tvorbu a stabilizaci vznikajících sekundárních struktur G4 [102, 436]. Měření bylo provedeno v den hybridizace (čas T_0) a po uplynutí 24 hodin (čas T_{24}), aby bylo ověřeno, zda u vzniklých sekundárních struktur nedochází v průběhu času ke změnám konformace. Výsledná CD spektra byla získána jako průměr čtyř skenů a vyhlazena pomocí Savitzky-Golayova vyhlazovacího algoritmu. Signál cirkulárního dichroismu byl vyjádřen jako rozdíl molárního absorpčního koeficientu $\Delta\epsilon$ levotočivého a pravotočivého polarizovaného světla. Od naměřených spekter vzorků byl odečten signál příslušného pufru ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl nebo $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přídavkem $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl) a výsledné hodnoty byly přepočteny na celkový počet nukleotidů v sekvenci. Do grafů byly vyneseny závislosti signálu CD na vlnové délce.

Na obrázku 5.1.1 se nachází spektra vzorků oligonukleotidu PUMA. Sekvence PUMA byla odvozena od cílového místa proteinu p53 promotoru genu *PUMA*, proto u ní nebyla předpokládána přítomnost G-kvadruplexu, což potvrdil i program *G4 Hunter*, který i při 55% poměru bází GC nepredikoval přítomnost G4. Spektra vzorků hybridizovaných v obou typech pufrů v obou sledovaných časech vykazují přítomnost vyššího pozitivního píku v oblasti vlnové délky 280 nm, menšího pozitivního píku při vlnové délce kolem 220 nm a negativního píku při 250 nm. Při porovnání CD spekter známých konformací G-kvadruplexů [27] je vidět, že vzorek netvoří strukturu G-kvadruplexu ani v jednom z použitých pufrů a k jeho formování nedochází ani v průběhu delšího časového úseku. Na spektrech vzorků v čase T_{24} je možné pozorovat určité odchylky ve spektrech při vlnových délkách v okolí oblasti 220 nm, které mohou být způsobeny chybou měření z důvodu příliš vysoké hodnoty naměřené absorbance dané charakterem pufru nebo vlivem aktivity vody, jejíž vliv na přechod mezi A-B formou DNA byl již dříve pozorován [438]. Podobná spektra odpovídající spektru B-formy DNA byla naměřena např. u DNA telecího brzlíku [440, 442, 443]. Přestože byla pozorována přítomnost B-formy DNA např. i u vzorků nativní DNA *Sarcina lutea* (71 % GC) nebo *Bacillus cereus* (33 % GC), neodpovídají jejich CD spektra spektrům vzorků

PUMA [442]. Tento rozdíl je dán rozdílným zastoupením GC bazí v DNA [440, 442]. Nativní DNA telecího brzlíku s 42% zastoupením GC nejlépe odpovídá námi charakterizovaným vzorkům oligonukleotidu PUMA. Spektra telecího brzlíku byla srovnávána se spektry syntetických oligonukleotidů i přírodních vzorků s různým obsahem GC. Bylo prokázáno, že s rostoucím zastoupením AT bazí dochází k prohloubení negativního pásu a zvýšení konformační variability vznikajících struktur [442]. Přestože jsou spektra vzorků PUMA podobná spektrům dsDNA telecího brzlíku, byly vzorky připraveny z oligonukleotidu ssDNA. Je možné, že během hybridizace dochází k formování struktury palindromu z ssDNA PUMA prostřednictvím pěti až šesti párů nukleotidů s krátkou smyčkou. Sekvence PUMA byla již dříve podrobena analýze CD spektroskopii [437]. Přestože byly vzorky hybridizovány v prostředí o nižší koncentraci draselných iontů ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl) byla pozorována přibližně stejná intenzita signálu $\Delta\epsilon$ s pozitivním píkem v oblasti vlnové délky 280 nm a negativním píkem při 250 nm.

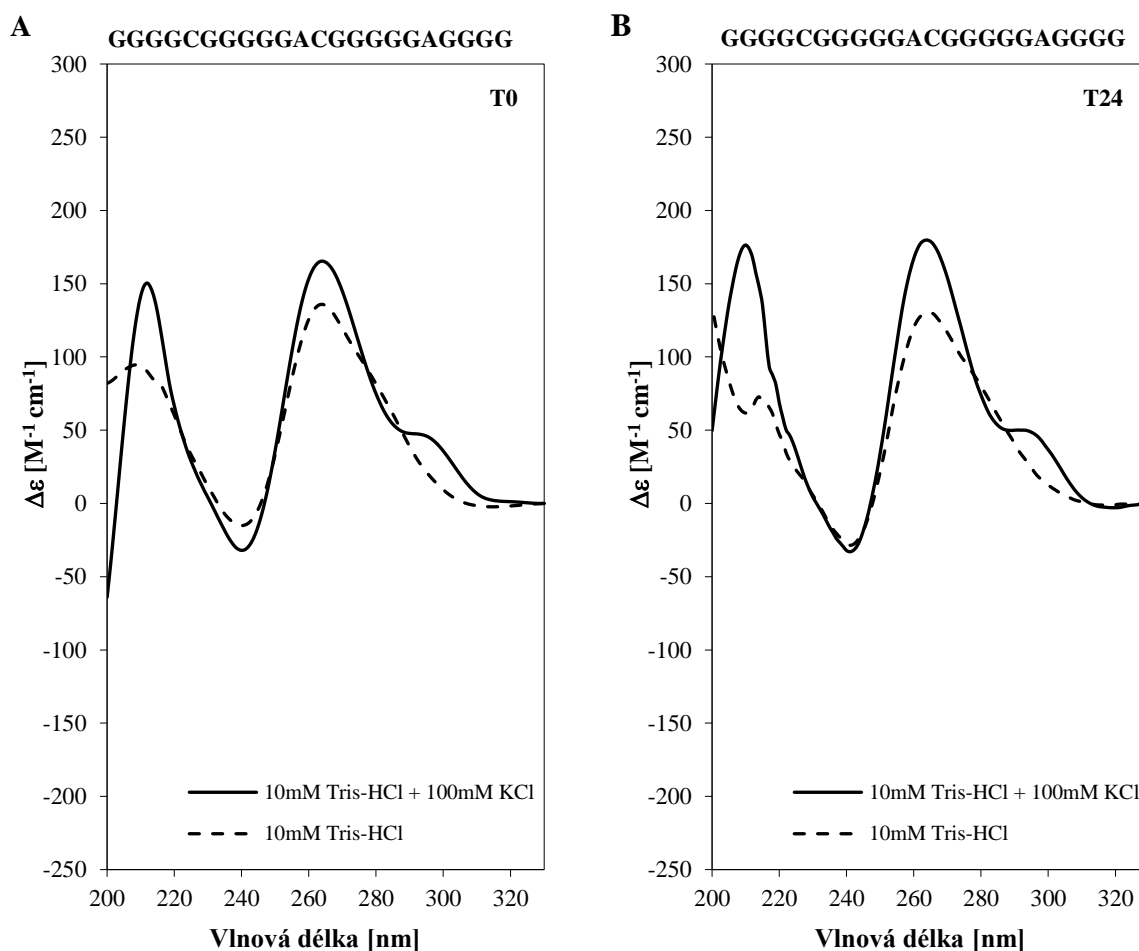


Obrázek 5.1.1: CD spektra vzorků oligonukleotidu PUMA v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí bez přidavku draselných iontů je vyneseno přerušovanou linií. Po přidavku draselných iontů nedochází ke změnám konformace vznikající struktury. Naměřená spektra v časech T_0 (A) i T_{24} (B) jsou charakterizována kladnými píky při vlnových délkách 280 a 220 nm a negativním píkem při vlnové délce 250 nm a nevykazují přítomnost G-kvadruplexu.

Na obrázku 5.1.2 jsou vynesena spektra vzorků oligonukleotidu KSHV. Sekvence oligonukleotidu KSHV byla odvozena z genomu herpesviru spojeného s Kaposiho sarkomem a programem *G4 Hunter* u ní byla predikována vysoká pravděpodobnost tvorby G-kvadruplexu (*G4 Hunter skóre* 3,182) při 90,9% podílu GC bází.

Z naměřených spekter v časech T_0 i T_{24} je jasně vidět, že v přítomnosti draselných iontů (plná linie) dochází k tvorbě paralelní struktury G-kvadruplexu, která je charakterizována výraznými kladnými píky při vlnových délkách 260 a 210 nm a záporným píkem při vlnové délce 240 nm. V obou časech naměřená spektra odpovídají spektrům paralelního G-kvadruplexu. Zvýšení intenzity $\Delta\epsilon$ v čase T_{24} ukazuje na stabilizaci a doformování vzniklých sekundárních struktur bez celkové změny konformace G4. Na obou spektrech vzorků v prostředí draselných iontů je rovněž přítomen menší kladný pík při vlnové délce 295 nm, který se objevuje i ve spektrech antiparalelních a hybridních konformací G-kvadruplexů. Za předpokladu, že by se jednalo o antiparalelní strukturu G-kvadruplexu, by byly naměřeny výrazné kladné píky při 295, 240 a 210 nm a záporný pík při 260 nm. V případě hybridní struktury G-kvadruplexu by byly naměřeny pouze pozitivní píky, a to při vlnových délkách 295, 260 a 210 nm [27]. Vzhledem k tomu, že v naměřených spektrech vzorků KSHV hybridizovaných v prostředí draselných iontů je přítomen negativní pík pouze při vlnové délce 240 nm, docházelo pravděpodobně k tvorbě hybridní struktury G-kvadruplexu. Přítomnost antiparalelní struktury nelze z CD spektra jednoznačně potvrdit, protože nebyl naměřen výraznější pozitivní pík při vlnové délce 240 nm. Spektra oligonukleotidu KSHV hybridizovaného v prostředí bez přítomnosti draselných iontů (přerušovaná linie) vykazují rovněž známky možné přítomnosti paralelní struktury G-kvadruplexu. Lze pozorovat pozitivní píky při 260 a 210 nm a negativní pík při 240 nm, které ovšem nedosahují tak výrazných signálů jako spektra vzorku s KCl. Rovněž je patrný posun píku při 260 nm k vlnové délce 280 nm, který byl pozorován u vzorku oligonukleotidu PUMA, u něž nebyla přítomnost G4 prokázána. Je tedy možné, že daná sekvence je schopna v omezené míře tvořit strukturu paralelního G-kvadruplexu i bez stabilizace draselnými ionty.

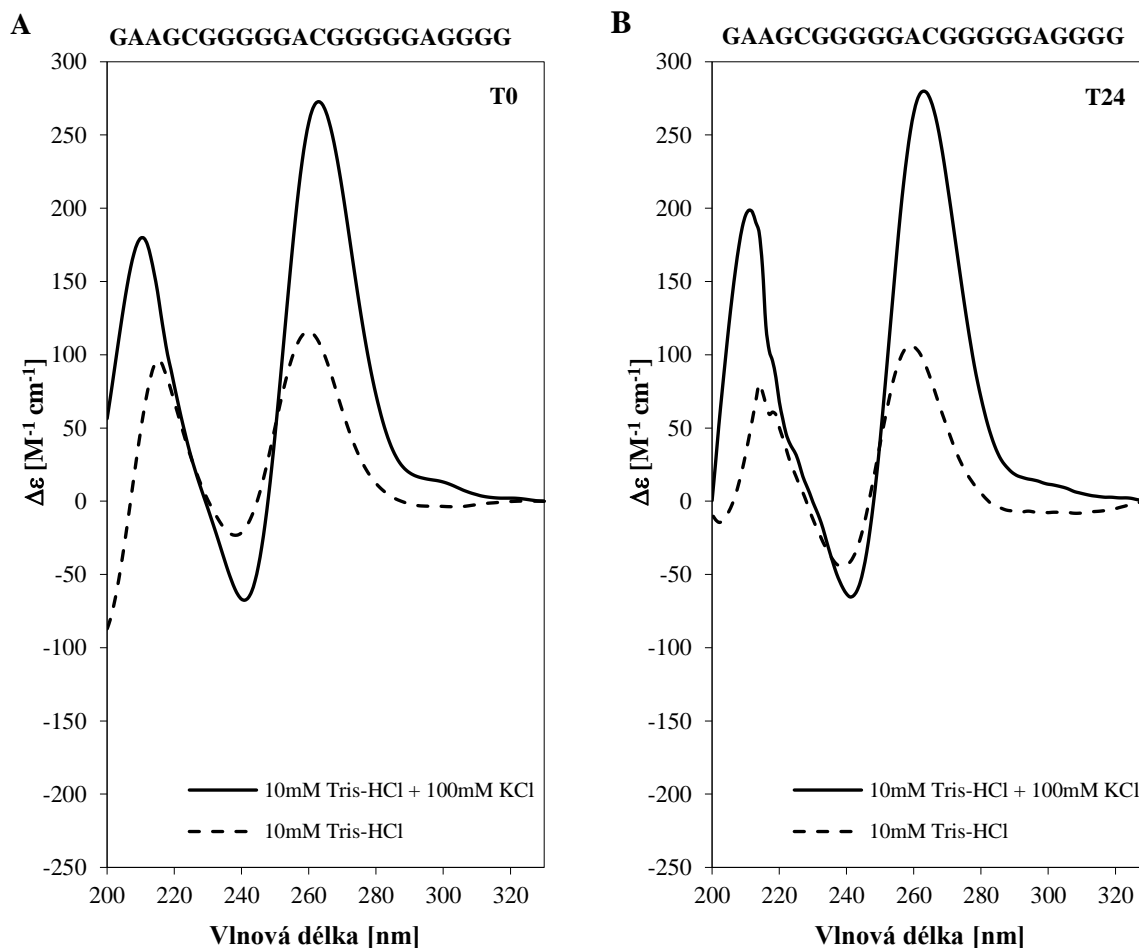
Stejných výsledků bylo dosaženo i v dříve publikované studii Porubiakové a Bohálové [437]. CD spektrum vzorku KSHV v prostředí obsahujícím draselné ionty ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) vykazuje stejné pozitivní píky při vlnových délkách 295 a 260 nm a negativní pík při vlnové délce 240 nm jako naměřená spektra vzorků KSHV v obou časech. Shodná jsou i dosažená maxima pozitivního píku při vlnové délce 260 nm kolem $150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Oproti publikované studii vykazovala naměřená spektra vzorků KSHV v prostředí draselných iontů nižší velikosti píku při 295 nm. Rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišnou koncentrací draselných iontů ve vzorcích (koncentrace draselných iontů byla oproti vzorkům v publikované práci dvojnásobná). Výsledky ukazují, že tvorba určité konformace G-kvadruplexu je závislá na koncentraci použitých kationtů. Velmi podobného spektra bylo dosaženo u G-bohaté oblasti v promotoru *c-MYC* se sekvencí d(TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGGAAGG) v přítomnosti $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ draselných iontů, u kterého byla zaznamenána tvorba paralelní konformace G4 v prostředí sodných i draselných iontů [27]. Paralelní struktura G-kvadruplexu byla pozorována rovněž u sekvence odvozené z promotoru genu *clpx Mycobacteria tuberculosis*, kde byla s rostoucí koncentrací draselných iontů pozorována zvyšující se hodnota maxima elipticity při vlnové délce 260 nm [444].



Obrázek 5.1.2: CD spektra vzorků oligonukleotidu KSHV v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektrum vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů je vyneseno přerušovanou linií. Po přidavku draselných iontů dochází k stabilizaci paralelní struktury G-kvadruplexu, která je charakterizována kladnými píky při vlnových délkách 260 a 210 nm a záporným pikem při 240 nm. Přítomnost menšího kladného píku při vlnové délce 295 nm a absence pozitivního píku při vlnové délce 240 nm ukazuje i na tvorbu hybridní struktury G-kvadruplexu.

Na obrázku 5.1.3 se nachází spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-1no, jehož sekvence byla odvozena ze sekvence KSHV, a u které byl programem *G4 Hunter* predikován vysoký potenciál tvorby G-kvadruplexu (*G4 Hunter skóre* 2,545) při 81,8% podílu GC bází. Spektra vzorku hybridizovaného bez přítomnosti draselných iontů nabývají kladných píků při vlnových délkách 260 a 216 nm a záporného píku při 239 nm. Ačkoliv se může zdát, že dochází k tvorbě paralelní struktury G-kvadruplexu, je naměřený signál příliš nízký a rovněž zde chybí pík při 210 nm charakteristický pro strukturu G-kvadruplexů [27]. U daného vzorku pravděpodobně nedochází k tvorbě G-kvadruplexu v prostředí bez stabilizujících iontů. Naopak u vzorku, který byl hybridizován v přítomnosti $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl jsou vidět výrazné pozitivní píky při vlnových délkách 264 a 211 nm a záporný pík při 241 nm, což ukazuje na přítomnost paralelní struktury G-kvadruplexu. Stejně jako u vzorku KSHV je na spektru vidět mírný nárůst signálu při vlnové délce 295 nm, který ukazuje spolu

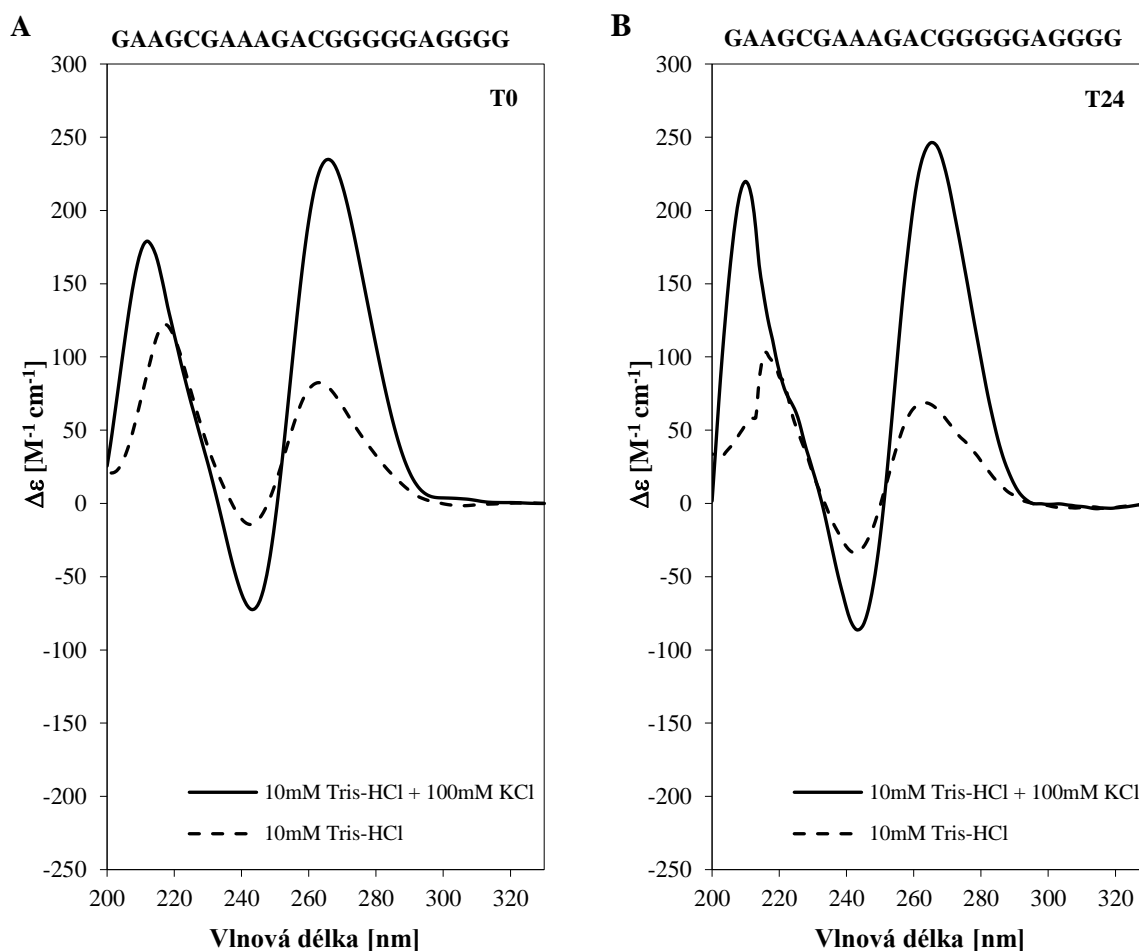
s pozitivními píky při 264 a 211 nm na možnou přítomnost hybridní struktury G-kvadruplexu. Bohužel z naměřeného CD spektra nelze určit, zda dochází k tvorbě pouze intramolekulárních struktur, nebo se na vzniku výsledných konformací G4 podílí více molekul a vznikají i struktury intermolekulární. V případě tvorby intramolekulárních struktur by nebyl možný vznik čtyř- nebo třítetradových G-kvadruplexů, protože u 5'-konce byly oproti sekvenci KSHV dvě guaninové báze substituovány adeninem. Nabízí se tak pouze tvorba dvoutetradových G-kvadruplexů nebo struktur složených z více molekul DNA.



Obrázek 5.1.3: CD spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-1no v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů jsou vynesena černou linií. Po přidavku draselných iontů dochází k formování paralelní struktury G-kvadruplexu, která je charakterizována kladnými píky při vlnových délkách 260 a 210 nm a záporným píkem při 240 nm. Spektrum vzorku hybridizovaného v prostředí bez přidavku KCl nabývá kladných píků při 260 a 216 nm a záporného píku při 239 nm, ale nevykazuje charakter spektra struktury G-kvadruplexu.

Na obrázku 5.1.4 se nachází spektra vzorků sekvence KSHV-2no, která byla stejně jako KSHV-1no odvozena ze sekvence oligonukleotidu KSHV. Přestože u sekvence KSHV-2no bylo oproti sekvenci KSHV pět guaninových bází substituováno za adenin, dosahovala vysokého G4 Hunter skóre (1,727) při 68,2% podílu GC bází. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí

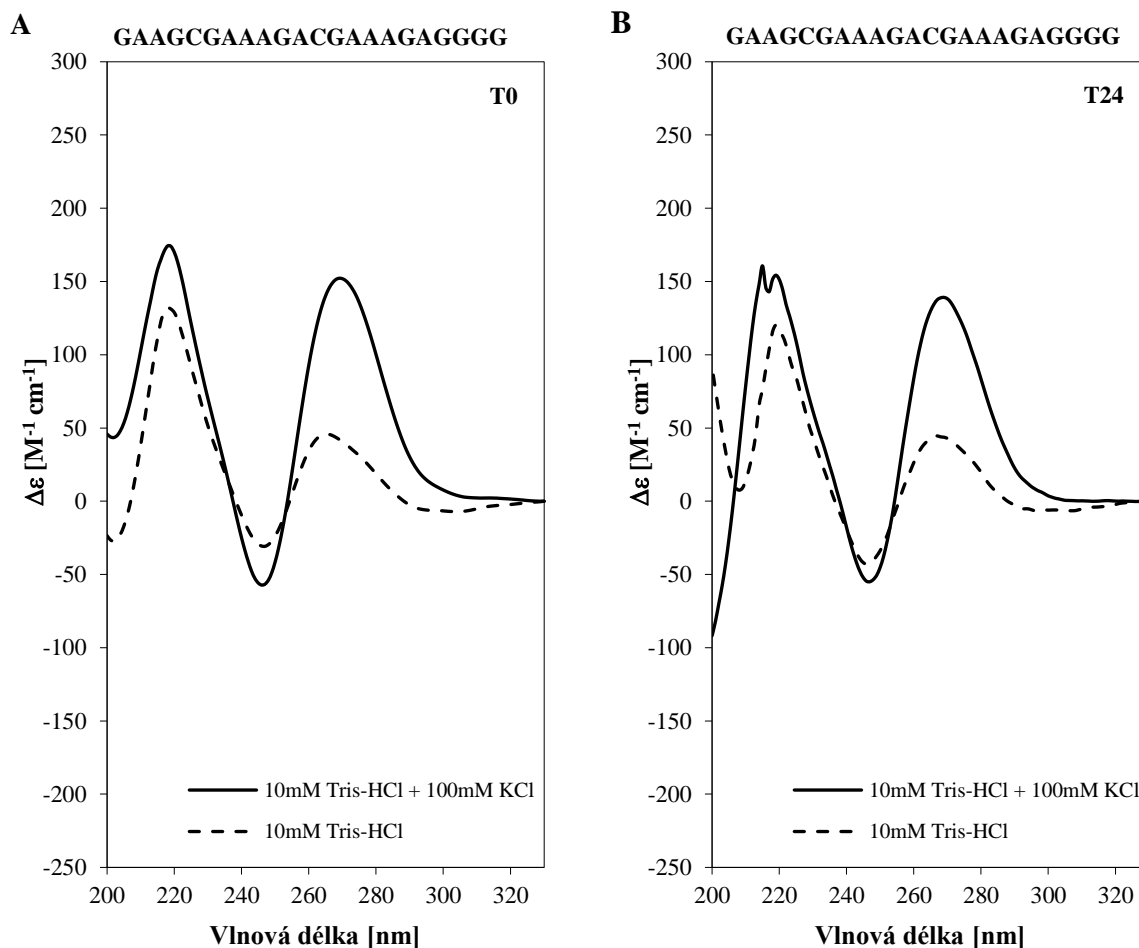
bez draselných iontů nabývají kladných píků při vlnových délkách 263 a 218 nm a záporného píku při 243 nm, což spolu s nízkými hodnotami elipticity ukazuje na absenci struktury G-kvadruplexu, stejně jako tomu bylo v případě vzorku KSHV-1no. Oproti tomu spektra vzorku KSHV-2no hybridizovaného v přítomnosti stabilizujících draselných iontů (plné linie) vykazují známky přítomnosti paralelní struktury G-kvadruplexu a nabývají kladných píků při vlnových délkách 266 a 213 nm a záporného píku při 244 nm. Ačkoliv je zde pík charakterizující G-kvadruplexy posunut až k vlnové délce 213 nm je naměřený signál oproti vzorku bez KCl velmi vysoký. Posun píků k vyšším vlnovým délkám, který je u obou vzorků KSHV-2no o něco vyšší než u vzorků sekvence KSHV-1no, může být způsoben přítomností více bází adeninu, které absorbují rovněž v oblasti vlnové délky 210 nm [27, 438] nebo vlivem interferencí způsobených použitím daného pufru. Podobný posun k vyšším vlnovým délkám byl pozorován i při charakterizaci sekvencí ssDNA aptamerů odlišujících hemagglutinin podtypů H1 a H5 u viru chřipky [445]. Při srovnání signálu vzorků hybridizovaných v přítomnosti draselných iontů vzorků KSHV-1no a KSHV-2no lze pozorovat vyšší signál naměřený u vzorku KSHV-1no, což ukazuje na vyšší stabilitu utvořených struktur G4, což koreluje s vyšším potenciálem tvorby G-kvadruplexu predikovaným programem *G4 Hunter*. Stejně jako v případě vzorku KSHV-1no, ovšem není možné z CD spektra určit procentuální zastoupení intramolekulárních a intermolekulárních struktur G4 nebo počet tetrad.



Obrázek 5.1.4: CD spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-2no v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů jsou vynesena přerušovanou linií. Po přidavku draselných iontů dochází k formování paralelní struktury G-kvadruplexu, která je charakterizována kladnými píky při vlnových délkách 260 a 210 nm a záporným píkem při 240 nm. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí bez přidavku KCl jsou charakterizována kladnými píky při vlnových délkách 263 a 218 nm a záporným píkem při 243 nm a nevykazují známky přítomnosti struktury G-kvadruplexu.

Na obrázku 5.1.5 se nachází spektra vzorků sekvence KSHV-3no. Sekvence KSHV-3no byla navržena tak, aby osm guaninových bází bylo substituováno adeninem a nebyla schopna tvořit strukturu G-kvadruplexu. Sekvence dosahovala *G4 Hunter skóre* 0,909 při 54,5% zastoupení GC párů bází, a tedy i velmi nízkou pravděpodobnost tvorby G4. CD spektra vzorku hybridizovaného v prostředí draselných iontů (plná linie) nevykazují známky přítomnosti G-kvadruplexu, stejně jako spektra vzorku hybridizovaného v čisté směsi $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (přerušovaná linie). Pozitivní píky obou spekter byly v časech T_0 i T_{24} naměřeny při 270 příp. 265 a 220 nm a záporný pik při 247 nm. Na spektrech vzorku obsahujícího draselné ionty je vidět mírný nárůst v oblasti vlnových délek 295 nm, který by stejně jako u vzorku KSHV a KSHV-1no mohl znamenat přítomnost hybridní struktury G-kvadruplexu. Další možností by mohla být i tvorba tetramolekulární struktury G4, ke které může u krátkých sekvencí bohatých na guaninové báze docházet, a které není možné z CD spekter

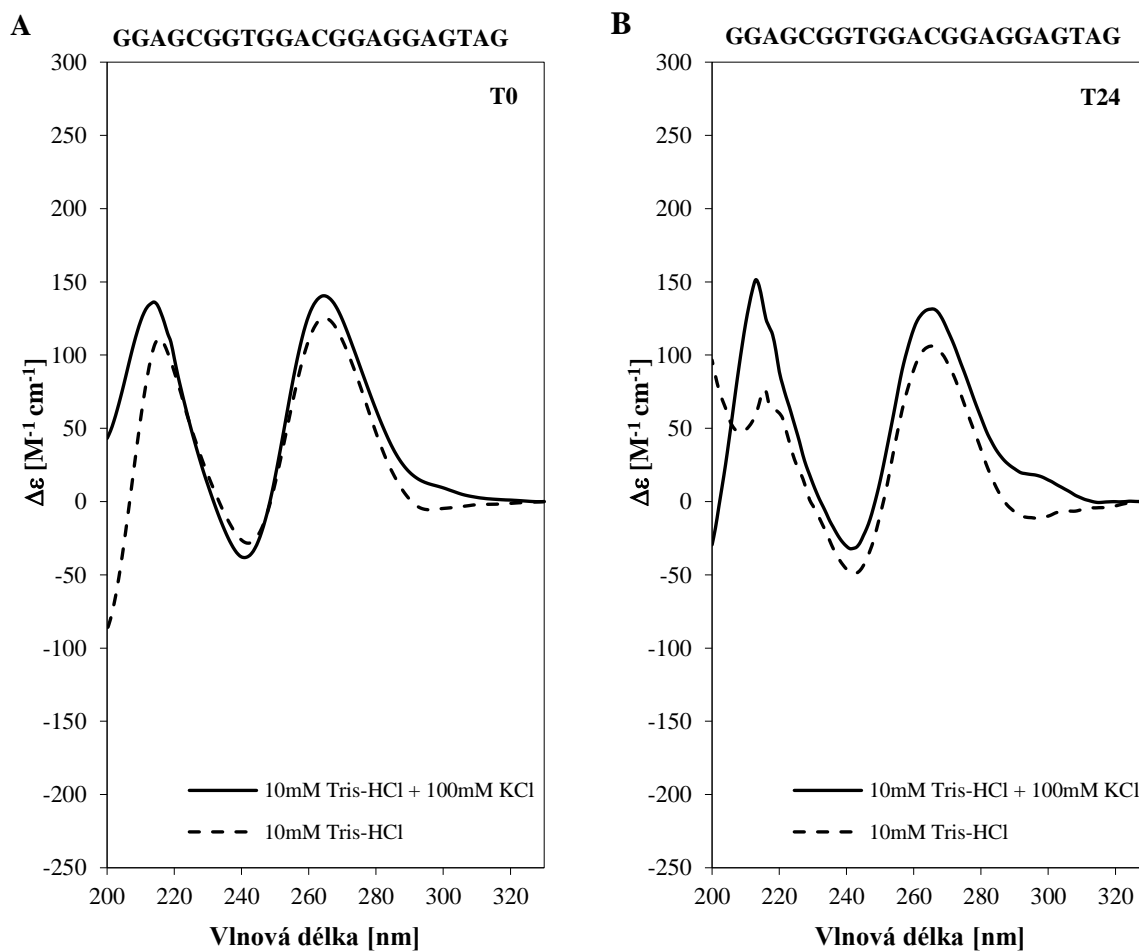
jednoznačně určit [446, 447]. Přítomnost velmi nízkého počtu zformovaných struktur G4 v přítomnosti draselných iontů by vysvětloval vyšší naměřenou hodnotu $\Delta\epsilon$ oproti vzorku bez KCl, ale u obou spekter je vidět jasná absence píku při 210 nm, který je pro struktury G4 charakteristický a rovněž nebylo v čase T_{24} pozorováno zvýšení měřeného signálu značící stabilizaci přítomných struktur. Naopak došlo u vzorku s KCl, stejně jako u vzorku PUMA, k deformaci píku při 220 nm. Vysoká hodnota píků v oblasti vlnové délky 220 nm je pravděpodobně způsobena převážně absorpcí vícečetných bází adeninu, stejně jako tomu bylo u vzorků KSHV-1no a KSHV-2no [27, 438.] .



Obrázek 5.1.5: CD spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-3no v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů jsou vynesena přerušovanou linií. U vzorků nedochází k tvorbě struktury G-kvadruplexu ani v přítomnosti draselných iontů během hybridizace. Spektra oligonukleotidu KSHV-3no hybridizovaného v prostředí obou pufrů jsou charakteristická kladnými píky při vlnových délkách 265 a 220 nm (hybridizace bez přítomnosti iontů K^+) 270 a 220 nm (hybridizace v přítomnosti iontů K^+) a záporným píkem při 247 nm, což neodpovídá žádnému ze spekter G-kvadruplexů.

Na obrázku 5.1.6 se nachází spektra vzorku KSHV-Mut1.0. Sekvence KSHV-Mut1.0 byla navržena programem *G4 Killer* ze sekvence KSHV, která byla programem mutována při prahové hodnotě 1,0. Výsledná sekvence KSHV-Mut1.0 dosahuje *G4 Hunter skóre* 0,955 při 68,2% zastoupení

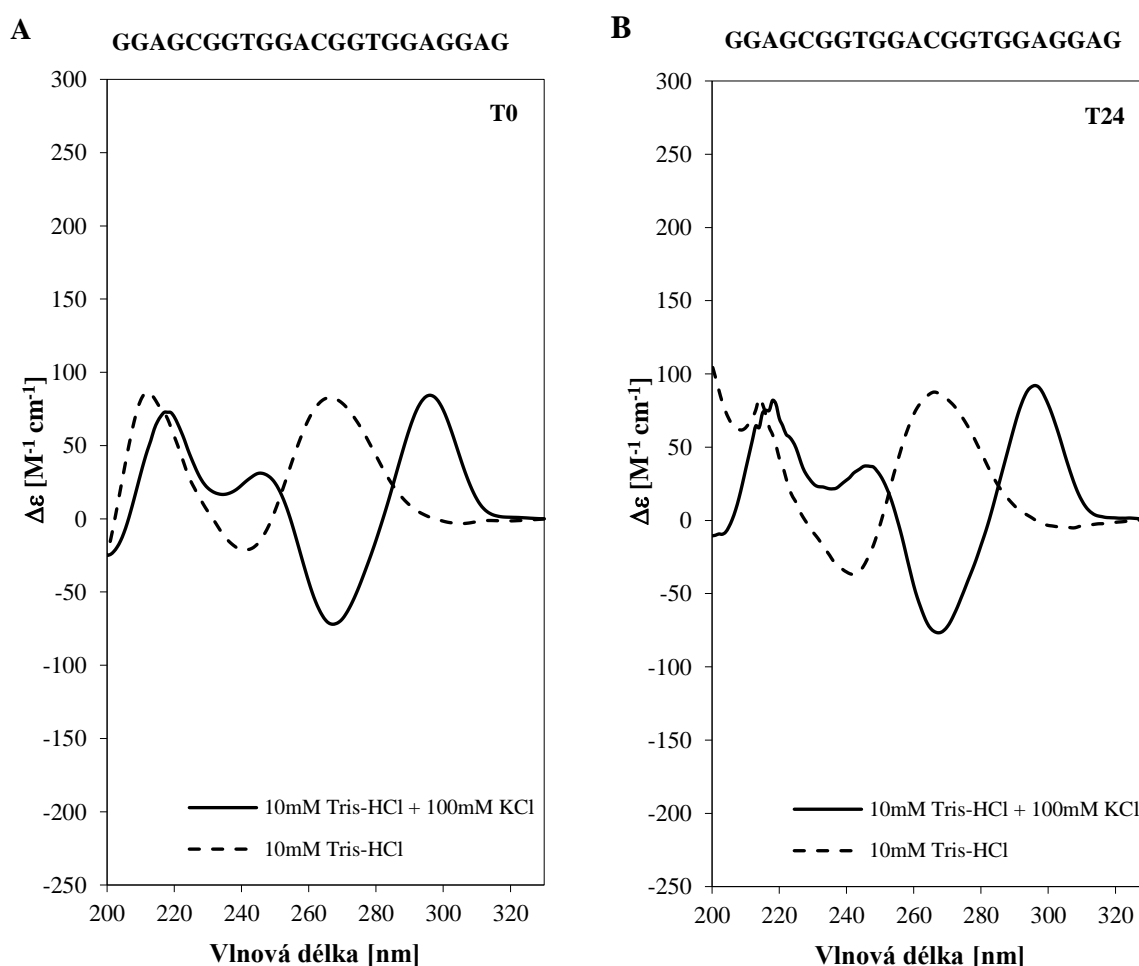
GC bázi. Obdobně jako sekvence KSHV-3no, vykazuje KSHV-Mut1.0 velmi nízký potenciál tvorby G-kvadruplexu. Spektra obou vzorků v čase T_0 dosahují kladných píků při vlnových délkách 265 a 215 nm a záporného píku při 242 nm. Naměřené hodnoty $\Delta\epsilon$ vzorků hybridizovaných v obou typech pufrů dosahují v čase T_0 podobných hodnot jako vzorky KSHV (kolem $150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Srovnání charakteru a velikostí píků vzorku s přidavkem KCl v časech T^0 a T^{24} ukazuje přítomnost stabilizovaných struktur G4, která se projevila nárůstem $\Delta\epsilon$ pozitivního píku vzorku s KCl v oblasti vlnové délky 210 nm charakteristické pro struktury G4 [27]. Spektrum vzorku v čase T_{24} vykazuje rovněž nárůst $\Delta\epsilon$ v oblasti vlnové délky 295 nm, která ukazuje na přítomnost hybridní konformace G4, jak bylo diskutováno výše.



Obrázek 5.1.6: CD spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-Mut1.0 v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů jsou vynesena přerušovanou linií. Přídavek draselných iontů indukuje tvorbu sekundární struktury G4. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí KCl (plné linie) vykazují charakter spektra paralelního G4.

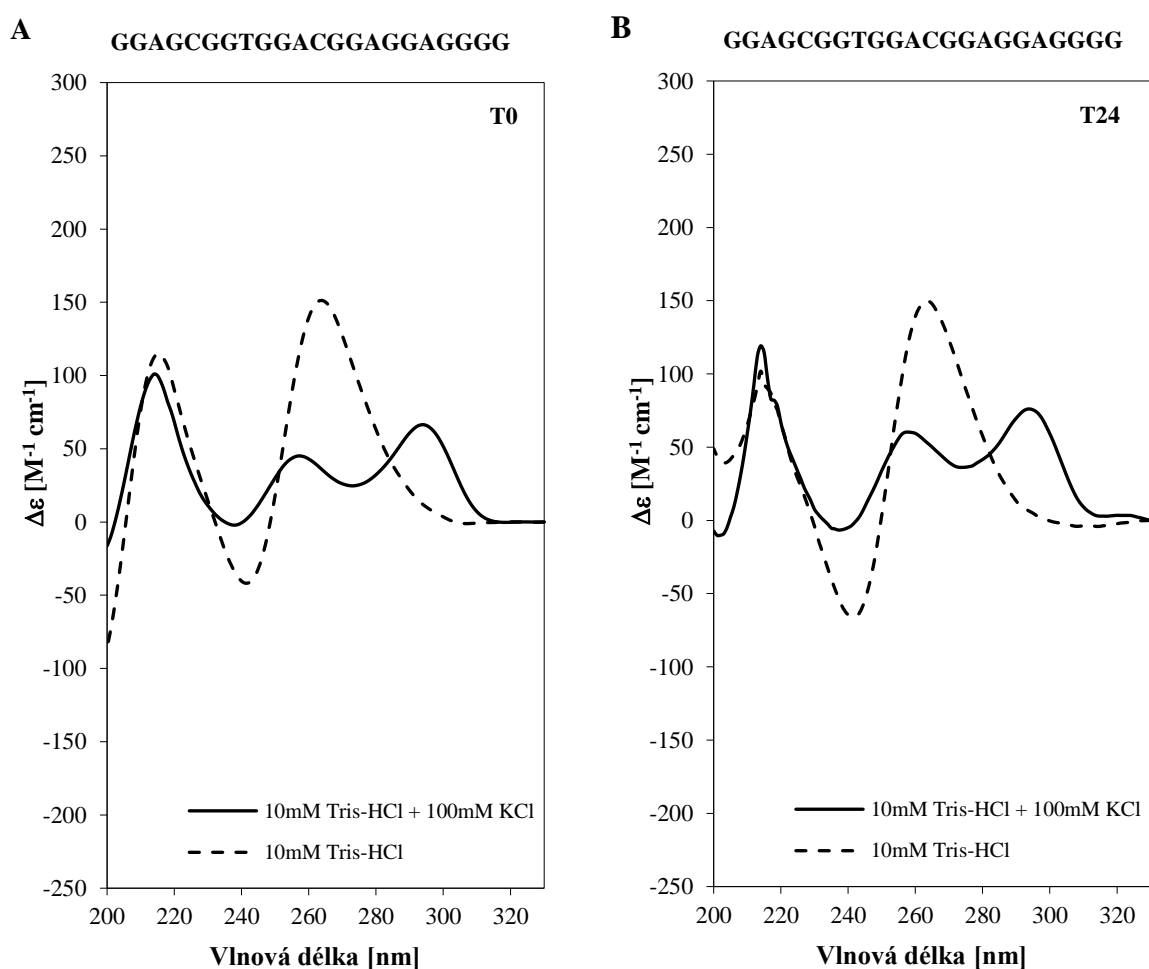
Na obrázku 5.1.7 jsou vynesena spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-Mut1.5. Sekvence KSHV-Mut1.5 byla navržena programem *G4 Killer* z původní sekvence KSHV. Sekvence KSHV byla mutována při prahové hodnotě *G4 Hunter skóre* 1,5. Výsledné *G4 Hunter skóre* KSHV-Mut1.5 dosahuje hodnoty 1,091 při 72,7% zastoupení GC bázi. Spektra vzorku hybridizovaného bez přidavku

draselných iontů (přerušovaná linie) dosahují pozitivních píků v oblasti 266 a 212 nm a negativního píku při 241 nm, což ukazuje na přítomnost paralelní struktury G4. Oproti tomu u vzorku hybridizovaném v pufru s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl dochází k výrazné změně konformace a stabilizaci antiparalelní struktury G-kvadruplexu, jejíž CD spektra jsou charakterizována kladnými píky při vlnových délkách 295, 240 a 210 nm a záporným píkem při 260 nm [27]. Spektra vzorku s přidavkem KCl vykazují posun pozitivních i negativních píků k vyšším vlnovým délkám (maxima pozitivních píků při 297, 247 a 218 nm a maximum záporného píku při 267 nm). Ačkoliv je pík charakterizující strukturu G4 (210 nm) posunut k vyšším vlnovým délkám (obdobně jako další naměřené píky), je nepravděpodobné, že by nedocházelo k tvorbě G4, protože naměřená spektra jsou v porovnání se spektry běžných forem DNA nezaměnitelná a ukazují na tvorbu antiparalelního G4 [27]. Obě spektra dosahují nízkých signálů, které byly dokonce nižší, než u vzorků KSHV-Mut1.0, takže je možné, že k posunu píků došlo vlivem přítomnosti nezformovaných struktur. Antiparalelní struktury G4 formují rovněž telomerické sekvence *Oxytricha* nebo trombin-vázající aptamer, který je tvořen pouze dvěma G-tetrádami [27].



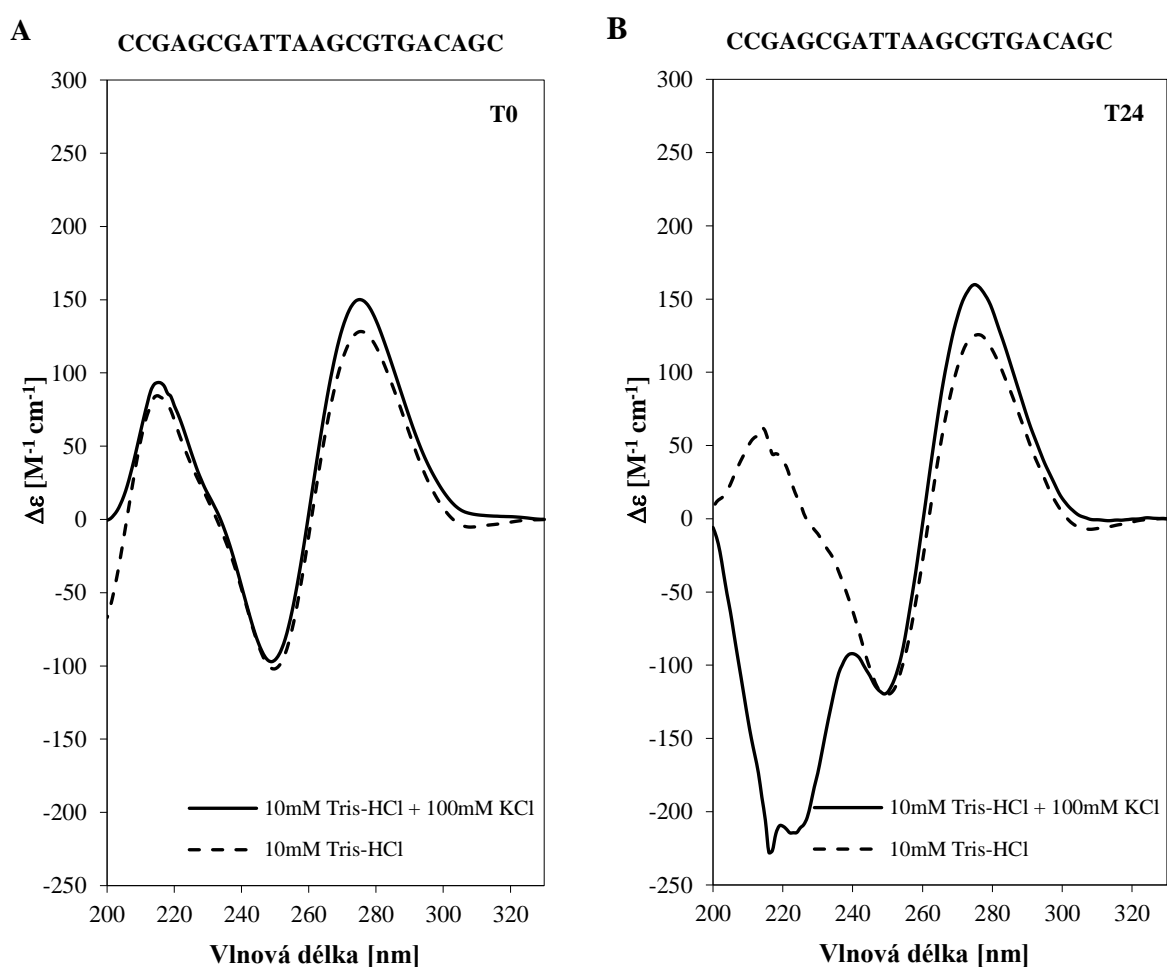
Obrázek 5.1.7: CD spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-Mut1.5 v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů jsou vynesena přerušovanou linií. Přídavek draselných iontů indukuje tvorbu antiparalelní konformace G4 charakteristické pozitivními píky při vlnových délkách 295, 240 a 210 nm a negativním píkem při 260 nm.

Na obrázku 5.1.8 jsou vynesena spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-Mut2.0. Sekvence KSHV-Mut2.0 byla navržena programem *G4 Killer* z původní sekvence KSHV. Sekvence KSHV byla mutována při prahové hodnotě *G4 Hunter skóre* 2,0. Výsledné *G4 Hunter skóre* KSHV-Mut2.0 bylo stanoveno na 1,591 při 77,3% zastoupení GC báží. CD spektra vzorků hybridizovaných v různých typech pufrů ukazují na tvorbu rozdílné konformace G4. Spektra vzorku hybridizovaného bez přítomnosti draselných iontů nabývá pozitivních píků při 264 a 216 nm a negativního píku při 242 nm, což naznačuje přítomnost paralelní struktury G-kvadruplexu. Spektra vzorku hybridizovaného v přítomnosti 100mmol·l⁻¹ KCl odpovídají CD spektrům hybridní konformace G-kvadruplexu s pozitivními píky při 295, 260 a 210 nm [27]. Je zajímavé, že přestože se sekvence KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0 odlišují pouze ve dvou párech nukleotidů, kdy se jedna dvojice nukleotidů nachází v oblasti *spaceru* (KSHV-Mut1.5: GGAGCGGTGGACGGTGGAGGAG vs. KSHV-Mut2.0: GGAGCGGTGGACGGAGGAGGGG), dochází při stabilizaci draselnými ionty k formování jiných konformací G4, což ukazuje na významný vliv jednonukleotidových smyček (*spacerů*) [448]. Tvorba hybridní konformace G4 je charakteristická pro lidské telomery [320].



Obrázek 5.1.8: CD spektra vzorků oligonukleotidu KSHV-Mut2.0 v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v 10mmol·l⁻¹ Tris-HCl s přidavkem 100mmol·l⁻¹ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí 10mmol·l⁻¹ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů jsou vynesena přerušovanou linií. U vzorku hybridizovaného bez přidavku draselných iontů byly naměřeny pozitivní píky při 264 a 216 nm a negativní píky při 242 nm, což ukazuje na tvorbu paralelní struktury G-kvadruplexu. Přídavek draselných iontů indukuje stabilizaci hybridní struktury G-kvadruplexu, jejíž CD spektra dosahují kladných píků při vlnových délkách 295, 260 a 210 nm.

Na obrázku 5.1.9 jsou vynesena spektra vzorků oligonukleotidu Random-22. Oligonukleotid Random-22 byl použit jako negativní kontrola, protože u něj nebyla předpokládána tvorba struktury G-kvadruplexu, což bylo potvrzeno i programem *G4 Hunter*. Spektrum vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl se v čase T_0 téměř neliší od spektra vzorku hybridizovaného v prostředí s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Obě spektra dosahují pozitivních píků při vlnových délkách 275 a 216 nm a negativního píku při 250 nm, což neodpovídá žádnému z CD spekter charakterizujících sekundární strukturu G-kvadruplexu. V čase T_{24} bylo u vzorku bez přidavku draselných iontů naměřeno spektrum odpovídající spektrům obou vzorků v čase T_0 . Oproti tomu spektrum vzorku s přidavkem draselných iontů v čase T_{24} ukazuje na změnu konformace DNA a nabývá pozitivního píku při vlnové délce 280 nm s negativními píky při 250 a 218 nm, které připomíná svým tvarem CD spektra A-formy DNA, která vykazují výrazný záporný pík při 210 nm, ale kladný pík při 260 nm (nikoliv 280 jako je tomu zde) [27].



Obrázek 5.1.9: CD spektra vzorků oligonukleotidu Random-22 v časech T_0 (A) a T_{24} (B). Plnou linií jsou vynesena spektra vzorku hybridizovaného v $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Spektra vzorku hybridizovaného v prostředí $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přidavku draselných iontů jsou vynesena přerušovanou linií. Naměřená CD spektra obou vzorků v čase T_0 dosahují pozitivních píků při 275 a 216 nm a negativního píku při 250 nm a nevykazují známky přítomnosti G-kvadruplexu. U vzorku hybridizovaného v prostředí stabilizujících draselných iontů dochází ke změnám konformace.

Ačkoliv se metoda cirkulárního dichroismu osvědčila jako velmi účinná při studiu nejen sekundárních struktur nukleových kyselin, skýtá určitá omezení při interpretaci spekter, jako např. neschopnost rozlišit přítomnost intra- a intermolekulárních G-kvadruplexů nebo G-triplexů na základě jednoduchých měření. Další komplikací při vyhodnocení je mírný posun píků způsobený vyhlazováním spekter a přítomnost vícečetných bází adeninu, které absorpcí mohou mírně zkreslit polohu vrcholu píku typického právě pro struktury G4 [27].

V již zmiňovaném článku Porubiakové a Bohálové byla uvedena CD spektra nejen samotných vzorků PUMA a KSHV, ale i sekvencí PUMA-KSHV a KSHV-PUMA, kdy obě spektra v přítomnosti draselných iontů ukazovala na přítomnost antiparalelní struktury G-kvadruplexu. Přestože oba vzorky obsahují stejný počet nukleotidů a liší se pouze v pozici umístěné sekvence PUMA (před nebo za strukturou G-kvadruplexu), byly pozorovány výrazné změny v hodnotě naměřené $\Delta\epsilon$ v oblasti 295 nm (maximum $\Delta\epsilon$ pro antiparalelní struktury G4) [437]. Rozdíly ve formování struktur G4 v přítomnosti sekvence PUMA je nutné zohlednit při posuzování vazby proteinu IFI16 *in vivo*, protože sousední sekvence KSHV a jeho mutované formy mohou ovlivňovat vedení vláken DNA a formování sekundárních struktur G4.

5.1.2 Charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu ThT vazebným fluorescenčním testem

Aby bylo možné potvrdit, nebo vyvrátit přítomnost sekundárních struktur G-kvadruplexů u analyzovaných sekvencí, byl proveden ThT fluorescenční vazebný test. Princip ThT testu je uveden v teoretické části této práce. Hlavním kritériem při vyhodnocení ThT vazebného testu je hodnota intenzity fluorescence vzorku vztažená na intenzitu fluorescence samotného pufru s thioflavinem T. Thioflavin T váže struktury G-kvadruplexu podstatně lépe, než struktury duplexů nebo *single stranded* oligonukleotidů a v minulosti bylo potvrzeno jeho použití jako spolehlivé G4 sondy [321].

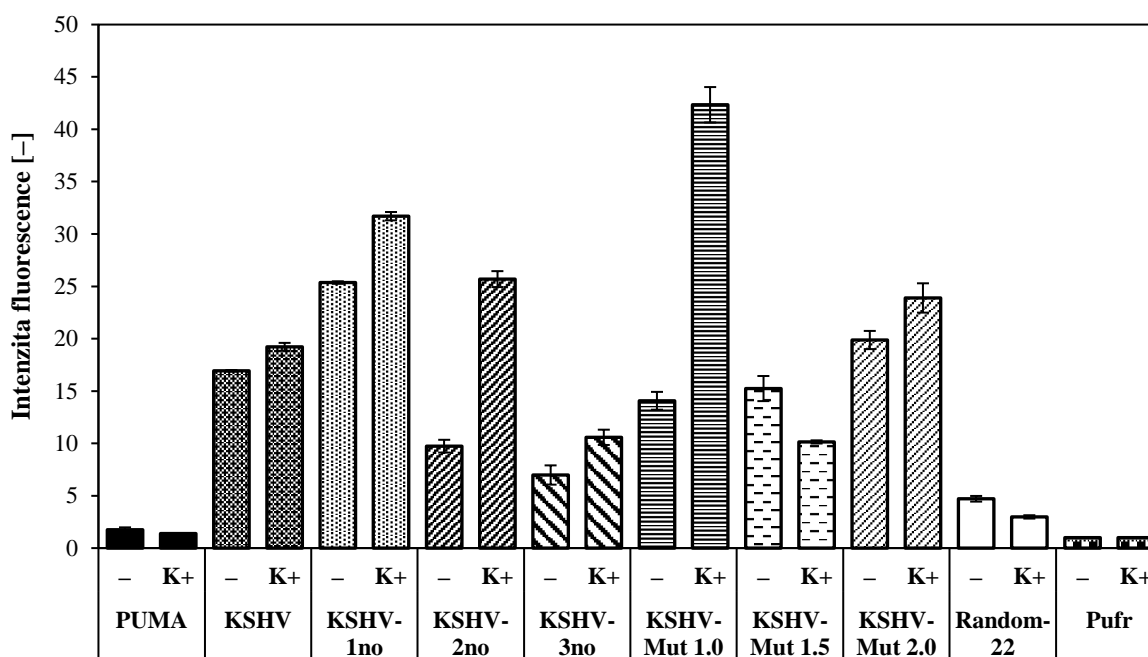
Vzorky zkoumaných oligonukleotidů o koncentraci $2 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ byly hybridizovány, stejně jako vzorky určené pro měření cirkulárního dichroismu, v prostředí Tris-HCl bez přídavku a s přídavkem $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl. Naměřené intenzity fluorescence jednotlivých vzorků oligonukleotidů byly vztáhnuty na intenzitu fluorescence samotného pufru s ThT a s příslušnými směrodatnými výběrovými odchylkami vyneseny do grafu (Obrázek 5.1.10). Jako pozitivní kontrola byl použit oligonukleotid KSHV, který dle naměřeného CD spektra (Obrázek 5.1.2) prokazatelně tvoří strukturu G-kvadruplexu. Jako negativní kontroly byly použity vzorky oligonukleotidů PUMA a Random-22, které netvoří struktury G4 ani v přítomnosti draselných iontů, což bylo potvrzeno analýzou sekvencí programem *G4 Hunter* a naměřenými CD spektry (Obrázek 5.1.1 a Obrázek 5.1.9).

Výsledky vzorků KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-3no v obou typech pufrů odpovídají předpokládanému trendu, tedy že s klesajícím *G4 Hunter skóre* klesá i potenciál tvorby G-kvadruplexu a tím i signál fluorescence. V roztoku $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl bez přídavku draselných iontů byly intenzity jednotlivých vzorků stanoveny na $25,36 \pm 0,12$ (KSHV-1no), $9,73 \pm 0,61$ (KSHV-2no) a $6,98 \pm 0,92$ (KSHV-3no). Přídavkem $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ draselných iontů došlo u všech vzorků k tvorbě a stabilizaci struktur G-kvadruplexů, což se projevilo naměřením vyšší intenzity fluorescence – $31,76 \pm 0,44$ (KSHV-1no), $25,69 \pm 0,76$ (KSHV-2no) a $10,58 \pm 0,73$ (KSHV-3no). Nejvíce se vliv draselných iontů na formování a stabilizaci sekundárních struktur G-kvadruplexů projevil u vzorku sekvence KSHV-2no. Intenzita fluorescence vzorku KSHV-2no v prostředí obsahující draselné ionty byla 2,64krát vyšší než intenzita fluorescence vzorku bez draselných iontů.

U KSHV-3no s KCl byla intenzita fluorescence 1,51krát vyšší, než u vzorku v čisté směsi Tris-HCl a u vzorku KSHV-1no byl pozorován nejnižší nárůst intenzity fluorescence – pouze 1,24násobek intenzity vzorku bez KCl. Výsledky naznačují, že u vzorků schopných tvořit struktury G4 i bez přidavku stabilizujících iontů, nehrají elektrostatické interakce iontů tak zásadní vliv, jako tomu je u sekvencí s menším potenciálem tvorby G-kvadruplexu. Zatímco u sekvence KSHV-1no postačuje k samsopřádání struktury G4 příspěvek vodíkových můstků, u sekvencí KSHV-2no i KSHV-3no přítomnost stabilizujících kladně nabitých iontů napomáhá kompenzaci negativního náboje cukr-fosfátové kostry molekul DNA nebo usnadnění párování guaninových bází nejen v rámci jedné molekuly [102]. Nárůst intenzity fluorescence u vzorku KSHV-3no, jehož sekvence byla navržena tak, aby nedocházelo k tvorbě intramolekulární struktury G4, ukazuje na možnou omezenou schopnost draselných iontů usnadnit i formování intermolekulárních struktur G-kvadruplexů.

U vzorků hybridizovaných v pufru bez draselných iontů, jejichž sekvence byly navrženy programem *G4 Killer* cílenou mutací původní sekvence KSHV, je pozorován stejný trend, tedy že nejnižší intenzitu fluorescence dosahují vzorky s nejnižším potenciálem tvorby G-kvadruplexu – KSHV-Mut1.0 ($14,07 \pm 0,85$) a KSHV-Mut1.5 ($15,24 \pm 1,20$), jejichž *G4 Hunter skóre* se vzájemně příliš neliší (Tabulka 4.1.2). Nejvyšší intenzity fluorescence dosáhl vzorek oligonukleotidu KSHV-Mut2.0, a to $19,87 \pm 0,87$. Oproti tomu u vzorků hybridizovaných v prostředí obsahující $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl docházelo pravděpodobně k destabilizaci přítomných struktur G4. Zatímco u vzorků KSHV-Mut1.0 ($42,34 \pm 1,69$) a KSHV-Mut2.0 ($23,89 \pm 1,40$) s KCl byly naměřeny vyšší intenzity fluorescence, což naznačuje stabilizaci struktur G4, u vzorku KSHV-Mut1.5 došlo ke snížení intenzity fluorescence ($10,14 \pm 0,15$), což ukazuje na tvorbu menšího počtu G-kvadruplexů. Naměřená CD spektra KSHV-Mut1.5 (Obrázek 5.1.7) ukázala u vzorku bez draselných iontů na možnou tvorbu paralelní struktury G-kvadruplexu a u vzorku v prostředí 10mM Tris-HCl s přidavkem $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl na tvorbu antiparalelní struktury G-kvadruplexu. Je možné, že ačkoliv dochází vlivem přítomnosti draselných iontů k formování antiparalelní konformace G-kvadruplexu, je množství zformovaných sekundárních struktur nižší. Na možnou destabilizaci a tvorbu menšího množství G4 v přítomnosti draselných iontů poukazuje i posun píků na CD spektru a nižší signál oproti vzorku v Tris-HCl bez KCl. Dalším vysvětlením by mohla být preference ThT k paralelním strukturám G-kvadruplexu [449–451].

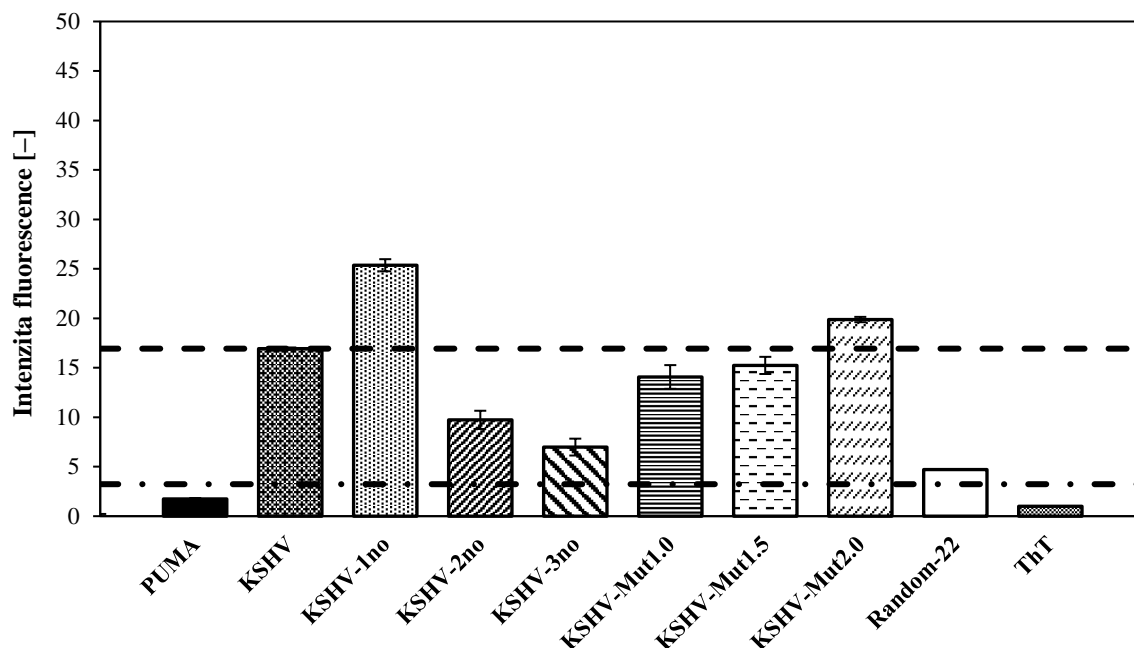
. Ze vzorků, které byly hybridizovány v prostředí draselných iontů, dosahoval i přes nízké *G4 Hunter skóre* nejvyšší intenzity fluorescence vzorek oligonukleotidu KSHV-Mut1.0, který byl 3,0krát vyšší, než tomu bylo u vzorku bez přítomnosti KCl. Takto významný příspěvek draselných iontů na tvorbu a stabilizaci struktur G-kvadruplexů by se teoreticky měl projevit i při charakterizaci sekvencí CD spektroskopii, která ovšem neukázala výrazné rozdíly v naměřených signálech (Obrázek 5.1.6). Vzhledem k možné stabilizaci G4 i u sekvence KSHV-3no, která nemohla tvořit intramolekulární struktury, je možné, že v případě vzorku KSHV-Mut1.0 s nízkým potenciálem tvorby G-kvadruplexu docházelo vlivem draselných iontů k tvorbě a stabilizaci významného množství intermolekulárních struktur G-kvadruplexů. Protože vzorky připravené pro měření CD spektroskopie obsahovaly mnohonásobně nižší koncentraci DNA než vzorky pro ThT vazebný experiment, mohlo docházet k tvorbě a stabilizaci jiných struktur.



Obrázek 5.1.10: Vyhodnocení ThT testu na potenciál tvorby G-kvadruplexu u sledovaných sekvencí oligonukleotidů.

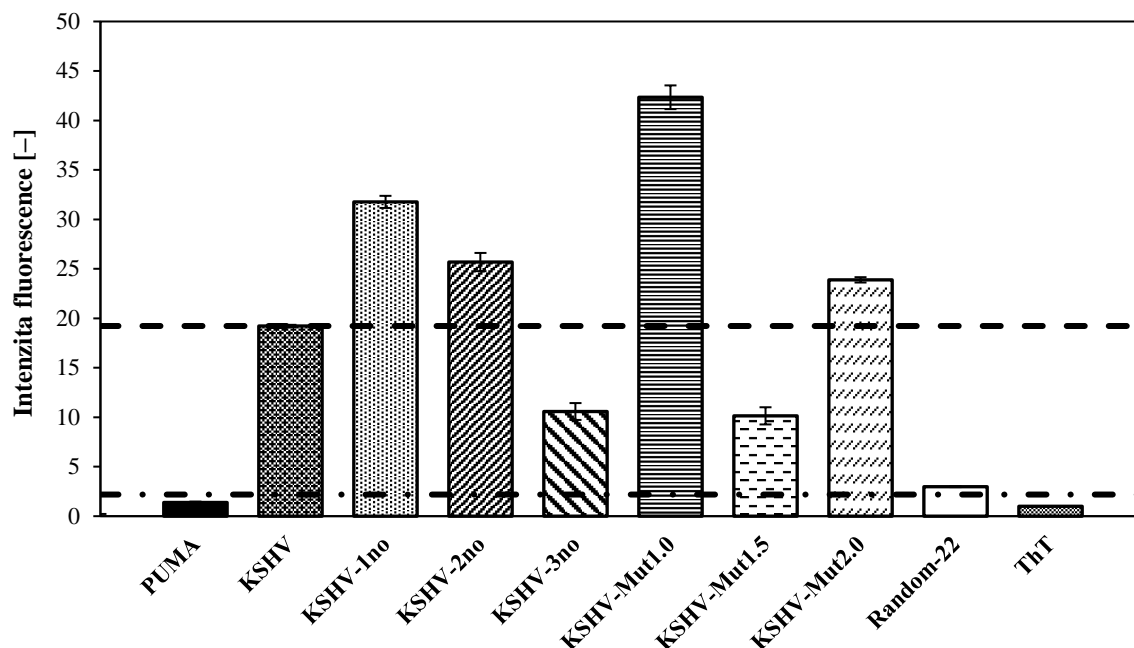
Pro posouzení tvorby G-kvadruplexu byly vzorky, vyjma kontrol, rozděleny do tří kategorií na základě stanovené intenzity fluorescence – Potvrzená tvorba G4, Možná tvorba G4 a Nepravděpodobná tvorba G4. Jako spodní mezní hodnota pro možnou tvorbu G-kvadruplexu byla určena průměrná intenzita fluorescence vzorků oligonukleotidů PUMA a Random-22 a jako horní mezní hodnota byla vybrána intenzita fluorescence vzorku oligonukleotidu KSHV. Protože bylo prokázáno, že tvorba a stabilizace struktur G-kvadruplexů je ovlivněna přítomností draselných iontů [102], byly zvlášť posuzovány výsledky vzorků hybridizované v prostředí Tris-HCl (Obrázek 5.1.11) a zvlášť výsledky vzorků v Tris-HCl s přidavkem KCl (Obrázek 5.1.12).

Jak je vidět na obrázku 5.1.11, dosahovaly v prostředí Tris-HCl bez draselných iontů vzorky KSHV-1no a KSHV-Mut2.0 vyšší hodnoty intenzity fluorescence než pozitivní kontrola KSHV. To ukazuje na tvorbu struktury G-kvadruplexu i bez přidavku stabilizujících iontů. U vzorků KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut1.0 byly rovněž naměřeny vysoké hodnoty intenzity fluorescence, které ovšem nepřesáhly hodnotu pozitivní kontroly KSHV. Spolu se vzorky KSHV-2no a KSHV-3no byly označeny jako oligonukleotidy s možnou tvorbou G-kvadruplexu. Vyšší intenzita fluorescence vzorku KSHV-3no může být způsobena i schopností ThT vázat se na kapsy mezi páry adeninu jako tomu bylo i v případě vzorků negativních kontrol bohatých na adenin GA8 a GA12 [449]. Na základě naměřené intenzity je vidět, že přítomnost G4 je u KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut1.0 vyšší než u KSHV-2no a KSHV-3no.



Obrázek 5.1.11: Vyhodnocení ThT testu na potenciál tvorby G-kvadruplexu u vzorků hybridizovaných bez přidavku draselných iontů. Čerchovaná linie značí průměr naměřených intenzit fluorescence negativních kontrol PUMA a Random-22 v příslušném pufru. Přerušovaná linie značí intenzitu fluorescence pozitivní kontroly (vzorku KSHV v příslušném pufru).

Stejným způsobem byla posuzována přítomnost G-kvadruplexů u vzorků hybridizovaných v Tris-HCl s přidavkem KCl (Obrázek 5.1.12). Jak již bylo dříve zmíněno, dosáhl nejvyšší intenzity fluorescence vzorek KSHV-Mut1.0 po němž následovaly KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut2.0, které byly souhrnně označeny jako vzorky s potvrzenou tvorbou G-kvadruplexu. Vzorky KSHV-3no a KSHV-Mut1.5 byly označeny jako vzorky s možnou tvorbou G4, přičemž u KSHV-3no došlo k nárůstu a u KSHV-Mut1.5 k poklesu intenzity fluorescence oproti vzorkům bez KCl. Vzorky označené *KSHV-Mut*, teoreticky umožňují tvorbu dvoutetradových struktur G-kvadruplexů díky přítomnosti dvojic G-bází v sekvenci. Je možné, že v prostředí bez draselných iontů dochází u sekvencí tohoto typu k samovolnému formování intramolekulárních G4, zatímco příspěvek draselných iontů napomáhá formování intermolekulárních G, což by vysvětlovalo nárůst intenzity fluorescence vzorku KSHV-Mut1.0.



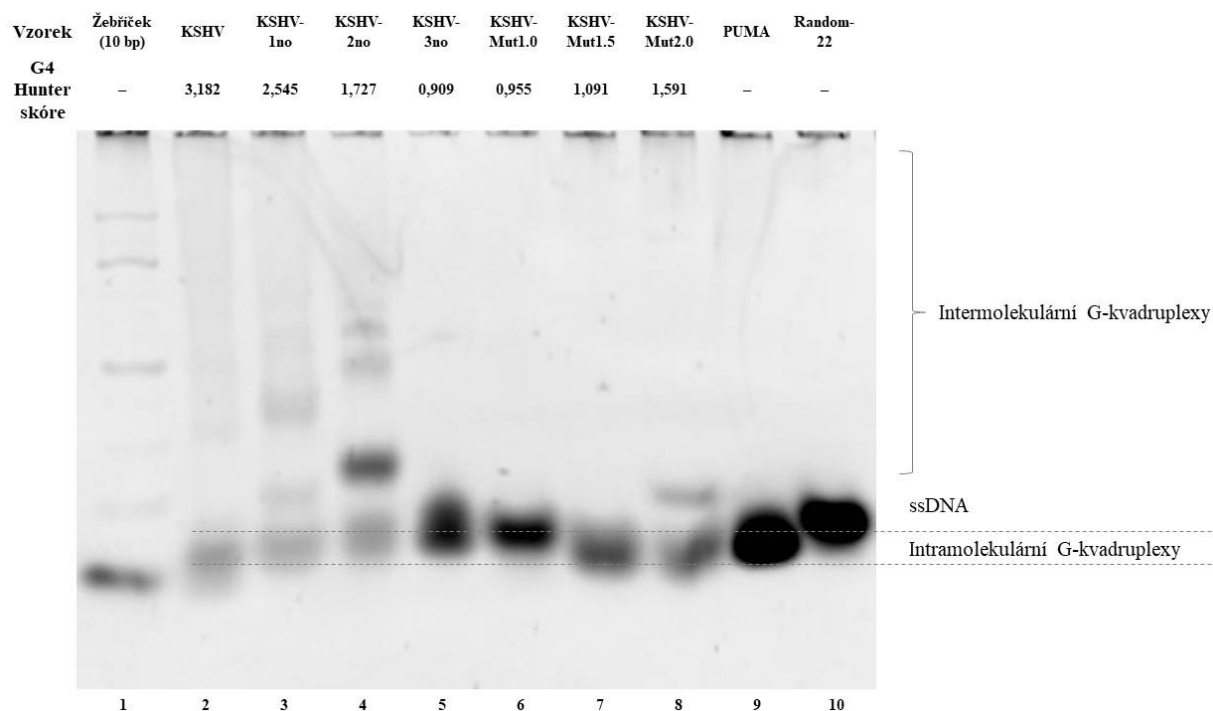
Obrázek 5.1.12: Vyhodnocení ThT testu na potenciál tvorby G-kvadruplexu u vzorků hybridizovaných s přidavkem draselných iontů. Čerchovaná linie značí průměr naměřených intenzit fluorescence negativních kontrol PUMA a Random-22 v příslušném pufru). Přerušovaná linie značí intenzitu fluorescence pozitivní kontroly (vzorku KSHV v příslušném pufru).

5.1.3 Elektroforetický test posunu mobility (EMSA)

Formování intra- nebo intermolekulárních struktur G-kvadruplexů z analyzovaných sekvencí DNA (Tabulka 4.1.2) bylo sledováno prostřednictvím elektroforetického testu posunu mobility v 8% polyakrylamidovém gelu o tloušťce 1,5mm. Vzorky syntetických oligonukleotidů o koncentraci $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v prostředí pufrů o složení $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ EDTA}$ a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ nebo $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ EDTA}$ a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ s přidavkem $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KCl}$ byly denaturovány a postupně ochlazeny 24 hodin na laboratorní teplotu. Na gel bylo naneseno 500 ng vzorků DNA. Metoda spočívá v rozdílné elektroforetické mobilitě molekul při separaci v polyakrylamidovém gelu. Molekuly intermolekulárních struktur G-kvadruplexů vykazují nižší elektroforetickou mobilitu, než vzorky intramolekulárních G4 nebo ssDNA kvůli molekulové hmotnosti vzniklé struktury. Oproti tomu intramolekulární G-kvadruplexy vykazují vyšší mobilitu než vzorky ssDNA, protože dochází ke sbalení DNA do stabilizované sekundární struktury, která snáze migruje prostředím gelu [323].

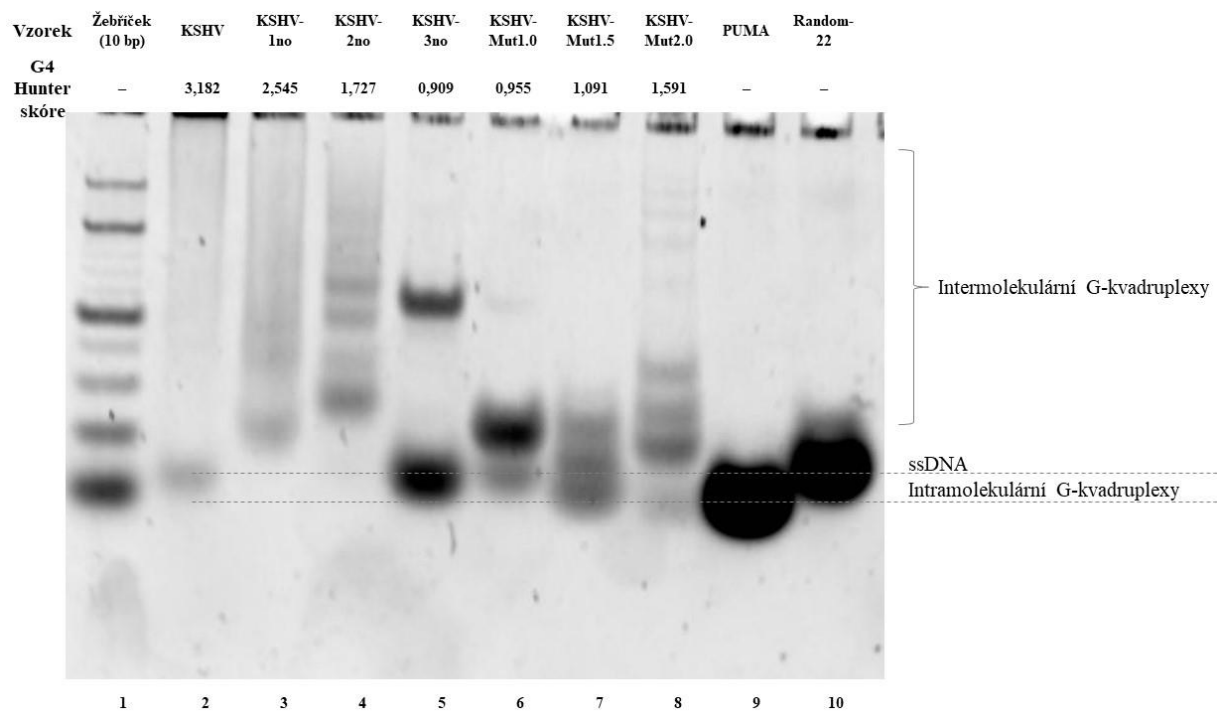
Na obrázku 5.1.13 je snímek gelu vzorků hybridizovaných bez přidavku draselných iontů. Vyznačené linie naznačují hranice pro ssDNA a intramolekulární G-kvadruplexy. Komplexy o vyšší molekulové hmotnosti, které vykazovaly migraci do kratších vzdáleností od startů gelů byly označeny jako intermolekulární struktury G-kvadruplexů. Z výsledků vyplývá, že vzorky KSHV, KSHV-1no, KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0 tvoří intramolekulární strukturu G4. K tvorbě intermolekulárních struktur G4 docházelo u vzorků KSHV, KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut2.0. Na rozdíl od prvních tří vzorků, vykazoval vzorek KSV-Mut2.0 preferenční vazbu jedné konformace intermolekulárního G4. Preferenční tvorba jedné z intermolekulárních struktur byla pozorována i u vzorku KSHV-2no (nejsilnější band), u kterého byla pozorována přítomnost nejméně dvou dalších

preferovaných struktur G4. Vzorky KSHV a KSHV-1no formovaly vícečetné konformace G4, které se projeví poklesem intenzity signálu. Oproti tomu vzorky KSHV-3no, KSHV-Mut1.0, PUMA a Random-22 neukazují na tvorbu žádné sekundární struktury. Vzorek PUMA migroval do větší vzdálenosti od startu než negativní kontrola Random-22, protože oproti ostatním vzorkům je jeho sekvence o dva nukleotidy kratší. Intenzita bandu KSHV-3no je přibližně poloviční, než bandy vzorků PUMA a Random-22. To je možné vysvětlit nespecifickou tvorbou sekundární struktury v takové koncentraci, která nebyla barvivem *Stains-All* zachycena podobně jako je to u vzorku KSHV, kde je možné pozorovat pás složený z více typů konformací G4.



Obrázek 5.1.13: Elektroforetický test posunu mobility oligonukleotidů s potenciálem tvorby G-kvadruplexu v pufru bez obsahu draselných iontů. Spodní linie označují hranice pro migraci intramolekulárních G-kvadruplexů a ssDNA. Start 1 obsahuje DNA žebříček. Do startů 2–10 bylo naneseno 500 ng vzorku KSHV (start 2), KSHV-1no (start 3), KSHV-2no (start 4), KSHV-3no (start 5), KSHV-Mut1.0 (start 6), KSHV-Mut1.5 (start 7), KSHV-2.0 (start 8), PUMA (start 9) a Random-22 (start 10).

Na obrázku 5.1.14 je snímek gelu vzorků hybridizovaných v přítomnosti draselných iontů. U všech vzorků s výjimkou PUMA a Random-22 dochází k tvorbě sekundárních struktur G-kvadruplexu. Srovnání gelů na obrázcích 5.1.13 a 5.1.14 potvrzuje preferenční stabilizaci intermolekulárních struktur G4 v prostředí obsahující KCl. Tvorba intramolekulárních struktur byla pozorována u vzorků KSHV, KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0. Vzorky KSHV-1no, KSHV-2no, KSHV-3no vykazovaly tvorbu pouze intermolekulárních struktur G4. Výrazná preference jedné konformace G4 nastala u vzorků KSHV-3no a KSHV-Mut1.0, čemuž odpovídají i výsledky předešlé biofyzikální charakterizace CD spektroskopii a ThT vazebným testem. Naopak vzorky KSHV, KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut2.0 tvořily vícečetné struktury o různé molekulové hmotnosti.



Obrázek 5.1.14: Elektroforetický test posunu mobility oligonukleotidů s potenciálem tvorby G-kvadruplexu v pufru v přítomnosti stabilizujících draselných iontů. Spodní linie označují hranice pro migraci intramolekulárních G-kvadruplexů a ssDNA. Start 1 obsahuje DNA žebříček. Do startů 2–10 bylo nanášeno 500 ng vzorku KSHV (start 2), KSHV-1no (start 3), KSHV-2no (start 4), KSHV-3no (start 5), KSHV-Mut1.0 (start 6), KSHV-Mut1.5 (start 7), KSHV-2.0 (start 8), PUMA (start 9) a Random-22 (start 10).

5.1.4 Shrnutí biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu

Výsledná charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu byla na základě měření CD spektroskopie, ThT vazebného fluorescenčního testu a elektroforetického testu posunu mobility shrnuta do tabulek 5.1.1 a 5.1.2. Vzorky oligonukleotidů bez přídavku stabilizujících draselných iontů vykazují výraznou preferenci k formování inter- i intramolekulární paralelní struktury G-kvadruplexu (KSHV, KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut2.0). Vzorek KSHV-Mut1.5 vykazoval jako jediný preferenci k tvorbě intramolekulární paralelní konformace G4.

Tabulka 5.1.1: Výsledná biofyzikální charakterizace vzorků sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu hybridizovaných v prostředí bez draselných iontů.

	Zařazení z testu ThT	Konformace G4 (CD spektra)	Inter-/Intra- G-kvadruplex
PUMA	Negativní kontrola	–	–
KSHV	Pozitivní kontrola	Paralelní	Inter-/Intra-
KSHV-1no	Potvrzená tvorba G4	Paralelní	Inter-/Intra-
KSHV-2no	Možná tvorba G4	Paralelní	Inter-/Intra-
KSHV-3no	Možná tvorba G4	–	–
KSHV-Mut1.0	Možná tvorba G4	–	–
KSHV-Mut1.5	Možná tvorba G4	Paralelní	Intra-
KSHV-Mut2.0	Potvrzená tvorba G4	Paralelní	Inter-/Intra-
Random-22	Negativní kontrola	–	–

Přidavek draselných iontů indukoval tvorbu G-kvadruplexu u všech sekvencí se stanoveným *G4 Hunter skóre* včetně vzorku KSHV-3no a usnadnil formování intermolekulárních struktur G4. Výsledky ukazují, že zatímco sekvence s dostatečným počtem G-bází formují G4 z různého počtu řetězců, vzorky mutovaných sekvencí jsou schopny formovat spíše struktury intramolekulárních G4 nebo G4 z menšího počtu řetězců DNA s menší molekulovou hmotností (migrace do větší vzdálenosti od startů gelu).

Tabulka 5.1.2: Výsledná biofyzikální charakterizace vzorků sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu hybridizovaných v prostředí obsahující 100 mmol·l⁻¹ KCl.

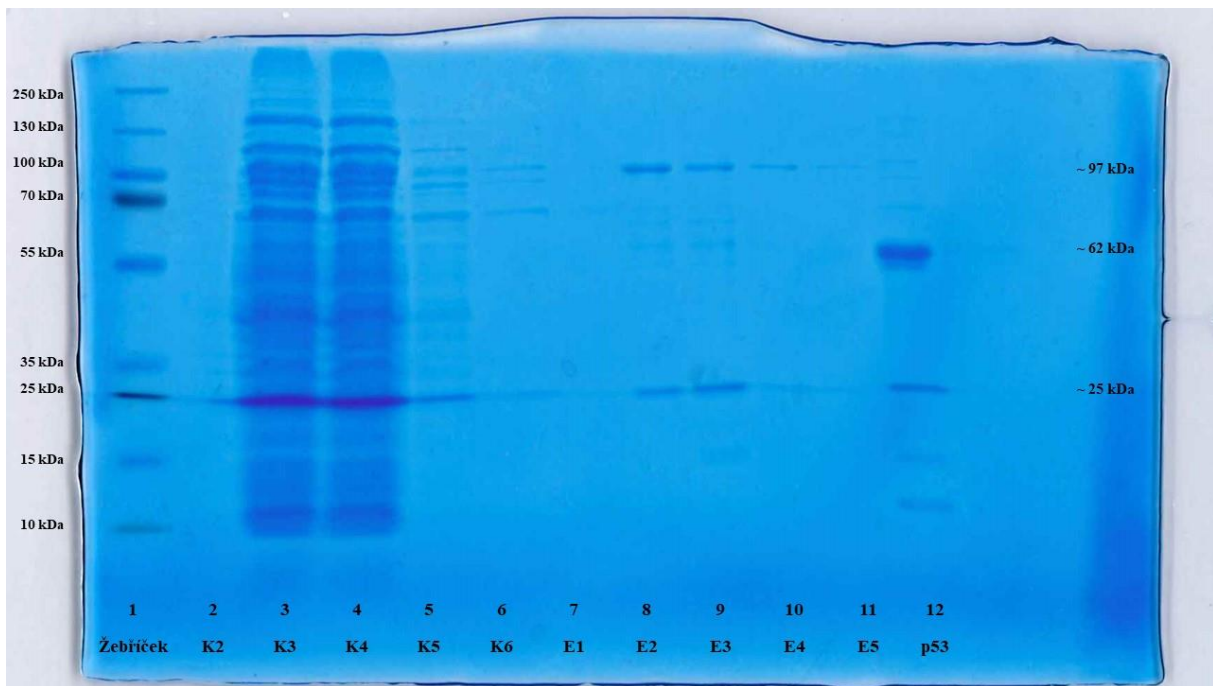
	Zařazení z testu ThT	Konformace G4 (CD spektra)	Inter-/Intra- G-kvadruplex
PUMA	Negativní kontrola	–	–
KSHV	Pozitivní kontrola	Paralelní	Inter-/Intra-
KSHV-1no	Potvrzená tvorba G4	Paralelní	Inter-
KSHV-2no	Potvrzená tvorba G4	Paralelní	Inter-
KSHV-3no	Možná tvorba G4	–	Inter-
KSHV-Mut1.0	Potvrzená tvorba G4	Paralelní	Inter-
KSHV-Mut1.5	Potvrzená tvorba G4	Antiparalelní	Inter-/Intra-
KSHV-Mut2.0	Potvrzená tvorba G4	Hybridní	Inter-/Intra-
Random-22	Negativní kontrola	–	–

5.2 Izolace, purifikace a stanovení koncentrace proteinu IFI16

Jedním z cílů této diplomové práce bylo studium vazby proteinu IFI16 na DNA *in vitro*. K tomu bylo třeba získat čistý, nefragmentovaný a funkční protein IFI16 plné délky v co možná nevyšší koncentraci. Protein IFI16 byl izolován proteinovou afinitní chromatografií z již předem připravené bakteriální kultury kompetentních buněk *E. coli* BL21-CodonPlus transformované plazmidovým vektorem pET15b, který exprimuje protein IFI16 plné délky fúzovaný s polyhistidinovou kotvou (His-tag) a obsahuje selekční markery pro antibiotika ampicilin a chloramfenikol.

Proces izolace proteinu sestával ze tří kroků, kterými byly příprava bakteriální kultury, lýze bakteriálních buněk a samotná izolace proteinu IFI16 z buněčného lyzátu. Bakteriální kultura byla inkubována v LB tekutém médiu s přidavkem obou antibiotik o vhodných koncentracích do dosažení optické hustoty 0,6 při vlnové délce 600 nm. Poté byl k bakteriální kultuře přidán roztok IPTG, který indukoval expresi proteinu IFI16. Buněčná kultura byla lyzována dle postupu uvedeném v podkapitole 4.3.4.2 *Lýze buněk*. Během procesu lýze bakteriální kultury byly odebrány kontroly K2 a K3, které byly dále použity ke stanovení koncentrace proteinu IFI16 uvolněného do supernatantu v jednotlivých fázích procesu jeho izolace. Kontrola K1, která se běžně odebrává jako kontrola před indukcí nebyla v tomto případě odebrána z důvodu předpokladu absence proteinu IFI16 v bakteriální kultuře. K samotné izolaci proteinu IFI16 byly využity kuličky *TALON Metal Affinity resin* s obsahem kobaltu, který interagoval s polyhistidinovou kotvou fúzovanou s proteinem IFI16 a zajistil zachycení proteinu v koloně. Izolace proběhla dle postupu uvedeném v podkapitole 4.3.4.3 *Izolace proteinu IFI16*. V průběhu izolace proteinu byly odebrány kontroly K4–K6 a celkem 5 elucí proteinu IFI16.

Ke zjištění stavu fragmentace izolovaného proteinu byl proveden Western blot a barvení gelu barvivem Coomassie Blue. Vzorky proteinových elucí a kontrol byly vhodně upraveny a separovány vertikální elektroforézou ve dvouvrstvých polyakrylamidových gelech s přidavkem SDS. Jako pozitivní kontrola byl použit protein p53 obsahující rovněž s polyhistidinovou kotvu, jehož přítomnost ve vzorku byla již dříve prokázána. Gel po barvení barvivem *Coomassie Blue* a jeho následném odbarvení odbarvovacím roztokem *Destain* je znázorněn na obrázku 5.2.1. Do startu 1 byl nanesen proteinový žebříček s rozsahem molekulových hmotností 10–250 kDa, starty 2–6 obsahovaly vzorky kontrol proteinu IFI16 K2–K6, do startů 7–11 byly nanесeny vzorky elucí proteinu IFI16 E1–E5 a start 12 obsahoval pozitivní kontrolu – protein p53 s polyhistidinovou kotvou o celkové molekulové hmotnosti přibližně 62 kDa. Proteiny z druhého gelu byly westernovým přenosem převedeny na nitrocelulózuovou membránou citlivou na vazbu proteinů. Přítomnost proteinů IFI16 a p53 na nitrocelulózuové membráně byla potvrzena imunodetekcí. Na membránu byla nenesena myší primární monoklonální protilátka s afinitou k polyhistidinové kotvě, která interagovala se sekundární protilátkou *Anti-Mouse IgG* konjugovanou s peroxidázou. Chemiluminescence byla snímána na přístroji *Amersham Imager 680*. Výsledek imunodetekce je zachycen na obrázku 5.2.2. Starty 1 a 13 obsahovaly proteinový žebříček (10–250 kDa). Do startů 2–11 byly nanесeny vzorky kontrol K2–K3–K4–K5–K6 a elucí E1–E2–E3–E4 a E5. Do startu 12 byla nenesena pozitivní kontrola – protein p53 s polyhistidinovou kotvou.



Obrázek 5.2.1: Gel po odbarvení barviva Coomassie Blue odbarvovacím roztokem Destain. Start 1 obsahuje proteinový řebříček 10–250 kDa, start 2 obsahuje vzorek kontroly po indukci, starty 3–6 obsahují vzorky kontrol K3, K4, K5 a K6 odebrané ze supernatantů v průběhu izolace proteinu, starty 7–11 obsahují vzorky elucí E1, E2, E3, E4 a E5 a start 12 obsahuje protein p53 s 9 kDa histidinovou kotvou jako pozitivní kontrolu.



Obrázek 5.2.2: Nitrocelulósová membrána po imunodetekci. Starty 1 a 13 obsahují proteinový řebříček 10–250 kDa, start 2 obsahuje vzorek kontroly po indukci, starty 3–6 obsahují vzorky kontrol K3, K4, K5 a K6 odebrané ze supernatantů v průběhu izolace proteinu, starty 7–11 obsahují vzorky elucí E1, E2, E3, E4 a E5 a start 12 obsahuje protein p53 s 9 kDa histidinovou kotvou jako pozitivní kontrolu.

Snímky gelu i membrány potvrzují přítomnost proteinu IFI16 s 9kDa polyhistidinovou kotvou o celkové molekulové hmotnosti přibližně 97 kDa v elucích 2 až 5. Menší signál na nitrocelulózové membráně byl zaznamenán u těchto vzorků i v oblastech, které svou molekulovou hmotností odpovídají hmotnosti proteinu p53 s navázanou histidinovou kotvou (přibližně 62 kDa). Je nepravděpodobné, že by se jednalo o protein p53, protože izolovaný protein IFI16 byl exprimován v bakteriálním expresním systému, ve kterém nedochází k samovolné syntéze eukaryotních proteinů a transformovaný vektor pET15b obsahoval pouze vektor pro tvorbu proteinu IFI16 bez koexprese s proteinem p53. V případě koexprese by musel být rovněž detekován výrazně vyšší signál v oblastech odpovídající svou molekulovou hmotností proteinu p53 s polyhistidinovou kotvou i u drahách ostatních vzorků. Při porovnání snímku odbarveného gelu (Obrázek 5.2.1) se snímkem nitrocelulózové membrány (Obrázek 5.2.2) jsou na gelu vidět bandy odpovídající svým umístěním signálům detekovaným na membráně, ale lze pozorovat i přítomnost další fragmentů, jejichž molekulová hmotnost odpovídá dle poloh bandů přibližně 25 kDa. Tyto fragmenty neobsahovaly polyhistidinovou kotvu, na kterou by se vázala primární protilátka, a tudíž nebyly detekovány na membráně po imunodetekci. V průběhu izolace a další úpravy vzorků, tak pravděpodobně docházelo k fragmentaci proteinu plné délky na fragmenty nejčastěji o délce přibližně 25 a 65 kDa. Při srovnání intenzity jednotlivých signálů na membráně po imunodetekci (Obrázek 5.2.2) je vidět, že s klesající koncentrací proteinu plné délky o molekulové hmotnosti kolem 97 kDa, roste koncentrace fragmentů, která se zvyšovala s každou odebranou elucí, přičemž nejvyšší koncentrace proteinu IFI16 plné délky, na základě signálů detekovaných na nitrocelulózové membráně, dosáhl vzorek eluce 2 (E2), který rovněž obsahoval minimální množství fragmentů. Naopak vzorek eluce 5 (E5) obsahoval převážně proteinový fragment o molekulové hmotnosti přibližně 65 kDa a protein IFI16 plné délky s fúzovanou kotvou (97 kDa) nebyl detekován. Ve vzorku eluce 1 (E1) nebyly detekovány proteiny ani na nitrocelulózové membráně, ani na gelu po odbarvení, což znamená, že eluce obsahovala převážně zbytky promývacího pufru a protein IFI16 byl přítomen pouze v nízké koncentraci.

Jak bylo již zmíněno, byly v průběhu lýze buněk a izolace proteinu IFI16 odebírány kontroly z roztoků supernatantů kvůli zjištění uvolňování a ztrát izolovaného proteinu z bakteriální kultury. Na obrázku 5.2.1 jsou detekovány proteiny v kontrolách K3 až K6, tedy s výjimkou kontroly po indukci K2. Absence proteinu mohla být způsobena nevhodnou přípravou vzorku, který byl před PAGE-SDS separací ředěn ultračistou vodou z důvodu předpokladu vysoké koncentrace proteinů ve vzorku nebo tím, že kultura neuvolňovala do prostředí média proteiny a neobsahovala lyzované buňky. Kontroly K3 a K4 obsahovaly velké množství proteinů, které se projeví jako více bandů v rozsahu celé délky žebříčku, tedy o molekulových hmotnostech v rozmezí hodnot 10–250 kDa. Kontroly K5 a K6 již obsahovaly výrazně menší zastoupení bandů, a to převážně v oblastech odpovídající molekulovým hmotnostem 25, 70 a 100 kDa, tedy molekulovým hmotnostem odpovídajícím proteinu IFI16 a jeho případným fragmentům. Je zajímavé, že na nitrocelulózové membráně nebyly v kontrolách detekovány žádné proteiny. Při srovnání intenzity bandů na barveném gelu je však jasně vidět, že bandy značící přítomnost proteinů v kontrolách jsou výrazně slabší než bandy v elucích, takže je možné, že signál byl natolik slabý, že nebyl přístrojem detekován.

Aby bylo možné sledovat vazbu proteinu IFI16 na DNA při vazebných experimentech, bylo třeba stanovit přesnou koncentraci proteinu IFI16 ve vzorcích elucí. Stanovení koncentrace proteinu IFI16 bylo provedeno spektrofotometricky metodou podle Bradfordové. Vzorky elucí i připravených kalibračních roztoků hovězího sérového albuminu v elučním pufru byly smíchány s roztokem

Bradfordova činidla a přeneseny na 96jamkovou titrační destičku ve dvou opakováních. Po 10minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla koncentrace proteinu IFI16 ve vzorcích elucí stanovena přímo přístrojem *Hybrid Reader*. Výsledné stanovení koncentrací je uvedeno v tabulce 5.2.1.

Tabulka 5.2.1: Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace proteinu IFI16 ve vzorcích elucí metodou podle Bradfordové.

Vzorek	Koncentrace proteinu IFI16 [g·l ⁻¹]
Eluce 1 (E1)	< 0,020
Eluce 2 (E2)	0,575
Eluce 3 (E3)	0,623
Eluce 4 (E4)	0,335
Eluce 5 (E5)	< 0,020

Přestože snímky gelu po odbarvení (Obrázek 5.2.1) a nitrocelulóзовé membrány (Obrázek 5.2.2) předpovídaly nejvyšší koncentraci proteinu IFI16 ve vzorku eluce 2, byla nejvyšší koncentrace naměřena u vzorku eluce 3, a to 0,623 g·l⁻¹. Koncentrace proteinu ve vzorku eluce 2 byla stanovena na 0,575 g·l⁻¹, což se příliš neliší od koncentrace vzorku eluce 3. Poslední vzorek eluce, který na membráně i gelu vykazoval přítomnost proteinu použitelného při *in vitro* experimentech, byl vzorek eluce 4, jehož koncentrace byla stanovena na 0,335 g·l⁻¹, což je výrazně méně oproti dvěma předešlým elucím. Koncentrace vzorků elucí 1 a 5 byly stanoveny pod limitem detekce přístroje, a proto nebyly při dalších experimentech použity.

5.3 Studium vazby proteinu IFI16 na DNA *in vitro*

Vazba proteinu IFI16 k hybridizovaným oligonukleotidům s potenciálem tvorby G-kvadruplexu *in vitro* byla studována s využitím elektroforetického testu posunu mobility (EMSA) v třivrstevném polyakrylamidovém gelu s přidavkem 50 mmol·l⁻¹ KCl. Kompetitivní vazebné experimenty byly založeny na kompetici hybridizovaných neznačených oligonukleotidů s fluorescenčně značeným oligonukleotidem KSHV (Tabulka 4.1.2), který formuje strukturu G-kvadruplexu, jak prokázaly výsledky měření cirkulárního dichroismu (Obrázek 5.1.2). Aby bylo možné sledovat kompetici a vazebné vlastnosti jednotlivých oligonukleotidů, bylo nutné nejprve provést vazebné experimenty za účelem stanovení vhodného molárního poměru proteinu a fluorescenčně značené DNA, kdy bude docházet k vazbě proteinu na DNA a koncentrace proteinu IFI16 ve vzorku bude dostačující k případné interakci s molekulou kompetitoru i značeného G4 KSHV.

5.3.1 Vazebné experimenty

Vazebné experimenty byly realizovány pro vzorky elucí, které na základě spektrofotometrického stanovení dosahovaly nejvyšších koncentrací proteinu. Na obrázku 5.3.1 jsou znázorněny výsledky separací vzorků tří vybraných elucí, a to konkrétně eluce 2 (starty 2–5), eluce 3 (starty 7–10) a eluce 4 (starty 12–15). Hybridizovaný fluorescenčně značený oligonukleotid KSHV byl smíchán s proteinem IFI16 z jednotlivých elucí v molárním poměru DNA:protein 1:0 (starty 1, 6 a 11),

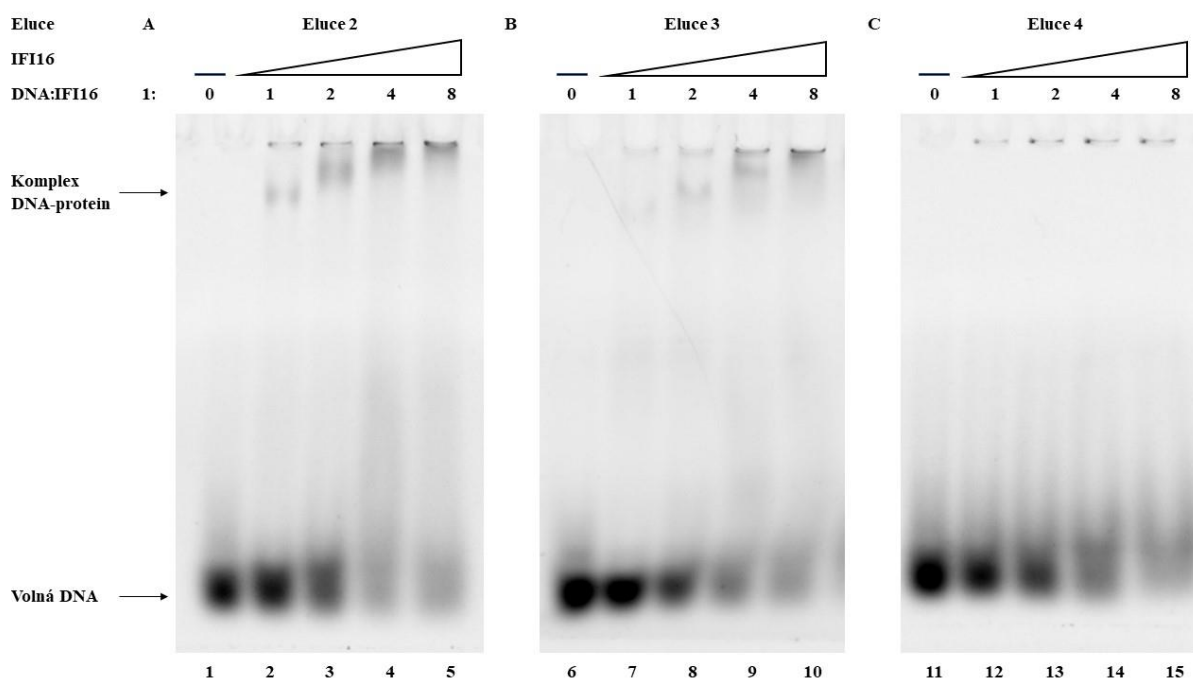
1:1 (starty 2, 7 a 12), 1:2 (starty 3, 8 a 13), 1:4 (starty 4, 9 a 14) a 1:8 (starty 5, 10 a 15) a vzniklé komplexy byly separovány vertikální elektroforézou v třívrstevném polyakrylamidovém gelu.

Jestliže dochází k interakci proteinu IFI16 s fluorescenčně značeným oligonukleotidem KSHV, projeví se tato vazba úbytkem volné DNA a tvorbou komplexu DNA:protein, který migruje do prostředí gelu [323]. U vzorků všech tří elucí byl pozorován úbytek volné DNA s rostoucí koncentrací proteinu, což ukazuje na schopnost proteinu vázat motiv G-kvadruplexu. Specifická vazba proteinu IFI16 na molekulu G-kvadruplexu dokazuje, že v průběhu izolace a následné purifikace proteinu nedošlo k narušení jeho vazebných vlastností. U vzorků elucí 2 a 3 byly pozorovány vznikající komplexy, které migrovaly do prostředí gelu, které ovšem chybí u vzorků eluce 4 s nejnižší stanovenou koncentrací proteinu v eluci ($0,335 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). S rostoucí koncentrací proteinu IFI16 ve vzorcích nanesených na gel, roste molární hmotnost komplexů DNA:protein, což je možné pozorovat snížením mobility vznikajících komplexů. Při srovnání migrace komplexů vzorků v eluci 2 a 3 je vidět, že vzniklé komplexy obou elucí migrují stejně a drobné rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny mírně odlišnou výškou vrchní vrstvy gelu, kde nejnižší koncentrace akrylamidu (4 %) poskytuje nejvhodnější prostředí k rychlé separaci vysokomolekulárních komplexů.

U vzorků všech elucí byly pozorovány komplexy zachycené ve startech gelu. Tyto vysokomolekulární komplexy jsou způsobeny kooperativní vazbou proteinu IFI16 na molekulu DNA indukovanou oligomerizací proteinu IFI16 prostřednictvím PYRIN domény. Přestože byla u PYRIN domény pozorována rovněž omezená schopnost vazby na DNA [49], dochází v tomto případě k vazbě DNA-vazebnými HIN doménami, a to prostřednictvím jejich vysoce konzervovaných OB záhybů schopných vázat oligonukleotidové a oligosacharidové řetězce [46]. K oligomerizaci proteinu IFI16 prostřednictvím PYRIN domény nedochází pouze během *in vitro* vazebných experimentů. V buňce zprostředkovává PYRIN doména interakce s dalšími molekulami proteinů během řízení vrozené imunitní odezvy za vzniku homo- a heterodimerů, jejichž tvorba indukuje kooperativní sestavení vláken a aktivaci signálních drah [6].

Vzorky všech tří elucí vykazovaly mírný úbytek volné DNA a tvorbu komplexu DNA:protein již při molárním poměru 1:1. K prokazatelně vyššímu úbytku volné DNA došlo při molárním poměru DNA:protein 1:2 a při molárním poměru DNA:protein 1:4 bylo pozorováno úplné vymizení volné DNA, což ukazuje na vysokou specifickou vazbu proteinu ke struktuře G-kvadruplexu. Stejněho poměru DNA:protein, kdy došlo k vymizení veškeré volné DNA, bylo dosaženo již v předešlé studii, která odhalila vazebnou preferenci proteinu IFI16 ke strukturám G-kvadruplexů obsažených v sekvencích odvozených z sekvence lidské telomerické DNA hTEL a promotoru genu *MYC* [97], a která je v současné době jedinou publikovanou studií zabývající se interakcemi proteinu IFI16 plné délky s rozdílnými strukturami DNA (včetně struktur G-kvadruplexů) *in vitro*.

Na základě výsledků vazebných experimentů, nejvyšší stanovené koncentraci ($0,623 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a minimálnímu množství fragmentů pozorovaných na nitrocelulóзовé membráně (Obrázek 5.2.2) a gelu po odbarvení barviva *Coomassie Blue* (Obrázek 5.2.1) byl pro další studium vazby proteinu IFI16 na DNA *in vitro* vybrán vzorek eluce 3 (E3) v molárním poměru DNA:protein 1:4.



Obrázek 5.3.1: Vazebné experimenty proteinu IFI16 v nativním polyakrylamidovém gelu. Snímky byly pořízeny z různých gelů. Spodní šipka označuje výskyt volné DNA. Horní šipka značí místo výskytu komplexu DNA-protein. Starty 1, 6 a 11 obsahují volnou DNA (fluorescenčně značený oligonukleotid KSHV) bez proteinu. (A) Starty 2–5 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu IFI16 z eluce 2 v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8. (B) Starty 7–10 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu IFI16 z eluce 3 v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8. (C) Starty 12–15 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu IFI16 z eluce 4 v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8.

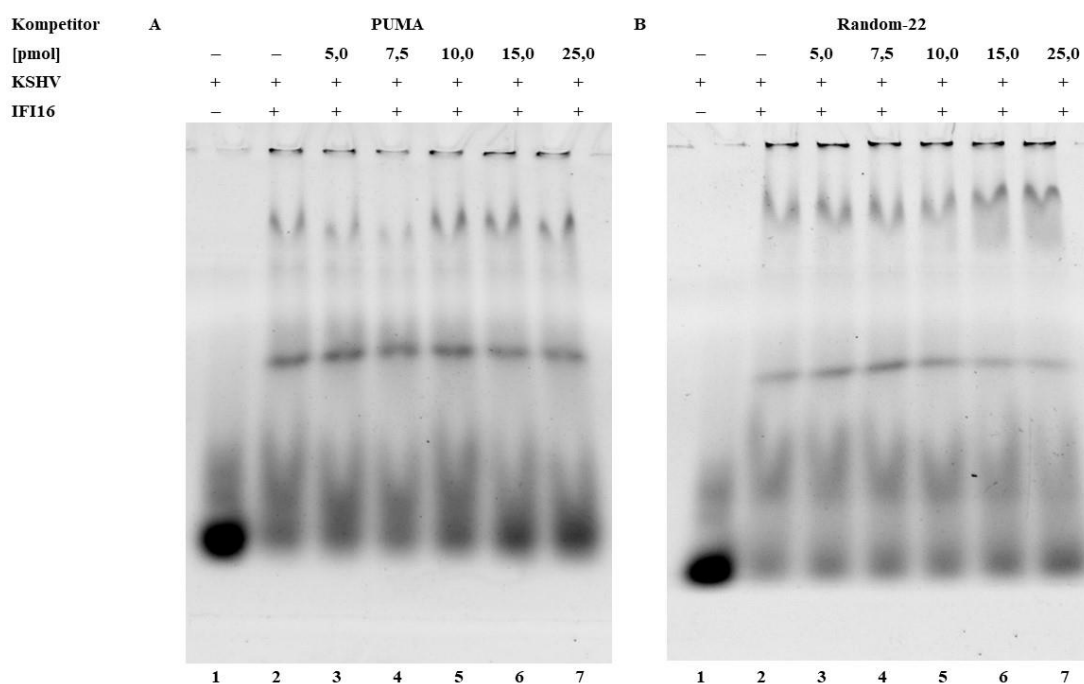
5.3.2 Kompetitivní vazebné experimenty

Princip kompetitivních vazebných experimentů spočívá v interakci kompetitivní a fluorescenčně značené molekuly DNA s vybraným proteinem a následné separaci vzniklých komplexů v prostředí gelu. Pokud jsou na snímcích gelů po separaci přítomny bandy volné fluorescenčně značené DNA, dochází k interakci kompetitoru se studovaným proteinem. Jestliže je intenzita fluorescence volné DNA vzorků obsahující kompetitor (starty 3–7) shodná s intenzitou vzorku bez kompetitoru (starty 2), nedochází k vazbě proteinu na kompetitor, nebo je vazba příliš slabá, aby se projevila v rámci sledovaného rozsahu koncentrací kompetitoru.

Ke vzorkům fluorescenčně značeného hybridizovaného oligonukleotidu KSHV a proteinu IFI16 v molárním poměru 1:4 byly přidány 0,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 a 25,0 pmol hybridizovaných vzorků kompetitorů PUMA, KSHV, KSHV-1no, KSHV-2no, KSHV-3no, KSHV-Mut1.0, KSHV-Mut1.5, KSHV-Mut2.0 a Random-22 bez fluorescenčního značení. Rovněž byly připraveny vzorky fluorescenčně značené DNA bez proteinu a kompetitoru (starty 1) a fluorescenčně značené DNA s proteinem, bez přítomnosti kompetitoru (starty 2). Vzorky byly inkubovány a následně separovány vertikální elektroforézou v prostředí třívrstvého polyakrylamidového gelu.

Na obrázku 5.3.2 jsou zobrazeny snímky gelů s kompetitory PUMA (Obrázek 5.3.2 A) a Random-22 (Obrázek 5.3.2 B). Jak je vidět, ani jeden z kompetitorů nevykazuje specifickou interakci s proteinem IFI16. Absence volné DNA u vzorků obsahujících protein a přítomnost pásů

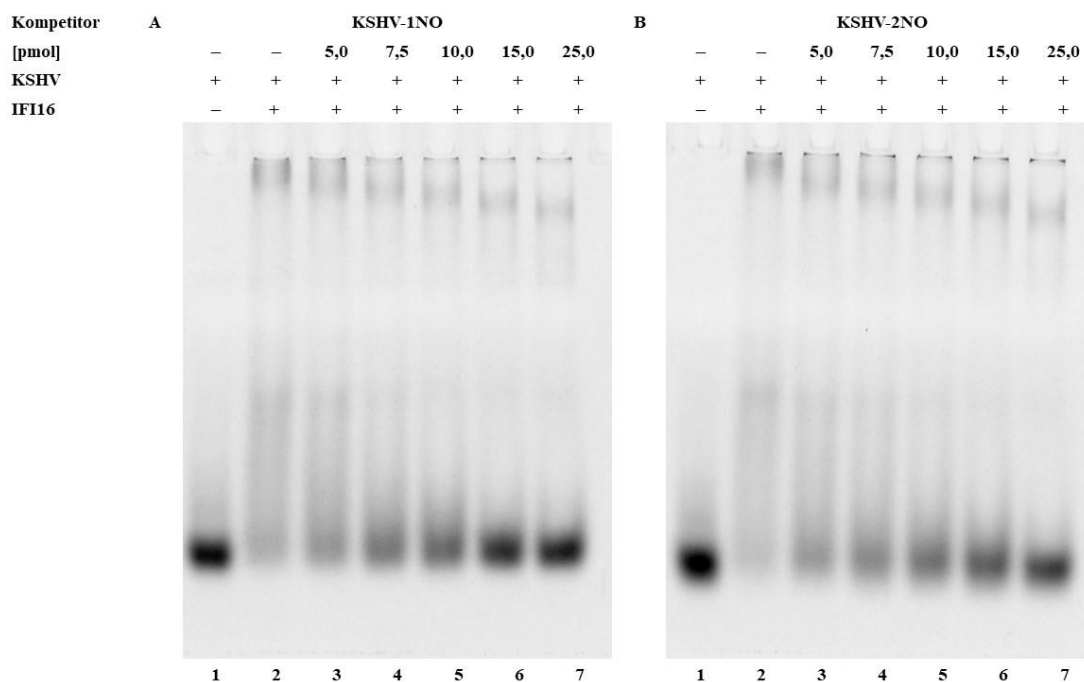
ukazuje u obou kompetitorů pouze na interakci proteinu IFI16 s molekulou fluorescenčně značeného KSHV. Tyto výsledky potvrzují předpoklad, že sekvence PUMA a Random-22 nejsou schopny tvořit motiv G-kvadruplexu, jak bylo predikováno na základě bioinformatické analýzy (viz Tabulka 4.1.2) a výsledků CD spektroskopie (viz Obrázek 5.1.1 a 5.1.9). Při srovnání intenzity pásů v oblasti předpokládaného výskytu volné DNA byla u kompetitoru PUMA pozorována vyšší intenzita fluorescence, než u kompetitoru Random-22. Zvyšující se intenzita fluorescence v dráze 7 obsahující nejvyšší koncentraci kompetitoru PUMA (25 pmol) ukazuje na možnou nespecifickou vazbu proteinu k DNA nebo slabší specifickou vazbu k jiné než G-kvadruplexové struktuře, jako např. ke struktuře palindromu (vlásenky) u níž byla v předešlé studii *IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation* prokázána vyšší preference vazby proteinu IFI16 než k dsDNA [97]. Sled bází sekvence ssDNA PUMA (5'–3': CTG**CAAGTCCTGACTTG**TCC) teoreticky umožňuje tvorbu struktury palindromu s krátkou smyčkou (komplementární sekvence oligonukleotidu jsou naznačeny červeně). Vzhledem k povaze kompetitivních vazebných experimentů je ovšem tvorbu komplexů proteinu IFI16 se strukturou palindromu těžké prokázat a bylo by vhodné tuto hypotézu ověřit na základě vazebných experimentů s fluorescenčně značeným oligonukleotidem PUMA.



Obrázek 5.3.2: Kompetitivní vazebný experiment v nativním polyakrylamidovém gelu s fluorescenčně značeným oligonukleotidem KSHV a sekvencí oligonukleotidu (A) PUMA a (B) Random-22.

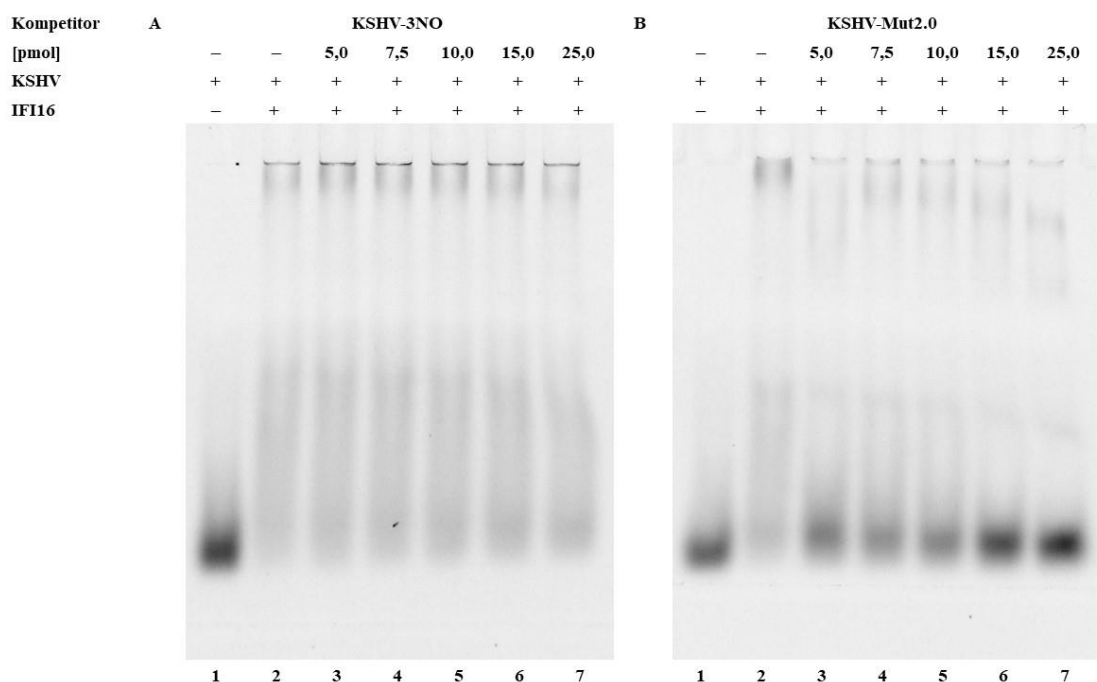
Na obrázku 5.3.3 jsou zobrazeny snímky gelů po separaci vzorků obsahující kompetitory KSHV-1no (Obrázek 5.3.3 A) a KSHV-2no (Obrázek 5.3.3 B). Na snímcích obou gelů jsou přítomny bandy volné DNA. Intenzita fluorescence volné DNA roste s koncentrací přidaného kompetitoru, což ukazuje na vazbu proteinu IFI16 k vytvořeným strukturám G-kvadruplexů. K interakci proteinu IFI16 s kompetitory KSHV-1no a KSHV-2no dochází již po přidavku 5 pmol kompetitoru (dráhy 3). Při srovnání intenzity fluorescence volné DNA vzorků s nejvyšším zvoleným přidavkem kompetitoru

(25 pmol) je pozorována vyšší intenzita signálu u oligonukleotidu KSHV-1no oproti KSHV-2no, což naznačuje vyšší preferenci proteinu vázat se ke kompetitoru KSHV-1no a možnou tvorbu stabilnější struktury G-kvadruplexu oligonukleotidem KSHV-1no, čemuž odpovídají i výsledky měření cirkulárního dichroismu, kdy oligonukleotid KSHV-1no (Obrázek 5.1.3) hybridizovaný v prostředí $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl dosahoval vyšších hodnot molárního absorpčního koeficientu než KSHV-2no (Obrázek 5.1.4) ve stejném pufru.



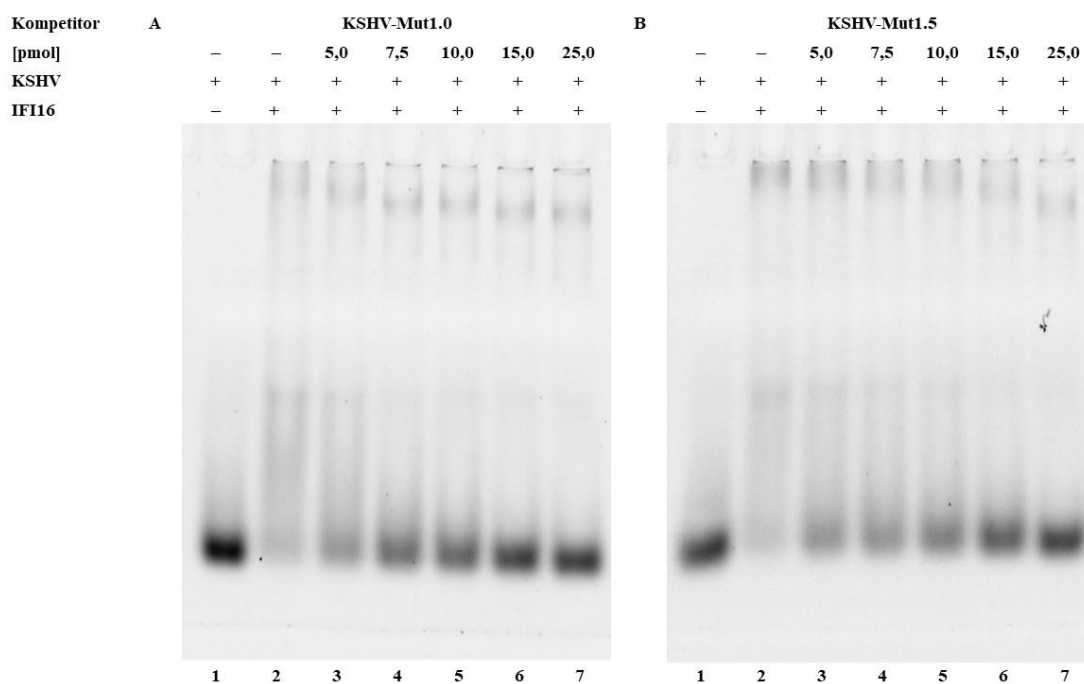
Obrázek 5.3.3: Vazebný experiment v nativním polyakrylamidovém gelu s fluorescenčně značeným oligonukleotidem KSHV a sekvencí oligonukleotidu (A) KSHV-1no a (B) KSHV-2no.

Na obrázku 5.3.4 jsou zobrazeny snímky gelů po separaci vzorků s kompetitory KSHV-3no (Obrázek 5.3.4 A) a KSHV-Mut2.0 (Obrázek 5.3.4 B). Na snímku gelu s kompetitorem KSHV-3no nejsou v drahách obsahující kompetitor (starty 3–7) přítomny bandy volné DNA, což ukazuje na vazbu proteinu IFI16 pouze k motivu G-kvadruplexu hybridizovaného oligonukleotidu KSHV. Rovněž tyto výsledky naznačují, že kompetitor KSHV-3no neformuje strukturu G-kvadruplexu, se kterou by protein IFI16 specificky interagoval. Absence struktury G-kvadruplexu u oligonukleotidu KSHV-3no byla potvrzena rovněž měřeními cirkulárního dichroismu (viz Obrázek 5.1.5), a to jak v prostředí obsahující draselné ionty, tak v prostředí čisté Tris-HCl bez draselných iontů. Oproti tomu oligonukleotid KSHV-Mut2.0, který na základě výsledků měření cirkulárního dichroismu formuje v prostředí $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl hybridní strukturu G-kvadruplexu, vykazoval vazbu k proteinu IFI16 již při 5pmol přidavku kompetitoru (dráha 3), což se projevilo přítomností bandy volné DNA. Intenzita fluorescence volné DNA roste úměrně s rostoucím obsahem kompetitoru a ukazuje na specifickou interakci s motivem G4 hybridizovaného oligonukleotidu KSHV-Mut2.0.



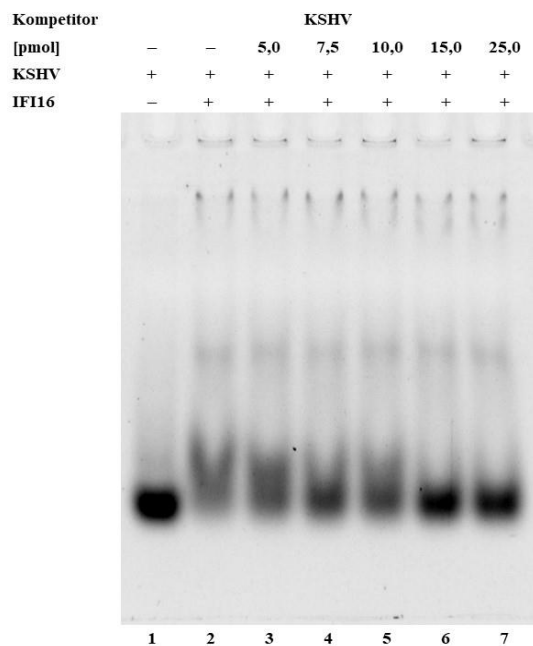
Obrázek 5.3.4: Vazebný experiment v nativním polyakrylamidovém gelu s fluorescenčně značeným oligonukleotidem KSHV a sekvencí oligonukleotidu (A) KSHV-3NO a (B) KSHV-Mut2.0.

Na obrázku 5.3.5 jsou zobrazeny snímky gelů po separaci vzorků s kompetitory KSHV-Mut1.0 (Obrázek 5.3.5 A) a KSHV-Mut1.5 (Obrázek 5.3.5 B). Na snímcích obou gelů jsou přítomny bandy volné DNA, kdy intenzita fluorescence volné DNA roste úměrně s množstvím přidaného kompetitoru. Tyto výsledky ukazují stejně jako v případě kompetitorů KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut2.0 na tvorbu sekundární struktury G-kvadruplexu interagující s proteinem IFI16. Protein IFI16 vykazoval, stejně jako v případě kompetitorů KHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut2.0, vazbu ke kompetitorům KSHV-Mut1.0 i KSHV-Mut1.5 již po přidavku 5 pmol DNA kompetitoru (dráhy 3). Při srovnání intenzity fluorescence bandů volné DNA je vyšší signál detekován v případě kompetitoru KSHV-Mut1.0, což ukazuje na možnou tvorbu preferenční vazby proteinu IFI16 a tvorbu stabilnější struktury G-kvadruplexu tímto kompetitorem. Intenzita fluorescence na základě vizuálního srovnání byla dokonce vyšší, než u kompetitoru KSHV-Mut2.0, který na základě bioinformatické analýzy vykazoval nejvyšší potenciál pro tvorbu G-kvadruplexu (*G4 Hunter skóre* 1,591) ze všech tří kompetitorů vzniklých na základě mutací původní sekvence KSHV programem *G4 Killer* (Tabulka 4.1.2). Přítomnost struktur G-kvadruplexů kompetitorů KSHV-Mut1.0 a KSHV-Mut1.5 byla potvrzena i na základě biofyzikální charakterizace. Metodou cirkulárního dichroismu byla u oligonukleotidu KSHV-Mut1.0 v přítomnosti draselných iontů potvrzena tvorba paralelní strukturu G4 (Obrázek 5.1.6) a u KSHV-Mut1.5 tvorba antiparalelní struktury G-kvadruplexu (Obrázek 5.1.7).



Obrázek 5.3.5: Vazebný experiment v nativním polyakrylamidovém gelu s fluorescenčně značeným oligonukleotidem KSHV a sekvencí oligonukleotidu (A) KSHV-Mut1.0 a (B) KSHV-Mut1.5.

Na obrázku 5.3.6 je zobrazen snímek gelu po separaci vzorků s kompetitorem KSHV bez fluorescenčního značení, který sloužil jako pozitivní kontrola. Stejně jako v případě kompetitorů KSHV-1no, KSHV-2no, KSHV-Mut1.0, KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0 docházelo k vazbě proteinu IFI16 ke kompetitoru KSHV již po přidavku 5 pmol a intenzita volné DNA rostla se zvyšujícím se množstvím kompetitoru.



Obrázek 5.3.6: Vazebný experiment v nativním polyakrylamidovém gelu s fluorescenčně značeným oligonukleotidem KSHV a sekvencí oligonukleotidu KSHV bez fluorescenčního značení jako kompetitoru.

Biofyzikální charakterizace sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu v prostředí draselných iontů odhalila tvorbu různých topologií G-kvadruplexu. Zatímco u KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut1.0 docházelo k tvorbě paralelní struktury G4, oligonukleotid KSHV-Mut1.5 tvořil strukturu antiparalelního G4 a KSHV-Mut2.0 motiv hybridního G-kvadruplexu. Ke zjištění vazebných preferencí proteinu IFI16 k různým topologiím DNA byla s využitím programu ImageJ provedena denzitometrická analýza signálu volné DNA. Výsledky denzitometrické analýzy jsou uvedeny v tabulce 5.3.1 Intenzita fluorescence volné DNA stanovená u vzorků obsahující kompetitor byla přepočtena na procentový podíl signálu volné DNA bez proteinu ve dvou opakováních.

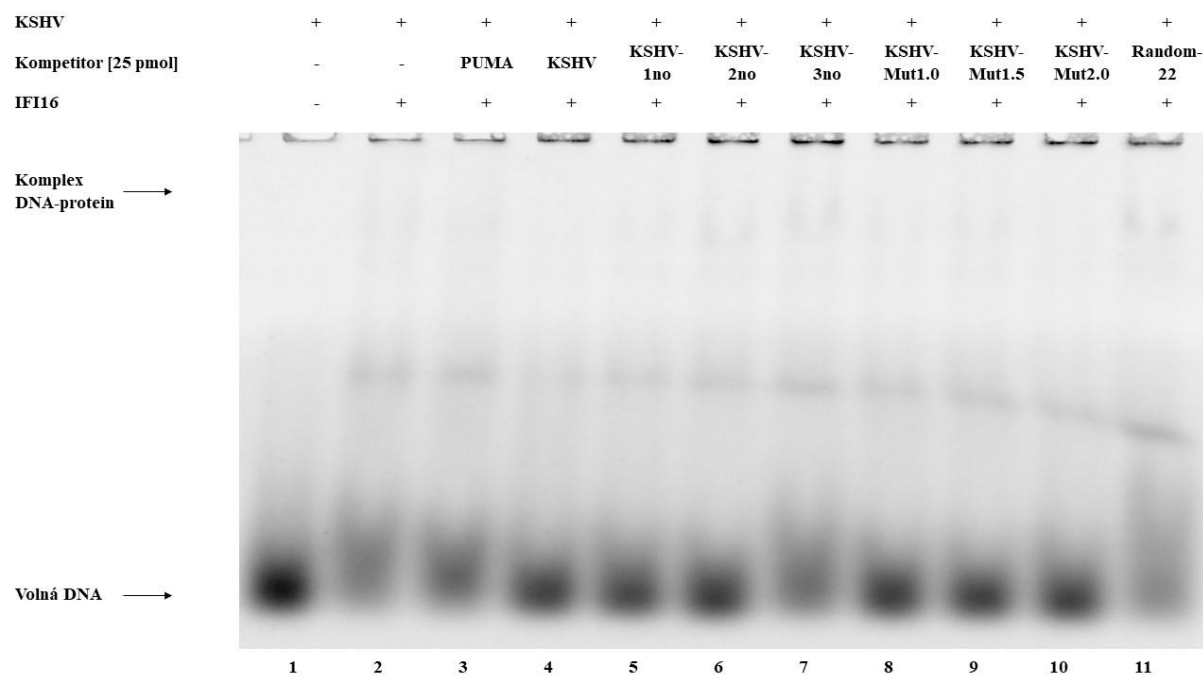
Tabulka 5.3.1: Denzitometrická analýza vazby proteinu IFI16 k sekvencím s rozdílným potenciálem tvorby G-kvadruplexu in vitro. Byly stanoveny průměrné hodnoty procentového zastoupení intenzity fluorescence volné DNA ze dvou opakování a vypočteny příslušné směrodatné výběrové odchylky.

Kompetitor [pmol]	Intenzita fluorescence volné DNA [%]					
	0,0	5,0	7,5	10,0	15,0	25,0
PUMA	28 ± 4	22 ± 2	22 ± 3	20 ± 8	25 ± 15	33 ± 8
Random-22	17 ± 12	17 ± 14	17 ± 12	16 ± 10	25 ± 0	26 ± 8
KSHV	16 ± 5	18 ± 3	27 ± 14	26 ± 9	51 ± 30	59 ± 20
KSHV-1no	16 ± 2	25 ± 2	42 ± 6	54 ± 13	74 ± 5	84 ± 10
KSHV-2no	11 ± 5	32 ± 16	25 ± 1	35 ± 0	47 ± 3	66 ± 2
KSHV-3no	9 ± 4	7 ± 3	9 ± 5	11 ± 4	12 ± 9	10 ± 9
KSHV-Mut1.0	22 ± 9	44 ± 15	52 ± 10	55 ± 21	79 ± 22	92 ± 8
KSHV-Mut1.5	19 ± 8	32 ± 4	33 ± 3	41 ± 5	56 ± 4	71 ± 17
KSHV-Mut2.0	22 ± 1	38 ± 14	42 ± 9	55 ± 13	79 ± 28	102 ± 12

Nejnižší vazba proteinu IFI16 k DNA byla pozorována u sekvence KSHV-3no a poté Random-22 a PUMA. Zatímco u kompetitorů KSHV-3no a Random-22 dosahovala intenzita fluorescence přibližně konstantní hodnoty, u kompetitoru PUMA byl zaznamenán mírný nárůst intenzity fluorescence způsobený možnou vazbou proteinu IFI16 k DNA, jak bylo diskutováno výše. Vyšší nárůst intenzity fluorescence volné DNA dosahovaly vzorky kompetitorů, u nichž docházelo k formování struktury G-kvadruplexu (KSHV-1no, KSHV-2no, KSHV-Mut1.0, KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0). Nejvyšší nárůst intenzity volné DNA byl stanoven u sekvence KSHV-Mut2.0, která na základě analýzy CD spektroskopie v přítomnosti draselných iontů formuje hybridní strukturu G4 a dále pak u KSHV-Mut1.0 a KSHV-1no, které mohou tvořit paralelní struktury G4. Nižší nárůst volné DNA byl stanoven u KSHV-Mut1.5, který se potenciálně formuje do antiparalelní struktury G4 a dále KSHV-2no s možnou paralelní strukturou G-kvadruplexu. Výsledky nevykazují preferenční vazbu proteinu IFI16 k jedné topologii G-kvadruplexu. Výsledné srovnání komplikují vyšší stanovené výběrové odchylky a nejednotná počáteční intenzita fluorescence volné DNA bez kompetitoru.

Aby bylo možné regulérně srovnat vazebné vlastnosti proteinu IFI16 k jednotlivým strukturám DNA a různým konformacím G-kvadruplexů, byl proveden kompetitivní vazebný experiment všech analyzovaných sekvencí v prostředí třívrstvého polyakrylamidového gelu s obsahem 50 mmol·l⁻¹ KCl ve třech opakováních. Na obrázku 5.3.7 je zobrazen snímek gelu po separaci vzorků. Dráha 1 obsahuje fluorescenčně značený oligonukleotid KSHV bez kompetitoru a proteinu IFI16. Dráha 2 obsahuje fluorescenčně značený oligonukleotid s proteinem IFI16 v molárním poměru 1:4 stanoveném

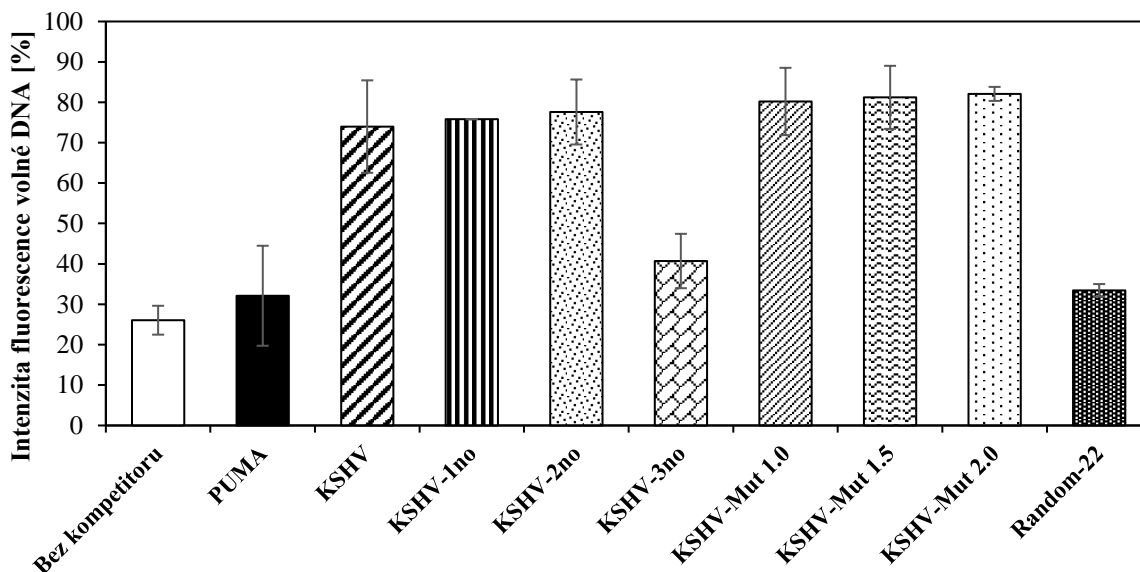
na základě vazebných experimentů. Dráhy 3–11 obsahují fluorescenčně značený oligonukleotid KSHV s proteinem IFI16 v molárním poměru 1:4 a přídatkem 25 pmol kompetitoru – PUMA (dráha 3), pozitivní kontroly KSHV bez fluorescenčního značení (dráha 4), KSHV-1no (dráha 5), KSHV-2no (dráha 6), KSHV-3no (dráha 7), KSHV-Mut1.0 (dráha 8), KSHV-Mut1.5 (dráha 9), KSHV-Mut2.0 (dráha 10) a negativní kontroly Random-22 (dráha 11). Výsledky srovnávacího kompetitivního experimentu potvrzují výsledky jednotlivých separací, tedy že s výjimkou sekvencí PUMA, KSHV-3no a Random-22 dochází k vazbě proteinu IFI16 k vytvořeným strukturám kompetitorů.



Obrázek 5.3.7: Srovnání vazby proteinu IFI16 k jednotlivým sekvencím kompetitorů s různým potenciálem tvorby G-kvadruplexu *in vitro*

Stejně jako v případě vzorků obsahující jednotlivé kompetitory, byla i pro srovnávací experiment provedena denzitometrická analýza intenzity volné DNA. Stanovené intenzity fluorescence volné DNA s příslušnými směrodatnými výběrovými odchylkami jsou vyneseny v obrázku 5.3.8. Vzorek bez kompetitoru dosahuje očekávaně nejnižší hodnoty intenzity fluorescence (26 ± 4 %). Signál fluorescence roste s kompetitory PUMA (32 ± 12 %), Random-22 (33 ± 2 %), KSHV-3no (41 ± 7 %), KSHV (74 ± 11 %), KSHV-1no (76 ± 0 %), KSHV-2no (78 ± 8 %), KSHV-Mut1.0 (80 ± 8 %), KSHV-Mut1.5 (81 ± 8 %) a KSHV-Mut2.0 (82 ± 2 %).

Výsledky vazebných a kompetitivních vazebných experimentů ukazují, že ačkoliv protein IFI16 váže specificky struktury G-kvadruplexů i při velmi nízkých koncentracích G4 ve vzorku, nemá konformace nebo podíl intra- nebo intermolekulárních struktur G-kvadruplexů vliv na vazebné vlastnosti proteinu, protože intenzity fluorescence volné DNA byly podobné u všech kompetitorů, u kterých docházelo k tvorbě motivu G-kvadruplexu (KSHV, KSHV-1no, KSHV-2no, KSHV-Mut1.0, KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0) bez rozdílu na biofyzikální charakterizaci konformace G4.



Obrázek 5.3.9: Denzitometrická analýza srovnávacího kompetitivního vazebného experimentu proteinu IFI16 a sekvencí s rozdílným potenciálem tvorby G-kvadruplexu *in vitro*.

Protein IFI16 váže DNA prostřednictvím DNA-vazebných HIN domén obsahující dva vysoce konzervované OB záhyby schopné asociovat s oligonukleotidovými a oligosacharidovými řetězci [46]. Již dříve bylo prokázáno, že protein IFI16 upřednostňuje vazbu na tzv. nadšroubovicovou DNA oproti lineární DNA stejné sekvence [14]. Výsledky všech *in vitro* vazebných experimentů jsou v souladu s výsledky dosaženými v článku Hároníkové [97] kde byly zkoumány vazebné vlastnosti proteinu plné délky k různým strukturám DNA. Protein IFI16 vykazuje rostoucí vazebné preference od ssDNA, dsDNA, křížových struktur až po specifickou vazbu k motivům G-kvadruplexu. Preference vazby proteinu IFI16 ke strukturám G-kvadruplexů byla pozorována i v rámci dvou molekul nadšroubovicové DNA, kdy protein IFI16 upřednostňuje vazbu na molekulu nadšroubovicové DNA nesoucí motiv G-kvadruplexu [97]. Preference vazby proteinu k nadšroubovicové (*supercoiled*) DNA a strukturám G-kvadruplexu souvisí s biologickou funkcí proteinu, který v buňce snímá cizorodou nebo poškozenou DNA a indukuje aktivaci signálních drah a řízení vrozené imunitní odpovědi [6]. U kompetitorů PUMA, KSHV-3no a Random-22 docházelo pouze k slabé vazbě proteinu IFI16, která se projevila intenzitou fluorescence volné DNA ve vzorku daného kompetitoru odpovídající intenzitě fluorescence volné DNA bez přídavku kompetitoru. Vzhledem k charakteru kompetitivních vazebných experimentů není možné přesně určit míru interakce proteinu IFI16 s uvedenými kompetitory. Ke stanovení vazebných preferencí proteinu IFI16 k těmto sekvencím by bylo vhodné použít fluorescenčně značené kompetitory nebo provést vazebné experimenty bez fluorescenčně značené DNA následované imunoblotovou analýzou, jako to bylo při studiu vazby proteinu IFI16 na ssVACV70mer a dsVACV70mer [34]. Dřívější studie potvrdily vazbu proteinu IFI16 na ssDNA i dsDNA [10, 34, 97] prostřednictvím elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými postranními řetězci aminokyselin a záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA [13].

5.4 Studium interakce proteinu IFI16 s DNA v jednohybridním kvasinkovém systému

Interakce proteinu IFI16 s DNA *in vivo* byla studována v jednohybridním kvasinkovém reportérovém systému na základě změny transaktivačního potenciálu proteinu p53. Isogenní kmeny geneticky modifikovaných kvasinek *S. cerevisiae* lišících se sekvencemi responzivních elementů v promotorové oblasti reportérového genu *LUC1* (gen kódující luciferázu odvozený od *Photinus pyralis* [347, 353]) byly připraveny v rámci předešlých prací *Rozpoznávání strukturních motivů a virové DNA proteinem IFI16* a *Využití kvasinkového isogenního systému ke studiu vazby proteinu IFI16 na DNA* metodou *Delitto Perfetto*.

Klonované sekvence responzivních elementů byly navrženy tak, aby vykazovaly rozdílný potenciál tvorby G-kvadruplexu (Tabulka 4.1.1). V posledních několika letech byl prokázán významný regulační vliv G-kvadruplexů během fundamentálních buněčných procesů (replikace, transkripce, translace) a jejich přítomnost v klíčových oblastech genomu (telomery, promotory onkogenů, virové genomy, aj.) [15–19]. Rovněž bylo prokázáno, že protein IFI16 je schopen nekanonické sekundární struktury G-kvadruplexů specificky vázat a svou vazbou je stabilizovat [97]. Přestože se již některé dřívější práce zabývaly vazbou proteinu IFI16 ke strukturám G-kvadruplexu *in vitro* [97] i vzájemnou interakcí proteinu IFI16 s nádorovým supresorem p53 *in vivo* [12], neexistuje dosud práce, která by se zabývala, vazbou proteinu IFI16 k motivu G-kvadruplexu v kvasinkovém expresním systému a zároveň vlivem této vazby na aktivaci transkripce indukovanou proteinem p53.

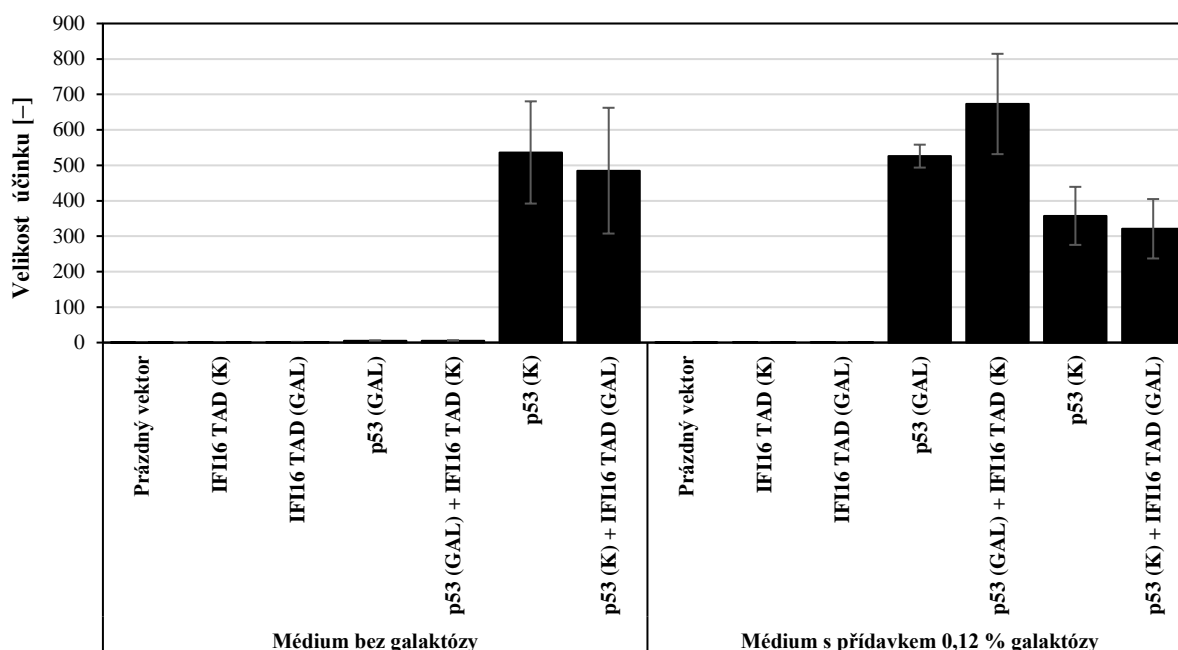
Sekvence všech responzivních elementů obsahovala konsenzuální vazebné místo proteinu p53 odvozené z promotoru genu proapoptického proteinu PUMA o délce 20 nukleotidů. Za sekvenci PUMA v promotoru reportérového genu byla u většiny kmenů vložena sekvence oligonukleotidu KSHV nebo některá z jeho mutovaných forem. Sekvence KSHV byla odvozena z virového genomu herpesviru spojeného s Kaposiho sarkomem a prokazatelně tvořila sekundární strukturu G-kvadruplexu a vykazovala vysoké *G4Hunter* skóre. Mutované sekvence PUMA-KSHV-1no, PUMA-KSHV-2no a PUMA-KSHV-3no byly navrženy tak, aby nebyly schopny tvořit *in vivo* sekundární strukturu G-kvadruplexu. Sekvence PUMA-KSHV-Mut1.0, PUMA-KSHV-Mut1.5 a PUMA-KSHV-Mut2.0 byly navrženy bioinformaticky mutací sekvence KSHV programem *G4Killer*. Kvasinkové kmeny byly transformovány lithium-acetátovou metodou plazmidy pro expresi proteinů p53, IFI16 s transaktivační doménou proteinu p53 (IFI16 TAD) a jejich vzájemnou kombinací s konstitutivními i indukibilními galaktózovými promotory. Při koexpresi obou proteinů byl vždy jeden z plazmidových promotorů konstitutivní, aby nedocházelo k případné kompetici s druhým (galaktózovým) promotorem. Rovněž byly připraveny transformanty nesoucí prázdné vektory bez exprese proteinů.

Vliv proteinu IFI16 na transaktivační potenciál proteinu p53 byl sledován v leucin-tryptofan selektivním médiu s rafinózou (bazální exprese proteinů) a ve stejném médiu s přídatkem 0,12 % galaktózy (indukovaná exprese proteinů) v časech 6 (T_6) a 24 hodin (T_{24}) od začátku inkubace ve třech opakováních. Transaktivační potenciál proteinu p53 byl určen na základě naměřené intenzity bioluminiscence, která byla normalizována na optickou hustotu kultury a přepočtena na velikost účinku vůči prázdnému vektoru. Ze stanovených velikostí účinků byly vyřazeny odlehle hodnoty přesahující 1,5násobek interkvartilového rozpětí a celý soubor dat byl statisticky vyhodnocen. Byly vyneseny závislosti transaktivačního potenciálu jednotlivých transformantů a jako chybové úsečky

byly vyneseny směrodatné výběrové odchylky. Statisticky významné změny transkripčního potenciálu proteinu p53 indukované působením proteinu IFI16 TAD při koexpresi byly určeny na základě výsledků Studentova t-testu vůči samotnému proteinu p53 se stejným typem promotoru. Kompletní výsledky rozdělené dle jednotlivých kmenů a časů T_6 i T_{24} jsou součástí diplomové práce ve formě Přílohy. V této kapitole budou prezentovány a diskutovány vzájemné vztahy a souvislosti mezi naměřenými výsledky a jejich biologickým významem v souvislosti s nádorovým supresorem p53.

Ke srovnání vlivu proteinu IFI16 na transkripční potenciál proteinu p53 při bazální a indukované expresi proteinů bylo nutné vybrat plazmidy s vhodnou kombinací promotorů. Na obrázku 5.4.1 jsou vyneseny závislosti transkripčních potenciálů proteinu p53 pro jednotlivé typy transformantů u kmene PUMA během bazální i indukované exprese 24 hodin od začátku inkubace. Kontinuální exprese daného proteinu (K) byla zprostředkována plazmidy obsahujícími konstitutivní alkoholdehydrogenázový promotor. Oproti tomu plazmidy s inducibilním galaktózovým promotorem (GAL) indukovaly expresi daného proteinu pouze v médiu s přidavkem galaktózy. Stanovené velikosti transkripčních potenciálů konstitutivně i inducibilně exprimovaného proteinu IFI16 se pohybovaly na úrovni transkripčních potenciálů prázdných vektorů. Tento trend byl zaznamenán nejen u kmene PUMA, ale i všech ostatních kmenů v čase T_6 i T_{24} (viz Přílohy). Z výsledků vyplývá, že protein neinteraguje s dsDNA sekvence PUMA nebo nevykazuje transkripční aktivitu, přestože byl fúzován s transkripční doménou proteinu p53, která i v případě jedné kopie u mutovaného proteinu p53 vykazuje alespoň poloviční transkripční potenciál oproti nemutovanému proteinu p53 [437].

Dále byly sledovány transkripční potenciály samotného proteinu p53 s konstitutivním a inducibilním typem promotoru a změny při jeho koexpresi s proteinem IFI16. Transkripční potenciál proteinu p53 s galaktózovým promotorem v médiu bez přidavku galaktózy dosahoval, stejně jako protein IFI16 s oběma typy promotorů, velikost účinku prázdných vektorů, protože buňky kultivované v médiu bez přidavku galaktózy neindukovaly expresi proteinu p53 s inducibilním promotorem. Oproti tomu v médiu s přidavkem 0,12 % galaktózy vykazoval protein p53 s inducibilním promotorem silný transkripční potenciál sám i při koexpresi s proteinem IFI16 TAD (s konstitutivním promotorem). Takto volená kombinace plazmidů umožňuje základní pohled na interakce proteinu IFI16 s proteinem p53 a jeho vazbu k DNA, ale výsledky získané během inducibilní exprese nelze srovnávat s výsledky získanými bazální expresí. Dosažené výsledky tak mohly být v předešlé práci *Využití kvasinkového isogenního systému ke studiu vazby proteinu IFI16 na DNA* ovlivněny množstvím transformované pDNA v buňkách. Slibných výsledků bylo dosaženo v případě opačné kombinace promotorů proteinů p53 a IFI16, kdy plazmid exprimující protein p53 obsahoval konstitutivní promotor a plazmid pro produkci proteinu IFI16 TAD inducibilní galaktózový promotor. Vzhledem k tomu, že docházelo ke stálé expresi proteinu p53 byly naměřeny transkripční potenciály samotného proteinu p53 i jeho koexpresi s proteinem IFI16 u obou typů médií. Koexpresi plazmidů kombinujících stabilní expresi proteinu p53 a indukovanou expresi proteinu IFI16 TAD tedy může sloužit jako vhodný systém pro studium interakcí proteinu IFI16 se strukturami DNA i samotným proteinem p53.



Obrázek 5.4.1: Transaktivační potenciál proteinů p53, IFI16 TAD a jejich vzájemné koexprese s různou kombinací konstitutivního a indukibilního promotoru v kmeni PUMA v čase T_{24} .

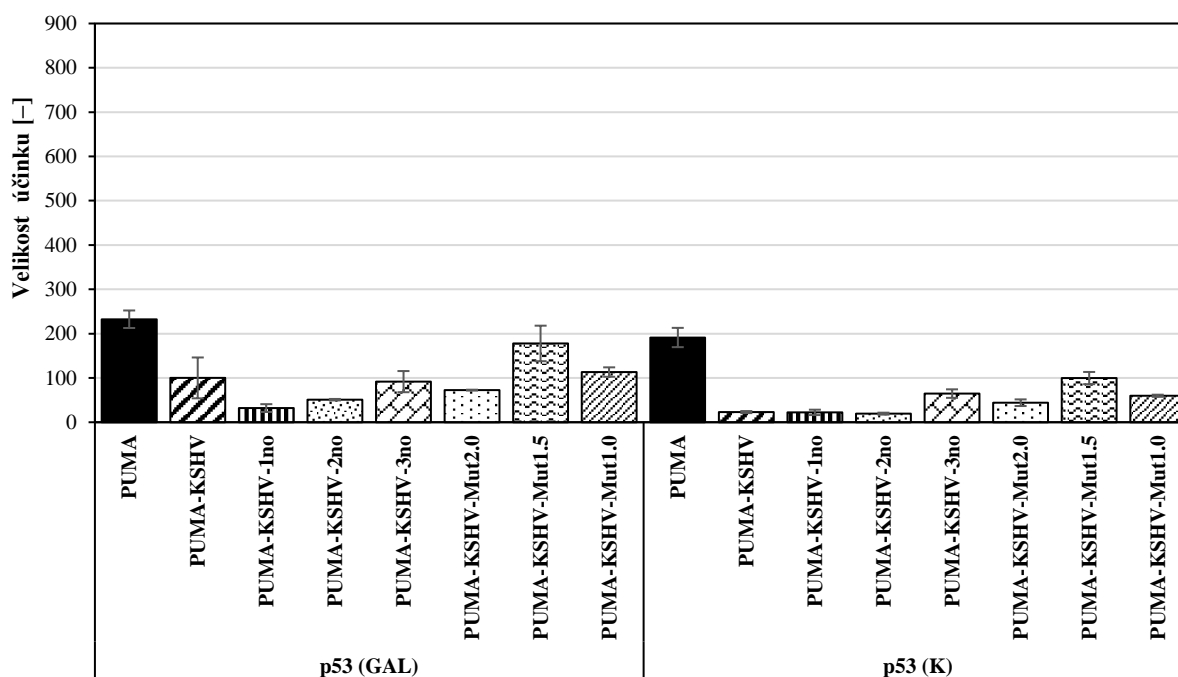
Struktury G-kvadruplexů se snadno tvoří za fyziologických podmínek. Jejich tvorba tedy není podmíněna přítomností G4 vázajících, resp. stabilizujících proteinů [174]. Již srovnání transaktivačních potenciálů samotného proteinu p53 v rámci jednotlivých kmenů by mělo umožnit posoudit tvorbu G-kvadruplexů *in vivo*. Na obrázku 5.4.2 jsou vyneseny závislosti transaktivačních potenciálů proteinu p53 s oběma typy promotorů v médiu s obsahem 0,12 % galaktózy v čase T_6 . U všech kmenů obsahujících sekvenci s potenciálem tvorby G-kvadruplexu došlo ke snížení transaktivačního potenciálu proteinu p53 oproti kmeni PUMA. Možnou příčinou nižších hodnot naměřených velikostí účinků mohlo být vložení sekvence oligonukleotidu o délce 22 párů bází (bp), která prodloužením promotorové oblasti snížila účinek aktivace transkripce. Je ovšem nepravděpodobné, že by tak krátká sekvence oligonukleotidů způsobila tak výrazné snížení transaktivačního potenciálu proteinu p53. Výsledky mohou rovněž ukazovat na represi transkripce reportérového genu vlivem formování struktury G-kvadruplexu. V takovém případě by naměřené velikosti účinků měly odpovídat velikosti účinku stanovenému u kmeni PUMA-KSHV, který *in vivo* prokazatelně strukturu G-kvadruplexu tvoří. Tato hypotéza se zdá jako méně pravděpodobná, protože mezi kmeny nesoucími potenciální motiv G-kvadruplexu byly naměřeny výrazné rozdíly v transkripční aktivitě, což ukazuje spíše na ovlivnění vazby proteinu p53 do cílového místa PUMA.

Vazebné preference proteinu p53 byly předmětem řady výzkumů [422, 427–431]. Bylo prokázáno, že protein p53 preferenčně váže sekvenci dvou dekamerů, které mohou ale nemusí být odděleny krátkým úsekem označovaným jako *spacer*. Sekvence dekameru 5'–3' je charakterizována motivem $R_3CW_2GY_3-N-R_3CW_2GY_3$, kde R označuje purinové báze, Y – báze pyrimidinu, W – adenin nebo thymin a N je oblast *spaceru* [427, 428], přičemž klíčovou roli hraje úsek CW_2G a dvojice bází, které s tímto jádrem sekvence sousedí. Bylo prokázáno, že přítomnost dvojic bází guaninu (GG) a cytosinu (CC) sousedících s jádrem cílového místa zvyšuje vazebné vlastnosti proteinu p53, což se projevuje na zvýšené aktivace transkripce genu, zatímco páry purinů AG

a pyrimidinů CT v sousedství vazebné oblasti vedou ke snížení vazby proteinu p53 do cílových míst v oblasti promotoru [422].

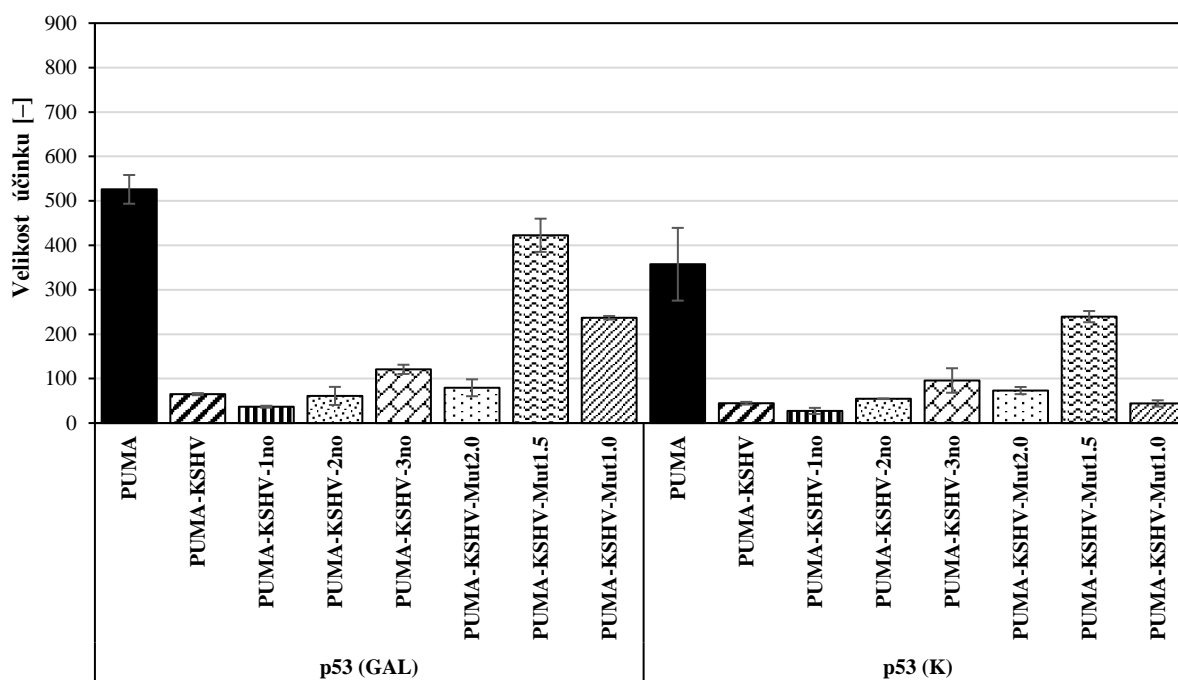
Vliv bází sousedících s jádrem vazebného místa proteinu p53 by vysvětloval rozdílné hodnoty a případné snížení transaktivačního potenciálu proteinu p53 i u sekvencí, které *in vivo* netvoří strukturu G-kvadruplexu. Aby bylo možné odlišit vliv tvorby G4 a vliv sekvence vazebného místa, je třeba výsledky jednotlivých kmenů srovnávat s výsledky kmene, který obsahuje klonovanou sekvenci o délce 42 bp (kvůli vyloučení vlivu vzdálenosti promotoru od reportérového genu), ale která prokazatelně netvoří strukturu G-kvadruplexu. Takovým kmenem může být kmen PUMA-KSHV-3no, protože během *in vitro* charakterizace sekvence KSHV-3no metodou cirkulárního dichroismu bylo prokázáno, že sekvence není schopna tvořit struktury G-kvadruplexu ani v prostředí stabilizujících draselných iontů (viz Obrázek 5.1.5).

Velikosti účinků proteinu p53 s inducibilním GAL promotorem stanovených u kmenů PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-2no byly nižší vzhledem k účinku stanovenému u kmene PUMA-KSHV-3no, který ovšem dosahoval podobného transaktivačního potenciálu jako kmen PUMA-KSHV, který prokazatelně strukturu G-kvadruplexu *in vivo* tvoří. Nicméně srovnání výsledků ostatních kmenů s hodnotami stanovenými u kmene PUMA-KSHV komplikuje vyšší směrodatná výběrová odchylka stanovená u tohoto kmene. Oproti tomu protein p53 s konstitutivním promotorem vykazoval u kmene PUMA-KSHV-3no vyšší aktivaci transkripce reportérového genu, než kmeny PUMA-KSHV, PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-2no. Výsledky tak naznačují možnou tvorbu struktury G-kvadruplexu i u posledních dvou zmíněných kmenů. Je otázkou, zda nízká transkripční aktivita proteinu p53 byla dána represí vlivem zformované struktury G-kvadruplexu, nebo byla způsobena pouze přítomností páru bází – GA, jak bylo diskutováno výše. Velikosti účinků stanovené proteinu p53 s inducibilním i konstitutivním promotorem u kmenů PUMA-KSHV-Mut1.5 a PUMA-KSHV-Mut1.0 dosahovaly přibližně stejného, nebo vyššího účinku, jako kmen PUMA-KSHV-3no a potvrzují tak předpoklad, že guaninový pár (GG) v sousedství vazebného jádra cílové sekvence proteinu p53 zvyšuje jeho vazebné schopnosti. Rovněž to ukazuje na absenci struktury G-kvadruplexu u těchto kmenů. Oproti tomu kmen PUMA-KSHV-Mut2.0 vykazoval snížení transaktivačního potenciálu proteinu p53 oproti kmeni PUMA-KSHV-3no, přestože obsahoval rovněž pár guaninů (GG) v blízkosti vazebného místa proteinu p53. Tyto výsledky naznačují možnou přítomnost struktury G-kvadruplexu v promotoru reportérového genu kmene PUMA-KSHV-Mut2.0.



Obrázek 5.4.2: Transaktivační potenciál proteinů p53 s oběma typy promotorů v médiu s obsahem 0,12 % galaktózy v čase T_6 .

Podobných výsledků bylo dosaženo při stanovení transaktivačního potenciálu proteinu p53 v čase T_{24} (viz Obrázek 5.4.3), kdy byly zaznamenány výraznější rozdíly naměřených účinků. Protein p53 s galaktózovým promotorem vykazoval nejvyšší transaktivační potenciál u kmene PUMA, který neobsahoval sekvenci s potenciálem tvorby G-kvadruplexu a poté u kmene PUMA-KSHV-Mut1.5 a PUMA-KSHV-Mut1.0, což naznačuje, že u těchto kmenů nedochází k tvorbě sekundární struktury G-kvadruplexu, která by snižovala účinek aktivace transkripce reportérového genu. Výsledky rovněž potvrzují možný vliv GG bází sousedících s konsenzuálním místem proteinu p53 na zvýšení jeho vazebných schopností. Stejně jako v případě výsledků naměřených po 6hodinové inkubaci, vykazoval i zde kmen PUMA-KSHV-Mut2.0 aktivační potenciál na úrovni kmene PUMA-KSHV, tedy nižší, než kmen PUMA-KSHV-3no, což naznačuje možnou tvorbu G-kvadruplexu. Rovněž u kmenů PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-2no byly naměřeny velikosti účinků srovnatelné s kmenem PUMA-KSHV, které dosahují nižších hodnot, než kmen PUMA-KSHV-3no a naznačují přítomnost G-kvadruplexu. Stejných výsledků bylo dosaženo při sledování transaktivačního potenciálu proteinu p53 s konstitutivním promotorem s výjimkou kmene PUMA-KSHV-Mut1.0, který dosahoval dokonce nižšího aktivačního potenciálu, než kmen PUMA-KSHV-Mut2.0. Je otázkou, zda u tohoto kmene docházelo k represii transkripce vlivem tvorby struktury G-kvadruplexu, nebo byly výsledky ovlivněny množstvím transformovaného plazmidu pro produkci proteinu p53, který v kombinaci s inducibilním promotorem mohl mnohonásobně navýšit aktivační potenciál proteinu p53. Při srovnání velikostí účinků tohoto kmene s konstitutivní expresí p53 je vidět, že po 24 hodinách dochází ke snížení transaktivačního potenciálu, oproti výsledkům naměřeným po 6hodinové inkubaci, což ukazuje spíše na odumírání buněk v průběhu kultivace a fyziologické změny kmene, než na tvorbu G-kvadruplexu.



Obrázek 5.4.3: Transkripční potenciál proteinů p53 s oběma typy promotorů v médiu s obsahem 0,12 % galaktózy v čase T_{24} .

Interakce proteinu IFI16 s DNA a vliv jeho případné vazby na aktivaci transkripce indukovanou proteinem p53 byla srovnána v rámci čtyř vybraných kmenů – PUMA, PUMA-KSHV, PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-3no po 24hodinové inkubaci (čas T_{24}). Vybrané kmeny poskytují optimální model pro posouzení *in vivo* vazebných vlastností proteinu IFI16, protože srovnání výsledků není zatíženo vlivem rozdílných vazebných vlastností proteinu p53, nebo fyziologickým stavem kultury, jak bylo diskutováno výše. Na obrázku 5.4.3 jsou vyneseny závislosti velikostí účinků samotného proteinu p53 s konstitutivním promotorem a jeho koexpresi s inducibilně exprimovaným proteinem IFI16 TAD při bazální i indukované expresi. U všech kmenů byly pozorovány snížené velikosti účinků při indukované expresi, tedy v médiu s přidavkem galaktózy. To lze vysvětlit možným prodlouženým lag-fáze, kdy docházelo k adaptaci kvasinkových kmenů na nové médium a nelze spojit s případnou tvorbou sekundárních struktur DNA.

Výsledky naměřené u kmene PUMA byly již diskutovány v rámci srovnání transkripčních potenciálů proteinů p53 a IFI16 TAD s různou kombinací promotorů (viz Obrázek 5.4.1). Stanovené transkripční potenciály u kmene PUMA několikanásobně přesahovaly velikosti účinků dalších kmenů, a to jak v případě exprese samotného proteinu p53, tak v případě jeho koexpresi s proteinem IFI16 TAD. U kmene PUMA nedocházelo ke snížení transkripčního potenciálu proteinu p53, protože kmen PUMA neobsahuje v promotorové oblasti reportérového genu sekvenci s potenciálem tvorby G-kvadruplexu, na který by se protein IFI16 specificky vázal, nebo které by ovlivňovaly vazebné vlastnosti proteinu p53.

Naopak kmen PUMA-KSHV nesl sekvenci KSHV, která prokazatelně tvoří strukturu G-kvadruplexu. Transkripční potenciál samotného proteinu p53 byl během bazální exprese snížen 9,5krát oproti transkripčnímu potenciálu v kmene PUMA. Při koexpresi s proteinem IFI16 TAD nebyl pozorován žádný vliv na expresi reportérového genu. Naopak v médiu s přidavkem 0,12 % galaktózy,

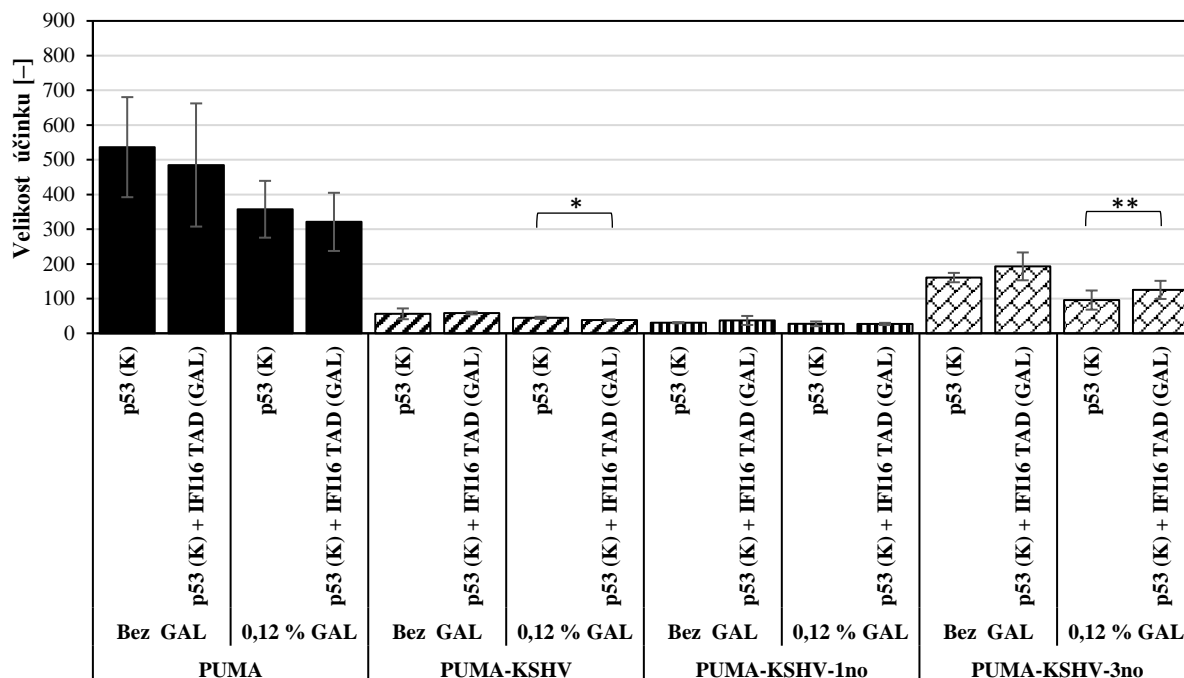
kde docházelo k indukci exprese proteinu IFI16 TAD bylo zaznamenáno statisticky významné snížení transaktivačního potenciálu p53 při koexpresi obou proteinů na hladině 0,05 (znázorněno hvězdičkou). Represe transkripce byla indukována strukturálně specifickou vazbou proteinu IFI16 na strukturu G-kvadruplexu v promotorové oblasti reportérového genu a jeho stabilizací, což potvrzují i výsledky předešlé studie [97]. Stabilizací motivu G-kvadruplexu v promotorech onkogenů může protein IFI16 inhibovat expresi onkogenů a napomáhat supresi nádoru [105, 266, 278, 279]. Stejný efekt je využíván i při stabilizaci struktur G-kvadruplexů tzv. G4 ligandy, které jsou v posledních několika letech studovány jako slibná terapeutika při léčbě rakoviny, ale jejichž využití není v současné době schváleno z důvodu nízké specifity jejich vazby a dosud málo probádaným mechanismům biologického účinku [265, 266]. Specifickou vazbu ke strukturám G-kvadruplexu protein IFI16 využívá rovněž při rozpoznání virové a bakteriální DNA, kdy dochází k tvorbě inflamazomu, který spouští signalizační kaskádu STING–TBK-1–IRF3, která indukuje expresi interferonu typu β [34]. Účinek samotného proteinu p53 u kmene PUMA-KSHV během inducibilní exprese byl oproti kmeni PUMA snížen 8krát.

Dále byly srovnány velikosti účinků u kmenů nesoucích mutované sekvence KSHV – PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-3no. Mutované sekvence KSHV-1no a KSHV-3no (spolu s KSHV-2no) byly navrženy tak, aby nemohly tvořit intramolekulární struktury čtyř- nebo třítetradových G-kvadruplexů, jejichž tvorba byla prokázána v biologických systémech [99–101]. Obě mutované sekvence (KSHV-1no i KSHV-3no) se vzájemně lišily stanoveným *G4 Hunter skóre*, které určuje potenciál pro tvorbu G-kvadruplexu.

Kmen PUMA-KSHV-1no byl pro srovnání vybrán z důvodu vysoké hodnoty *G4 Hunter skóre* a přítomnosti mnohočetných bází guaninu, které mohou interagovat s HIN-A doménou proteinu IFI16 TAD, jak bylo dříve prokázáno [97]. U kmene PUMA-KSHV-1no docházelo ke snížení transaktivačního potenciálu samotného proteinu p53 oproti kmenu PUMA 13krát v prostředí média s přidavkem galaktózy, a až 17,5krát v prostředí média bez galaktózy. Kmen PUMA-KSHV-1no tedy vykazoval nižší potenciál aktivace transkripce samotného proteinu p53 než kmen PUMA-KSHV při obou typech exprese. Jak bylo diskutováno výše, mohl být tento efekt pravděpodobně způsoben charakterem bází (GA) sousedících s vazebným místem proteinu p53 v oblasti promotoru *PUMA*. Při koexpresi proteinů p53 s IFI16 TAD v prostředí obou medií nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl velikostí účinků oproti samotnému proteinu p53, což naznačuje, že ikdyž je protein IFI16 exprimován (médiu s galaktózou) nemá jeho případná vazba s dsDNA bohaté na guaninové báze vliv na aktivaci transkripce indukovanou proteinem p53.

Kmen PUMA-KSHV-3no obsahoval sekvenci bohatou na báze adeninu s nízkým potenciálem tvorby G-kvadruplexu, zato s délkou vkládané sekvence stejnou s kmeny obsahujícím KSHV nebo některou z jeho mutovaných forem, která chyběla u výše zmíněného kmene PUMA. Mutovaná sekvence KSHV-3no v tomto kmeni není schopna tvořit strukturu G-kvadruplexu *in vitro* a neinteraguje s proteinem IFI16 jak bylo prokázáno na základě CD spektroskopie (viz Obrázek 5.1.5) a kompetitivních vazebných experimentů (viz Obrázek 5.3.4 (A)). Velikosti účinků samotného proteinu p53 byly u kmene PUMA-KSHV-3no při bazální a inducibilní expresi 3,34krát a 3,73 nižší oproti účinkům naměřeným v kmeni PUMA. Zatímco během bazální exprese nebyl pozorován významný vliv proteinu IFI16 na aktivaci transkripce proteinem p53, při koexpresi obou proteinů v médiu s přidavkem 0,12 % galaktózy docházelo ke statisticky významnému zvýšení transaktivačního potenciálu proteinu p53 na hladině 0,01 (značeno hvězdičkami). Zvýšení aktivačního

potenciálu proteinu p53 při koexpresi naznačuje, že v případě absence G-kvadruplexu, nebo jiného strukturního motivu, na který by se protein IFI16 TAD mohl vázat, usnadňuje protein IFI16 vedení proteinu p53 do cílového místa v promotoru reportérového genu, což indukuje zvýšené exprese reportérového genu.



Obrázek 5.4.4: Závislost transkripčního potenciálu proteinů p53 s konstitutivním promotorem a jeho koexpresi s IFI16 TAD s inducibilním GAL promotorem v čase T_{24} . Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).

Dosažené výsledky odpovídají výsledkům z již dříve prováděných studií. Protein-proteinové interakce IFI16-p53 byly studovány s využitím rekombinantních HIN domén proteinu IFI16 a dvou různých GST-p53 C-konců. Bylo prokázáno, že k interakci obou proteinů, není třeba protein IFI16 plné délky a že samotná HIN-A doména je schopna vázat C-konec proteinu p53 s přítomnou tetramerizační doménou i bez ní. HIN-B doména neinteraguje s C-koncem proteinu p53, ale je schopna vázat se k jádrové doméně proteinu p53 plné délky a přispívat tak k vazbě proteinu p53 k molekulám DNA [12, 439].

Vliv interakce obou proteinů na regulaci transkripce byl sledován i s využitím luciferázových reportérových testů provedených v buněčné linii lidského nemalobuněčného karcinomu plic H1299, kdy byla namísto responzivního elementu genu *PUMA* využita sekvence oligonukleotidu z promotoru genu *p21*, který je zapojen do proapoptické dráhy indukované proteinem p53. Experimenty prokázaly zvýšení transkripčního potenciálu proteinu p53 v přítomnosti proteinu IFI16 nebo jeho HIN domén oproti samotnému proteinu p53, přičemž vliv samotných HIN domén byl srovnatelný s vlivem proteinu plné délky. Prostřednictvím HIN domén protein IFI16 kooperativně zvyšuje specifitost a afinitu vazby proteinu p53 ke konsenzuálním sekvencím DNA a indukuje tvorbu stabilního komplexu p53-DNA [12]. Vzhledem k významnému zapojení proteinu p53 do řady buněčných procesů, jejichž regulace je dána právě jeho vazebnými vlastnostmi (resp. vazebnými vlastnostmi jednotlivých domén p53) může protein IFI16 nepřímo ovlivňovat i nádorovou supresi a apoptózu.

Na základě výše uvedených mechanismů, by mělo docházet ke zvýšení exprese reportérového genu i v případě kmene PUMA a u všech kmenů s mutovanou sekvencí KSHV, které nedosahovaly statisticky významného snížení velikosti transaktivačního účinku jako tomu bylo u kmene PUMA-KSHV (viz Přílohy). U kmene PUMA lze tento jev vysvětlit vyššími hodnotami naměřených odchylek, které zkreslují výsledné srovnání. U ostatních kmenů mohlo docházet k nespecifické vazbě proteinu IFI16 TAD k mutovaným sekvencím KSHV.

Vazba proteinu IFI16 nebo DNA-vazebných HIN domén k jiným než G-kvadruplexovým strukturám DNA byla již předmětem výzkumu a bylo prokázáno, že protein plné délky nevykazuje vazbu k jednořetězcové DNA a s dvouřetězcovou DNA interaguje sekvencně nespecifickým způsobem [6] prostřednictvím elektrostatických interakcí mezi záporně nabitou páteří řetězce cukr-fosfát a pozitivně nabitými proteinovými zbytky [96]. Dále bylo prokázáno, že samotná HIN-A doména preferenčně váže ssDNA bohatou na guaninové báze, které mají potenciál tvorby G-kvadruplexu oproti stejné sekvenci dsDNA [97]. Další experimenty prokázaly preferenci proteinu k nadmolekulárním strukturám DNA jako jsou nadšroubovicové (*supercoiled*) a křížové struktury [441].

Během nespecifické vazby k DNA dochází k oligomerizaci proteinu IFI16 prostřednictvím volné PYRIN domény, která s proteinem p53 neinteraguje, ale je odpovědná za převážnou část protein-proteinových interakcí proteinu IFI16 [439]. Za snížení exprese reportérového genu tedy nemusí být odpovědná stabilizace struktury G-kvadruplexu, nýbrž stericke bránění vazebného místa proteinu p53, což by vysvětlovalo i nižší transaktivační potenciál proteinu p53 při koexpresi s proteinem IFI16 TAD během indukibilní exprese, který ovšem nedosahoval statisticky významné hladiny. Výše popsany mechanismus oligomerizace by bylo možné ověřit *in vitro* pomocí mikroskopie atomárních sil nebo metodou FLIM.

6 ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce byla analýza vazby proteinu IFI16 na DNA, a to konkrétně na sekvence DNA s potenciálem tvorby G-kvadruplexu. Teoretická část této práce je rozdělena do čtyř hlavních oblastí. První část je věnována proteinu IFI16 – jeho struktuře a vazebnými i biologickým vlastnostem vycházejícím ze schopnosti proteinu rozpoznat specifické struktury DNA. Dále jsou v práci popsány struktury G-kvadruplexů – jejich konformace, výskyt v genomech organismů, interakce s dalšími proteiny a potenciální zacílení G4 stabilizujícími ligandy v rámci protinádorové terapie. V druhé polovině teoretické části práce jsou blíže představeny metody využití k charakterizaci analyzovaných sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu a k analýze vazebných vlastností proteinu IFI16. Poslední část je věnována proteinu p53 a jeho transaktivačnímu potenciálu, který byl využit ke studiu vazebných vlastností proteinu IFI16 v isogenním kvasinkovém systému.

Experimentální část diplomové práce je rozdělena rovněž do čtyř oblastí. V první části byly biofyzikálními metodami charakterizovány použité sekvence DNA s potenciálem tvorby G-kvadruplexu. Vzorky byly charakterizovány v prostředí bez přídavku a s přídavkem stabilizujících draselných iontů prostřednictvím měření cirkulárního dichroismu, ThT vazebných fluorescenčních testů a elektroforetických testů posunu mobility. CD spektra a výsledky fluorescenčních vazebných testů ukázaly v prostředí bez přídavku draselných iontů možnou tvorbu paralelní struktury G-kvadruplexu u vzorků KSHV, KSHV-1no a KSHV-Mut2.0. Stabilizace draselnými ionty indukovala tvorbu paralelní struktury G4 u vzorků KSHV, KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-Mut1.0, antiparalelní konformace G4 u vzorku KSHV-Mut1.5 a hybridní konformace G4 u vzorku KSHV-Mut2.0. Vzorky PUMA, KSHV-3no a Random-22 nevykazovaly na CD spektrech přítomnost G4 ani v prostředí stabilizujících draselných iontů a výsledky vazebného experimentu s G4 ligandem ukázaly pouze slabou vazbu ThT k vytvořeným strukturám DNA odpovídající vazbě k duplexům DNA. U vzniklých struktur G-kvadruplexů nedocházelo ke změně konformace v čase, což prokázala měření CD provedená 24 hodin od prvního měření. Výsledky elektroforetického testu posunu mobility ukázaly, že stabilizace draselnými ionty vede k tvorbě převážně intermolekulárních struktur G-kvadruplexů, kdy sekvence KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-3no formují intermolekulární struktury G-kvadruplexu tvořené více řetězci DNA, zatímco vzorky oligonukleotidů KSHV-Mut1.0, KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0 mutované z původní sekvence KSHV a sama KSHV formují spíše intramolekulárních struktury G4 s rozdílnou konformací nebo příp. intermolekulární struktury G4 tvořené menším počtem vláken.

Protein IFI16 byl pro *in vitro* vazbové experimenty izolován a purifikován prostřednictvím proteinové afinitní chromatografie. Celkem bylo získáno pět elucí proteinu IFI16 plné délky. U všech elucí byla po imunologické detekci nitrocelulóзовé membrány a barvení gelu pozorována fragmentace proteinu. Proteinové eluce E2 ($0,575 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), E3 ($0,623 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a E4 ($0,335 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) vykazovaly nejvyšší zastoupení nefragmentovaného proteinu plné délky a byly dále použity pro vazebné experimenty s fluorescenčně značeným G4 KSHV. U vzorků všech tří elucí byl pozorován úbytek volné DNA fluorescenčně značeného KSHV a tvorba komplexu DNA:protein s rostoucí koncentrací proteinu, což ukazuje na interakci proteinu s motivem G-kvadruplexu. Přestože byla u všech tří elucí pozorována různá míra fragmentace proteinu, nevykazovaly vzorky elucí proteinu IFI16 rozdíly ve vazbě ke G-kvadruplexu. Specifická vazba IFI16 na sekundární strukturu G4 se projevila shodným úbytkem DNA již při molárním poměru DNA:protein 1:1 a úplným vymizením volné DNA při molárním poměru DNA:protein 1:4. Na základě přítomnosti minimálního

množství fragmentů a stanovení nejvyšší koncentrace proteinu IFI16 byla pro následné kompetitivní vazebné experimenty *in vitro* použita eluce E3. Kompetitivní vazebné experimenty byly realizovány v prostředí stabilizujících draselných iontů, ve kterém (dle výsledků biofyzikální charakterizace oligonukleotidů) docházelo k tvorbě různých konformací G-kvadruplexů a dalších motivů DNA. Výsledky prokázaly specifickou vazbu ke strukturám formujícím G-kvadruplex již při velmi nízkých koncentracích kompetitoru. Stanovené intenzity fluorescence volné DNA u kompetitorů KSHV, KSHV-1no, KSHV-2no, KSHV-Mut1.0, KSHV-Mut1.5 a KSHV-Mut2.0 při srovnávacím kompetitivním vazebném experimentu dosahovaly přibližně stejných hodnot a jejich rozdíly odpovídaly rozpětí chybových úseček. I přes specifickou vazbu k DNA G-kvadruplexům, nebyla u proteinu IFI16 pozorována preference ke konkrétní konformaci G-kvadruplexu.

V poslední části diplomové práce byly zkoumány vazebné vlastnosti proteinu IFI16 v jednohybridním kvasinkovém systému. Isogenní kvasinkové kmeny se lišily v místech responzivního elementu, který obsahoval cílové místo pro vazbu nádorového supresoru p53, a některou ze sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu. Nejprve byla vybrána vhodná kombinace plazmidů pro expresi obou proteinů, která by umožnila správné srovnání změny transkripčního potenciálu p53 při bazální i indukované expresi proteinů. Pro závěrečné posouzení vazebných vlastností a biologického vlivu proteinu IFI16 byl vybrán plazmid pLS p53 WT pro expresi proteinu p53 s konstitutivním promotorem a pTSAG TAD IFI16 pro produkci proteinu IFI16 s transkripční doménou proteinu p53 a GAL inducibilním promotorem. Dále byla studována transkripce reportérového genu při expresi samotného proteinu p53. Výsledky ukázaly významný vliv nukleotidů umístěných v blízkosti p53 cílového místa PUMA a fyziologické změny u jednoho z vybraných kmenů, které znemožňovaly jeho další zapojení do experimentů. Ke studiu vazebných vlastností proteinu IFI16 byly použity kmeny PUMA, PUMA-KSHV, PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-3no. Protein IFI16 nevázal sekvenci PUMA a neindukoval expresi reportérového genu, přestože byl fúzován s transkripční doménou proteinu p53. Vazba proteinu IFI16 TAD na G-kvadruplex v kmeni PUMA-KSHV indukovala represí transkripce reportérového genu, která se projevila statisticky významným snížením velikosti účinku transaktivace proteinu p53 na hladině 0,05. V kmeni PUMA-KSHV-1no nedocházelo ke změnám v aktivaci transkripce reportérového genu, přestože je sekvence samotného KSHV-1no bohatá na G-báze a umožňuje kooperativní vazbu a oligomerizaci proteinu IFI16. Naopak při absenci jakéhokoliv vazebného místa napomáhá protein IFI16 vedení proteinu p53 do cílového místa v promotoru reportérového genu, jak ukázaly výsledky u kmene PUMA-KSHV-3no, kdy bylo pozorováno statisticky významným zvýšením transaktivace reportérového genu na hladině 0,01.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LUAN, Yi, Peter LENGYEL a Chuan-Ju LIU. p204, a p200 family protein, as a multifunctional regulator of cell proliferation and differentiation. *Cytokine & growth factor reviews* [online]. 2008, **19**(0), 357–369. ISSN 1359-6101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2008.11.002
- [2] PALUDAN, Søren R. a Andrew G. BOWIE. Immune sensing of DNA. *Immunity* [online]. 2013, **38**(5), 870–880. ISSN 1097-4180. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2013.05.004
- [3] ORZALLI, Megan H. a David M. KNIPE. Cellular sensing of viral DNA and viral evasion mechanisms. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2014, **68**, 477–492. ISSN 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-091313-103409
- [4] BAUMANN, Jörg G. Intracellular restriction factors in mammalian cells--An ancient defense system finds a modern foe. *Current HIV research* [online]. 2006, **4**(2), 141–168. ISSN 1570-162X. Dostupné z: doi:10.2174/157016206776055093
- [5] MALIM, Michael H. a Paul D. BIENIASZ. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2**(5), a006940. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006940
- [6] MORRONE, Seamus R., Tao WANG, Leeza M. CONSTANTOULAKIS, Richard M. HOOY, Michael J. DELANNOY a Jungsan SOHN. Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2014, **111**(1), E62-71. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1313577111
- [7] DAWSON, M. J. a J. A. TRAPANI. The interferon-inducible autoantigen, IFI 16: localization to the nucleolus and identification of a DNA-binding domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1995, **214**(1), 152–162. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1995.2269
- [8] KOUL, D., N. U. OBEYESEKERE, J. U. GUTTERMAN, G. B. MILLS a D. CHOUBEY. p202 self-associates through a sequence conserved among the members of the 200-family proteins. *FEBS letters* [online]. 1998, **438**(1–2), 21–24. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/s0014-5793(98)01263-0
- [9] XIN, Hong, Jonathan CURRY, Ricky W. JOHNSTONE, Brian J. NICKOLOFF a Divaker CHOUBEY. Role of IFI 16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(31), 4831–4840. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1206754
- [10] YAN, Hongyue, Kush DALAL, Benjamin K. HON, Philippe YOUKHARIBACHE, Desmond LAU a Frederic PIO. RPA nucleic acid-binding properties of IFI16-HIN200. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2008, **1784**(7–8), 1087–1097. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2008.04.004
- [11] LUDLOW, Louise E. A., Ricky W. JOHNSTONE a Christopher J. P. CLARKE. The HIN-200 family: more than interferon-inducible genes? *Experimental Cell Research* [online]. 2005, **308**(1), 1–17. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.032
- [12] LIAO, Jack C.C., Robert LAM, Vaclav BRAZDA, Shili DUAN, Mani RAVICHANDRAN, Justin MA, Ting XIAO, Wolfram TEMPEL, Xiaobing ZUO, Yun-Xing WANG, Nickolay Y. CHIRGADZE a Cheryl H. ARROWSMITH. Interferon-Inducible Protein 16: Insight into the Interaction with Tumor Suppressor p53. *Structure (London, England : 1993)* [online]. 2011, **19**(3), 418–429. ISSN 0969-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2010.12.015
- [13] NI, Xiangmin, Heng RU, Feng MA, Lixia ZHAO, Neil SHAW, Yingang FENG, Wei DING, Weibin GONG, Qiaofeng WANG, Songying OUYANG, Genhong CHENG a Zhi-Jie LIU. New insights into the structural basis of DNA recognition by HINa and HINb domains of IFI16. *Journal of Molecular Cell Biology* [online]. 2016, **8**(1), 51–61. ISSN 1674-2788. Dostupné z: doi:10.1093/jmcb/mjv053
- [14] HUPPERT, Julian L. a Shankar BALASUBRAMANIAN. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(9), 2908–2916. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki609
- [15] FRY, Michael. Tetraplex DNA and its interacting proteins. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* [online]. 2007, **12**, 4336–4351. ISSN 1093-9946. Dostupné z: doi:10.2741/2391
- [16] OGANESIAN, Liana a Tracy M. BRYAN. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* [online]. 2007, **29**(2), 155–165. ISSN 0265-9247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.20523

- [17] MENDOZA, Oscar, Anne BOURDONCLE, Jean-Baptiste BOULÉ, Robert M. BROSH a Jean-Louis MERGNY. G-quadruplexes and helicases. *Nucleic Acids Research* [online]. 2016, **44**(5), 1989–2006. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw079
- [18] BRÁZDA, Václav, Lucia HÁRONÍKOVÁ, Jack C. C. LIAO a Miroslav FOJTA. DNA and RNA quadruplex-binding proteins. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(10), 17493–17517. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms151017493
- [19] *On Characterizing the Interactions between Proteins and Guanine Quadruplex Structures of Nucleic Acids* [online]. [vid. 2022-07-28]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jna/2017/9675348/>
- [20] PLATELLA, Chiara, Claudia RICCARDI, Daniela MONTESARCHIO, Giovanni N. ROVIELLO a Domenica MUSUMECI. G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* [online]. 2017, **1861**(5 Pt B), 1429–1447. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.027
- [21] MA, Dik-Lung, Chun WU, Zhen-Zhen DONG, Wing-Sze TAM, Sze-Wan WONG, Chao YANG, Guodong LI a Chung-Hang LEUNG. The Development of G-Quadruplex-Based Assays for the Detection of Small Molecules and Toxic Substances. *Chemistry, an Asian Journal* [online]. 2017, **12**(15), 1851–1860. ISSN 1861-471X. Dostupné z: doi:10.1002/asia.201700533
- [22] RIOZ-MARTÍNEZ, Ana a Gerard ROELFES. DNA-based hybrid catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2015, **25**, 80–87. ISSN 1879-0402. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2014.12.033
- [23] CALZOLARI, A., R. DI FELICE, E. MOLINARI a A. GARBESI. G-quartet biomolecular nanowires. *Applied Physics Letters* [online]. 2002, **80**(18), 3331–3333. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.1476700
- [24] YATSUNYK, Liliya A., Oscar MENDOZA a Jean-Louis MERGNY. „Nano-oddities”: unusual nucleic acid assemblies for DNA-based nanostructures and nanodevices. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2014, **47**(6), 1836–1844. ISSN 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/ar500063x
- [25] RENAUD DE LA FAVERIE, Amandine, Aurore GUÉDIN, Amina BEDRAT, Liliya A. YATSUNYK a Jean-Louis MERGNY. Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, **42**(8), e65. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gku111
- [26] MERGNY, Jean-Louis, Jing LI, Laurent LACROIX, Samir AMRANE a Jonathan B. CHAIRES. Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(16), e138. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gni134
- [27] KEJNOVSKÁ, Iva, Daniel RENČIUK, Jan PALACKÝ a Michaela VORLÍČKOVÁ. CD Study of the G-Quadruplex Conformation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2019, **2035**, 25–44. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9666-7_2
- [28] BRUNETTE, Rebecca L., Janet M. YOUNG, Deborah G. WHITLEY, Igor E. BRODSKY, Harmit S. MALIK a Daniel B. STETSON. Extensive evolutionary and functional diversity among mammalian AIM2-like receptors. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2012, **209**(11), 1969–1983. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20121960
- [29] CRIDLAND, Jasmyn A., Eva Z. CURLEY, Michelle N. WYKES, Kate SCHRODER, Matthew J. SWEET, Tara L. ROBERTS, Mark A. RAGAN, Karin S. KASSAHN a Katryn J. STACEY. The mammalian PYHIN gene family: Phylogeny, evolution and expression. *BMC Evolutionary Biology* [online]. 2012, **12**(1), 140. ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2148-12-140
- [30] CONNOLLY, Dympna J. a Andrew G. BOWIE. The emerging role of human PYHIN proteins in innate immunity: implications for health and disease. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2014, **92**(3), 405–414. ISSN 1873-2968. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2014.08.031
- [31] JAKOBSEN, Martin R. a Søren R. PALUDAN. IFI16: At the interphase between innate DNA sensing and genome regulation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2014, **25**(6), 649–655. ISSN 1879-0305. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2014.06.004
- [32] STEHLIK, Christian a John C. REED. The PYRIN connection: novel players in innate immunity and inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2004, **200**(5), 551–558. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20032234

- [33] HILLER, Sebastian, Andreas KOHL, Francesco FIORITO, Torsten HERRMANN, Gerhard WIDER, Jürg TSCHOPP, Markus G. GRÜTTER a Kurt WÜTHRICH. NMR structure of the apoptosis- and inflammation-related NALP1 pyrin domain. *Structure (London, England: 1993)* [online]. 2003, **11**(10), 1199–1205. ISSN 0969-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2003.08.009
- [34] UNTERHOLZNER, Leonie, Sinead E. KEATING, Marcin BARAN, Kristy A. HORAN, Søren B. JENSEN, Shruti SHARMA, Cherilyn M. SIROIS, Tengchuan JIN, Eicke LATZ, T. Sam XIAO, Katherine A. FITZGERALD, Søren R. PALUDAN a Andrew G. BOWIE. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology* [online]. 2010, **11**(11), 997–1004. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1932
- [35] CHOUBEY, Divaker, Ranjan DEKA a Shuk-mei HO. Interferon-inducible IFI16 protein in human cancers and autoimmune diseases. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* [online]. 2008, **13**, 598–608. ISSN 1093-9946. Dostupné z: doi:10.2741/2705
- [36] JOHNSTONE, Ricky W. a Joseph A. TRAPANI. Transcription and Growth Regulatory Functions of the HIN-200 Family of Proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 1999, **19**(9), 5833–5838. ISSN 0270-7306.
- [37] OUCHI, Mutsuko a Toru OUCHI. Role of IFI16 in DNA damage and checkpoint. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* [online]. 2008, **13**, 236–239. ISSN 1093-9946. Dostupné z: doi:10.2741/2673
- [38] KIS-TOTH, Katalin, Attila SZANTO, To-Ha THAI a George C. TSOKOS. Cytosolic DNA-activated Human Dendritic Cells are Potent Activators of the Adaptive Immune Response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [online]. 2011, **187**(3), 1222–1234. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1100469
- [39] BRIGGS, L. J., R. W. JOHNSTONE, R. M. ELLIOT, C. Y. XIAO, M. DAWSON, J. A. TRAPANI a D. A. JANS. Novel properties of the protein kinase CK2-site-regulated nuclear- localization sequence of the interferon-induced nuclear factor IFI 16. *The Biochemical Journal*. 2001, **353**(Pt 1), 69–77. ISSN 0264-6021.
- [40] VEERANKI, Sudhakar a Divaker CHOUBEY. Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: regulation of subcellular localization. *Molecular Immunology* [online]. 2012, **49**(4), 567–571. ISSN 1872-9142. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2011.11.004
- [41] COSTA, S., C. BORGOGNA, M. MONDINI, M. DE ANDREA, P. L. MERONI, E. BERTI, M. GARIGLIO a S. LANDOLFO. Redistribution of the nuclear protein IFI16 into the cytoplasm of ultraviolet B-exposed keratinocytes as a mechanism of autoantigen processing. *The British Journal of Dermatology* [online]. 2011, **164**(2), 282–290. ISSN 1365-2133. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10097.x
- [42] BRYAN, Nicole B., Andrea DORFLEUTNER, Yon ROJANASAKUL a Christian STEHLIK. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* [online]. 2009, **182**(5), 3173–3182. ISSN 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.0802367
- [43] KERUR, Nagaraj, Mohanan Valiya VEETIL, Neelam SHARMA-WALIA, Virginie BOTTERO, Sathish SADAGOPAN, Pushpalatha OTAGERI a Bala CHANDRAN. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host & Microbe* [online]. 2011, **9**(5), 363–375. ISSN 1934-6069. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2011.04.008
- [44] CHOUBEY, Divaker, Xin DUAN, Eric DICKERSON, Larissa PONOMAREVA, Ravichandran PANCHANATHAN, Hui SHEN a Ratika SRIVASTAVA. Interferon-inducible p200-family proteins as novel sensors of cytoplasmic DNA: role in inflammation and autoimmunity. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* [online]. 2010, **30**(6), 371–380. ISSN 1557-7465. Dostupné z: doi:10.1089/jir.2009.0096
- [45] *The HIN Domain of IFI16* [online]. 9. března 2011 [vid. 2020-11-20]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=3760383_nihms473695f1.jpg
- [46] ALBRECHT, Mario, Divaker CHOUBEY a Thomas LENGAUER. The HIN domain of IFI-200 proteins consists of two OB folds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2005, **327**(3), 679–687. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.056
- [47] THEOBALD, Douglas L., Rachel M. MITTON-FRY a Deborah S. WUTTKE. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* [online]. 2003, **32**, 115–133. ISSN 1056-8700. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biophys.32.110601.142506

- [48] KERR, Iain D., Ross I. M. WADSWORTH, Liza CUBEDDU, Wulf BLANKENFELDT, James H. NAISMITH a Malcolm F. WHITE. Insights into ssDNA recognition by the OB fold from a structural and thermodynamic study of *Sulfolobus* SSB protein. *The EMBO journal* [online]. 2003, **22**(11), 2561–2570. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdg272
- [49] JOHNSTONE, R. W., J. A. KERRY a J. A. TRAPANI. The human interferon-inducible protein, IFI 16, is a repressor of transcription. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1998, **273**(27), 17172–17177. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.27.17172
- [50] PAWŁOWSKI, K., F. PIO, Z. CHU, J. C. REED a A. GODZIK. PAAD - a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2001, **26**(2), 85–87. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/s0968-0004(00)01729-1
- [51] BERGSBAKEN, Tessa, Susan L. FINK a Brad T. COOKSON. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews. Microbiology* [online]. 2009, **7**(2), 99–109. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2070
- [52] FRANK, Daniel a James E. VINCE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2019, **26**(1), 99–114. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/s41418-018-0212-6
- [53] LIEPINSH, Edvards, Raitis BARBALS, Edgar DAHL, Anatoly SHARIPO, Eike STAUB a Gottfried OTTING. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2003, **332**(5), 1155–1163. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2003.07.007
- [54] DALAL, Kush a Frederic PIO. Thermodynamics and stability of the PAAD/DAPIN/PYRIN domain of IFI-16. *FEBS Letters* [online]. 2006, **580**(13), 3083–3090. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2006.04.056
- [55] CHOUBEY, Divaker. DNA-responsive inflammasomes and their regulators in autoimmunity. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* [online]. 2012, **142**(3), 223–231. ISSN 1521-7035. Dostupné z: doi:10.1016/j.clim.2011.12.007
- [56] EGISTELLI, Lorenza, Silvia CHICHIARELLI, Elisa GAUCCI, Margherita EUFEMI, M. Eugenia SCHININÀ, Alessandra GIORGI, Ioan LASCU, Carlo TURANO, Anna GIARTOSIO a Laura CERVONI. IFI16 and NM23 bind to a common DNA fragment both in the P53 and the cMYC gene promoters. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2009, **106**(4), 666–672. ISSN 1097-4644. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.22053
- [57] MONDINI, Michele, Matteo VIDALI, Marco DE ANDREA, Barbara AZZIMONTI, Paolo AIRÒ, Roberta D'AMBROSIO, Piersandro RIBOLDI, Pier Luigi MERONI, Emanuele ALBANO, Yehuda SHOENFELD, Marisa GARIGLIO a Santo LANDOLFO. A novel autoantigen to differentiate limited cutaneous systemic sclerosis from diffuse cutaneous systemic sclerosis: the interferon-inducible gene IFI16. *Arthritis and Rheumatism* [online]. 2006, **54**(12), 3939–3944. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.22266
- [58] MONDINI, Michele, Matteo VIDALI, Paolo AIRÒ, Marco DE ANDREA, Piersandro RIBOLDI, Pier Luigi MERONI, Marisa GARIGLIO a Santo LANDOLFO. Role of the interferon-inducible gene IFI16 in the etiopathogenesis of systemic autoimmune disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2007, **1110**, 47–56. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1423.006
- [59] GUGLIESI, Francesca, Mandar BAWADEKAR, Marco DE ANDREA, Valentina DELL'OSTE, Valeria CANEPARO, Angela TINCANI, Marisa GARIGLIO a Santo LANDOLFO. Nuclear DNA sensor IFI16 as circulating protein in autoimmune diseases is a signal of damage that impairs endothelial cells through high-affinity membrane binding. *PloS One* [online]. 2013, **8**(5), e63045. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0063045
- [60] CANEPARO, V., T. CENA, M. DE ANDREA, V. DELL'OSTE, P. STRATTA, M. QUAGLIA, A. TINCANI, L. ANDREOLI, S. CEFFA, M. TARABORELLI, C. MAGNANI, S. LANDOLFO a M. GARIGLIO. Anti-IFI16 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Lupus* [online]. 2013, **22**(6), 607–613. ISSN 1477-0962. Dostupné z: doi:10.1177/0961203313484978
- [61] TAKEUCHI, Osamu a Shizuo AKIRA. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* [online]. 2010, **140**(6), 805–820. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- [62] IWASAKI, Akiko. Innate Immune Recognition of HIV-1. *Immunity* [online]. 2012, **37**(3), 389–398. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2012.08.011
- [63] BIENIASZ, Paul D. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nature Immunology* [online]. 2004, **5**(11), 1109–1115. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni1125

- [64] BIENIASZ, Paul D. Restriction factors: a defense against retroviral infection. *Trends in Microbiology* [online]. 2003, **11**(6), 286–291. ISSN 0966-842X. Dostupné z: doi:10.1016/s0966-842x(03)00123-9
- [65] DELL'OSTE, Valentina, Deborah GATTI, Alessandro G. GIORGIO, Marisa GARIGLIO, Santo LANDOLFO a Marco DE ANDREA. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *The New Microbiologica*. 2015, **38**(1), 5–20. ISSN 1121-7138.
- [66] SHAW, Neil, Songying OUYANG a Zhi-Jie LIU. Binding of bacterial secondary messenger molecule c di-GMP is a STING operation. *Protein & Cell* [online]. 2013, **4**(2), 117–129. ISSN 1674-8018. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-012-2071-0
- [67] HORAN, Kristy A., Kathrine HANSEN, Martin R. JAKOBSEN, Christian K. HOLM, Stine SØBY, Leonie UNTERHOLZNER, Mikayla THOMPSON, John A. WEST, Marie B. IVERSEN, Simon B. RASMUSSEN, Svend ELLERMANN-ERIKSEN, Evelyn KURT-JONES, Santo LANDOLFO, Blossom DAMANIA, Jesper MELCHJORSEN, Andrew G. BOWIE, Katherine A. FITZGERALD a Søren R. PALUDAN. Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* [online]. 2013, **190**(5), 2311–2319. ISSN 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1202749
- [68] JOHNSON, Karen E., Leela CHIKOTI a Bala CHANDRAN. Herpes Simplex Virus 1 Infection Induces Activation and Subsequent Inhibition of the IFI16 and NLRP3 Inflammasomes. *Journal of Virology* [online]. 2013, **87**(9), 5005–5018. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00082-13
- [69] GARIANO, Grazia Rosaria, Valentina DELL'OSTE, Matteo BRONZINI, Deborah GATTI, Anna LUGANINI, Marco De ANDREA, Giorgio GRIBAUDO, Marisa GARIGLIO a Santo LANDOLFO. The Intracellular DNA Sensor IFI16 Gene Acts as Restriction Factor for Human Cytomegalovirus Replication. *PLOS Pathogens* [online]. 2012, **8**(1), e1002498. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1002498
- [70] DELL'OSTE, Valentina, Deborah GATTI, Francesca GUGLIESI, Marco DE ANDREA, Mandar BAWADEKAR, Irene LO CIGNO, Matteo BIOLATTI, Marta VALLINO, Manfred MARSCHALL, Marisa GARIGLIO a Santo LANDOLFO. Innate nuclear sensor IFI16 translocates into the cytoplasm during the early stage of in vitro human cytomegalovirus infection and is entrapped in the egressing virions during the late stage. *Journal of Virology* [online]. 2014, **88**(12), 6970–6982. ISSN 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00384-14
- [71] BIOLATTI, Matteo, Valentina DELL'OSTE, Sara PAUTASSO, Francesca GUGLIESI, Jens VON EINEM, Christian KRAPP, Martin Roelsgaard JAKOBSEN, Cinzia BORGOGNA, Marisa GARIGLIO, Marco DE ANDREA a Santo LANDOLFO. Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING. *Journal of Virology* [online]. 2018, **92**(6), e01774-17. ISSN 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01774-17
- [72] ANSARI, Mairaj Ahmed, Vivek Vikram SINGH, Sujoy DUTTA, Mohanan Valiya VEETTIL, Dipanjan DUTTA, Leela CHIKOTI, Jie LU, David EVERLY a Bala CHANDRAN. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *Journal of Virology* [online]. 2013, **87**(15), 8606–8623. ISSN 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00805-13
- [73] MONROE, Kathryn M., Zhiyuan YANG, Jeffrey R. JOHNSON, Xin GENG, Gilad DOITSH, Nevan J. KROGAN a Warner C. GREENE. IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T Cells Abortively Infected with HIV. *Science* [online]. 2014, **343**(6169), 428–432. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1243640
- [74] JAKOBSEN, Martin R., Rasmus O. BAK, Annika ANDERSEN, Randi K. BERG, Søren B. JENSEN, Jin TENGCHUAN, Tengchuan JIN, Anders LAUSTSEN, Kathrine HANSEN, Lars OSTERGAARD, Katherine A. FITZGERALD, T. Sam XIAO, Jacob G. MIKKELSEN, Trine H. MOGENSEN a Søren R. PALUDAN. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, **110**(48), E4571-4580. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1311669110
- [75] BERG, Randi K., Stine H. RAHBK, Emil KOFOD-OLSEN, Christian K. HOLM, Jesper MELCHJORSEN, David G. JENSEN, Anne Louise HANSEN, Louise B. JØRGENSEN, Lars OSTERGAARD, Martin TOLSTRUP, Carsten S. LARSEN, Søren R. PALUDAN, Martin R. JAKOBSEN a Trine H. MOGENSEN. T cells detect intracellular

- DNA but fail to induce type I IFN responses: implications for restriction of HIV replication. *PLoS One* [online]. 2014, **9**(1), e84513. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0084513
- [76] HANNA-ROSE, W. a U. HANSEN. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends in genetics: TIG* [online]. 1996, **12**(6), 229–234. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/0168-9525(96)10022-6
- [77] DATTA, B., B. LI, D. CHOUBEY, G. NALLUR a P. LENGYEL. p202, an interferon-inducible modulator of transcription, inhibits transcriptional activation by the p53 tumor suppressor protein, and a segment from the p53-binding protein 1 that binds to p202 overcomes this inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(44), 27544–27555. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.44.27544
- [78] CHOUBEY, D. a P. LENGYEL. Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(11), 6134–6140. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.11.6134
- [79] CHOUBEY, D., S. J. LI, B. DATTA, J. U. GUTTERMAN a P. LENGYEL. Inhibition of E2F-mediated transcription by p202. *The EMBO journal*. 1996, **15**(20), 5668–5678. ISSN 0261-4189.
- [80] MIN, W., S. GHOSH a P. LENGYEL. The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1996, **16**(1), 359–368. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/mcb.16.1.359
- [81] MAGNAGHI-JAULIN, L., R. GROISMAN, I. NAGUIBNEVA, P. ROBIN, S. LORAIN, J. P. LE VILLAIN, F. TROALEN, D. TROUCHE a A. HAREL-BELLAN. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* [online]. 1998, **391**(6667), 601–605. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35410
- [82] DAVIDSON, F. F. a H. STELLER. Blocking apoptosis prevents blindness in Drosophila retinal degeneration mutants. *Nature* [online]. 1998, **391**(6667), 587–591. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35385
- [83] WEINTRAUB, S. J., K. N. CHOW, R. X. LUO, S. H. ZHANG, S. HE a D. C. DEAN. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* [online]. 1995, **375**(6534), 812–815. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/375812a0
- [84] STRATMANN, Sarah A, Seamus R MORRONE, Antoine M VAN OIJEN a Jungsan SOHN. The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex. *eLife* [online]. nedatováno, **4** [vid. 2021-04-10]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.11721
- [85] LI, Tuo, Benjamin A. DINER, Jin CHEN a Ileana M. CRISTEA. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(26), 10558–10563. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1203447109
- [86] UNTERHOLZNER, Leonie a Andrew G. BOWIE. Innate DNA Sensing Moves to the Nucleus. *Cell Host & Microbe* [online]. 2011, **9**(5), 351–353. ISSN 1931-3128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2011.05.001
- [87] ORZALLI, Megan H., Neal A. DELUCA a David M. KNIPE. Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2012, **109**(44), E3008–E3017. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1211302109
- [88] ORZALLI, Megan H., Sara E. CONWELL, Christian BERRIOS, James A. DECAPRIO a David M. KNIPE. Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, **110**(47), E4492–4501. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1316194110
- [89] JOHNSON, Karen E., Virginie BOTTERO, Stephanie FLAHERTY, Sujoy DUTTA, Vivek Vikram SINGH a Bala CHANDRAN. IFI16 restricts HSV-1 replication by accumulating on the hsv-1 genome, repressing HSV-1 gene expression, and directly or indirectly modulating histone modifications. *PLoS pathogens* [online]. 2014, **10**(11), e1004503. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1004503
- [90] MCGHEE, James D., Joanne M. NICKOL, Gary FELSENFELD a Donald C. RAU. Higher order structure of chromatin: Orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. *Cell* [online]. 1983, **33**(3), 831–841. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(83)90025-9

- [91] SMITH, Siobhán a Caroline JEFFERIES. Role of DNA/RNA sensors and contribution to autoimmunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2014, **25**(6), Special issue: Innate Sensing and Response to Pathogens, 745–757. ISSN 1359-6101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.019
- [92] BLAINEY, Paul C., Antoine M. VAN OIJEN, Anirban BANERJEE, Gregory L. VERDINE a X. Sunney XIE. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(15), 5752–5757. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0509723103
- [93] HU, Tao, A. Yu GROSBERG a B. I. SHKLOVSKII. How Proteins Search for Their Specific Sites on DNA: The Role of DNA Conformation. *Biophysical Journal* [online]. 2006, **90**(8), 2731–2744. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.105.078162
- [94] TURKIN, Alexander, Antoine M. VAN OIJEN a Anatoliy A. TURKIN. Theory of bimolecular reactions in a solution with linear traps: Application to the problem of target search on DNA. *Physical Review E* [online]. 2015, **92**(5), 052703. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevE.92.052703
- [95] TURKIN, Alexander, Lei ZHANG, Alessio MARCOZZI, Walter F. MANGEL, Andreas HERRMANN a Antoine M. van OIJEN. Speeding up biomolecular interactions by molecular sledding. *Chemical Science* [online]. 2016, **7**(2), 916–920. ISSN 2041-6539. Dostupné z: doi:10.1039/C5SC03063C
- [96] JIN, Tengchuan, Andrew PERRY, Jiansheng JIANG, Patrick SMITH, James A. CURRY, Leonie UNTERHOLZNER, Zhaozhao JIANG, Gabor HORVATH, Vijay A. RATHINAM, Ricky W. JOHNSTONE, Veit HORNING, Eicke LATZ, Andrew G. BOWIE, Katherine A. FITZGERALD a T. Sam XIAO. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* [online]. 2012, **36**(4), 561–571. ISSN 1097-4180. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2012.02.014
- [97] 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
- [98] ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* [online]. 2012, **489**(7414), 57–74. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11247
- [99] WILLIAMSON, J. R., M. K. RAGHURAMAN a T. R. CECH. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* [online]. 1989, **59**(5), 871–880. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(89)90610-7
- [100] SEN, Dipankar a Walter GILBERT. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* [online]. 1990, **344**(6265), 410–414. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/344410a0
- [101] HUD, N. V., F. W. SMITH, F. A. ANET a J. FEIGON. The selectivity for K⁺ versus Na⁺ in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: a thermodynamic analysis by 1H NMR. *Biochemistry* [online]. 1996, **35**(48), 15383–15390. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi9620565
- [102] YANG, Peng, Anne DE CIAN, Marie-Paule TEULADE-FICHO, Jean-Louis MERGNY a David MONCHAUD. Engineering bisquinolinium/thiazole orange conjugates for fluorescent sensing of G-quadruplex DNA. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* [online]. 2009, **48**(12), 2188–2191. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200805613
- [103] YANG, Danzhou a Keika OKAMOTO. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **2**(4), 619–646. ISSN 1756-8927. Dostupné z: doi:10.4155/fmc.09.172
- [104] CHEN, Yuwei a Danzhou YANG. Sequence, Stability, and Structure of G-Quadruplexes and Their Interactions with Drugs. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* [online]. 2012, **50**(1), 17.5.1-17.5.17. ISSN 1934-9289. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1705s50
- [105] 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 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd3428
- [106] RHODES, Daniela a Hans J. LIPPS. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, **43**(18), 8627–8637. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv862
- [107] SCHIAVONE, Davide, Guillaume GUILBAUD, Pierre MURAT, Charikleia PAPADOPOULOU, Peter SARKIES, Marie-Noëlle PRIOLEAU, Shankar BALASUBRAMANIAN a Julian E. SALE. Determinants of G quadruplex-

- induced epigenetic instability in REV1-deficient cells. *The EMBO journal* [online]. 2014, **33**(21), 2507–2520. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.15252/emboj.201488398
- [108] KÖNIG, Sebastian L. B., Amanda C. EVANS a Julian L. HUPPERT. Seven essential questions on G-quadruplexes. *Biomolecular Concepts* [online]. 2010, **1**(2), 197–213. ISSN 1868-5021. Dostupné z: doi:10.1515/bmc.2010.011
- [109] 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**, 8. ISSN 1479-7364. Dostupné z: doi:10.1186/1479-7364-8-8
- [110] HARDIN, Charles C., Thomas WATSON, Matthew CORREGAN a Charles BAILEY. Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* [online]. 1992, **31**(3), 833–841. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00118a028
- [111] LI, Wei, Peng WU, Tastuo OHMACHI a Naoki SUGIMOTO. Characterization and thermodynamic properties of quadruplex/duplex competition. *FEBS letters* [online]. 2002, **526**(1–3), 77–81. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/s0014-5793(02)03118-6
- [112] MIYOSHI, Daisuke, Hisae KARIMATA a Naoki SUGIMOTO. Hydration Regulates Thermodynamics of G-Quadruplex Formation under Molecular Crowding Conditions. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(24), 7957–7963. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja061267m
- [113] LIPPS, Hans J. a Daniela RHODES. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in Cell Biology* [online]. 2009, **19**(8), 414–422. ISSN 1879-3088. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2009.05.002
- [114] WALIA, Rupali a George CHACONAS. Suggested role for G4 DNA in recombinational switching at the antigenic variation locus of the Lyme disease spirochete. *PLoS One* [online]. 2013, **8**(2), e57792. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0057792
- [115] CAHOON, Laty A. a H. Steven SEIFERT. An Alternative DNA Structure Is Necessary for Pilin Antigenic Variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Science* [online]. 2009, **325**(5941), 764–767. Dostupné z: doi:10.1126/science.1175653
- [116] BLACKBURN, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature* [online]. 2000, **408**(6808), 53–56. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35040500
- [117] VAN STEENSEL, B., A. SMOGORZEWSKA a T. DE LANGE. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* [online]. 1998, **92**(3), 401–413. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(00)80932-0
- [118] *Telomere Dysfunction Increases Mutation Rate and Genomic Instability - ScienceDirect* [online]. [vid. 2022-07-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867401004573>
- [119] HENDERSON, E., C. C. HARDIN, S. K. WALK, I. TINOCO a E. H. BLACKBURN. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* [online]. 1987, **51**(6), 899–908. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(87)90577-0
- [120] SUNDQUIST, W. I. a A. KLUG. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* [online]. 1989, **342**(6251), 825–829. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/342825a0
- [121] MOYZIS, R. K., J. M. BUCKINGHAM, L. S. CRAM, M. DANI, L. L. DEAVEN, M. D. JONES, J. MEYNE, R. L. RATLIFF a J. R. WU. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1988, **85**(18), 6622–6626. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.18.6622
- [122] GRIFFITH, J. D., L. COMEAU, S. ROSENFELD, R. M. STANSEL, A. BIANCHI, H. MOSS a T. DE LANGE. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* [online]. 1999, **97**(4), 503–514. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(00)80760-6
- [123] STANSEL, Rachel M., Titia DE LANGE a Jack D. GRIFFITH. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO Journal* [online]. 2001, **20**(19), 5532–5540. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/20.19.5532
- [124] AMBRUS, Attila, Ding CHEN, Jixun DAI, Tiffanie BIALIS, Roger A. JONES a Danzhou YANG. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(9), 2723–2735. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl348
- [125] 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
- [126] 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
- [127] XU, Yan, Yuki NOGUCHI a Hiroshi SUGIYAMA. The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)3] in K⁺ solution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2006, **14**(16), 5584–5591. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2006.04.033
- [128] LUU, Kim Ngoc, Anh Tuân PHAN, Vitaly KURYAVYI, Laurent LACROIX a Dinshaw J. PATEL. Structure of the Human Telomere in K⁺ Solution: An Intramolecular (3 + 1) G-Quadruplex Scaffold. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(30), 9963–9970. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja062791w
- [129] PHAN, Anh Tuân, Kim Ngoc LUU a Dinshaw J. PATEL. Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K⁺ solution. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(19), 5715–5719. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl726
- [130] PHAN, Anh Tuân, Vitaly KURYAVYI, Kim Ngoc LUU a Dinshaw J. PATEL. Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution †. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(19), 6517–6525. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm706
- [131] LIM, Kah Wai, Samir AMRANE, Serge BOUAZIZ, Weixin XU, Yuguang MU, Dinshaw PATEL, Kim Ngoc LUU, Anh Tuan PHAN a Anh Tuân PHAN. Structure of the Human Telomere in K⁺ Solution: A Stable Basket-Type G-Quadruplex with Only Two G-Tetrad Layers. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2009, **131**(12), 4301–4309. Dostupné z: doi:10.1021/ja807503g
- [132] ZHANG, Zhenjiang, Jixun DAI, Elizabeth VELIATH, Roger A. JONES a Danzhou YANG. Structure of a two-G-tetrad intramolecular G-quadruplex formed by a variant human telomeric sequence in K⁺ solution: insights into the interconversion of human telomeric G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Research* [online]. 2010, **38**(3), 1009–1021. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp1029
- [133] HÄNSEL, Robert, Frank LÖHR, Lukáš TRANTIREK a Volker DÖTSCH. High-Resolution Insight into G-Overhang Architecture. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2013, **135**(7), 2816–2824. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja312403b
- [134] PARKINSON, Gary N., Michael P. H. LEE a Stephen NEIDLE. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* [online]. 2002, **417**(6891), 876–880. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature755
- [135] WANG, Yong a Dinshaw I PATELL. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *nedatováno*, 20.
- [136] PETRACCONI, Luigi, Charles SPINK, John O. TRENT, Nichola C. GARBETT, Chongkham S. MEKMAYSY, Concetta GIANCOLA a Jonathan B. CHAIRES. Structure and Stability of Higher-Order Human Telomeric Quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2011, **133**(51), 20951–20961. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja209192a
- [137] DAI, Jixun, Megan CARVER a Danzhou YANG. Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* [online]. 2008, **90**(8), 1172–1183. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2008.02.026
- [138] GRAY, Robert D. a Jonathan B. CHAIRES. Kinetics and mechanism of K⁺- and Na⁺-induced folding of models of human telomeric DNA into G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(12), 4191–4203. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkn379
- [139] RAJENDRAN, Arivazhagan, Masayuki ENDO, Kumi HIDAKA a Hiroshi SUGIYAMA. Direct and single-molecule visualization of the solution-state structures of G-hairpin and G-triplex intermediates. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* [online]. 2014, **53**(16), 4107–4112. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201308903
- [140] MASHIMO, Tomoko, Hirotaka YAGI, Yuta SANNOHE, Arivazhagan RAJENDRAN a Hiroshi SUGIYAMA. Folding Pathways of Human Telomeric Type-1 and Type-2 G-Quadruplex Structures. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2010, **132**(42), 14910–14918. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja105806u

- [141] GREIDER, C. W. a E. H. BLACKBURN. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* [online]. 1985, **43**(2 Pt 1), 405–413. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(85)90170-9
- [142] KIM, N. W., M. A. PIATYSZEK, K. R. PROWSE, C. B. HARLEY, M. D. WEST, P. L. HO, G. M. COVIELLO, W. E. WRIGHT, S. L. WEINRICH a J. W. SHAY. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1994, **266**(5193), 2011–2015. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.7605428
- [143] HANAHAHAN, D. a R. A. WEINBERG. The hallmarks of cancer. *Cell* [online]. 2000, **100**(1), 57–70. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- [144] AZZALIN, Claus M., Patrick REICHENBACH, Lela KHORIAULI, Elena GIULOTTO a Joachim LINGNER. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2007, **318**(5851), 798–801. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1147182
- [145] SCHOEFTNER, Stefan a Maria A. BLASCO. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology* [online]. 2008, **10**(2), 228–236. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1685
- [146] COLLIE, Gavin W., Shozeb M. HAIDER, Stephen NEIDLE a Gary N. PARKINSON. A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex. *Nucleic Acids Research* [online]. 2010, **38**(16), 5569–5580. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq259
- [147] MARTADINATA, Herry a Anh Tuân PHAN. Structure of Human Telomeric RNA (TERRA): Stacking of Two G-Quadruplex Blocks in K⁺ Solution. *Biochemistry* [online]. 2013, **52**(13), 2176–2183. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi301606u
- [148] XU, Yan, Kuniyuki KAMINAGA a Makoto KOMIYAMA. G-Quadruplex Formation by Human Telomeric Repeats-Containing RNA in Na⁺ Solution. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2008, **130**(33), 11179–11184. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja8031532
- [149] QIN, Yong a Laurence H. HURLEY. Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions. *Biochimie* [online]. 2008, **90**(8), Targeting DNA Part II, 1149–1171. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2008.02.020
- [150] 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
- [151] WOOD, W. I. a G. FELSENFELD. Chromatin structure of the chicken beta-globin gene region. Sensitivity to DNase I, micrococcal nuclease, and DNase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982, **257**(13), 7730–7736. ISSN 0021-9258.
- [152] LARSEN, A. a H. WEINTRAUB. An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin. *Cell* [online]. 1982, **29**(2), 609–622. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(82)90177-5
- [153] WOODFORD, K. J., R. M. HOWELL a K. USDIN. A novel K(+)-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, **269**(43), 27029–27035. ISSN 0021-9258.
- [154] HAMMOND-KOSACK, M C, B DOBRINSKI, R LURZ, K DOCHERTY a M W KILPATRICK. The human insulin gene linked polymorphic region exhibits an altered DNA structure. *Nucleic Acids Research*. 1992, **20**(2), 231–236. ISSN 0305-1048.
- [155] SIMONSSON, T, P PECINKA a M KUBISTA. DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic Acids Research*. 1998, **26**(5), 1167–1172. ISSN 0305-1048.
- [156] SUN, Daekyu, Kexiao GUO, Jadrian J. RUSCHE a Laurence H. HURLEY. Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(18), 6070–6080. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki917

- [157] GUO, Kexiao, Vijay GOKHALE, Laurence H. HURLEY a Daekyu SUN. Intramolecularly folded G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter of the vascular endothelial growth factor gene. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(14), 4598–4608. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkn380
- [158] DE ARMOND, Richard, Stacey WOOD, Daekyu SUN, Laurence H. HURLEY a Scot W. EBBINGHAUS. Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter. *Biochemistry* [online]. 2005, **44**(49), 16341–16350. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi051618u
- [159] DAI, Jixun, Thomas S. DEXHEIMER, Ding CHEN, Megan CARVER, Attila AMBRUS, Roger A. JONES a Danzhou YANG. An Intramolecular G-Quadruplex Structure with Mixed Parallel/Antiparallel G-Strands Formed in the Human BCL-2 Promoter Region in Solution. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(4), 1096–1098. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja055636a
- [160] DEXHEIMER, Thomas S., Daekyu SUN a Laurence H. HURLEY. Deconvoluting the Structural and Drug-Recognition Complexity of the G-Quadruplex-Forming Region Upstream of the bcl-2 P1 Promoter. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(16), 5404–5415. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja0563861
- [161] ONEL, Buket, Megan CARVER, Guanhui WU, Daria TIMONINA, Salil KALARN, Marti LARRIVA a Danzhou YANG. A new G quadruplex with hairpin loop immediately upstream of the human BCL2 P1 promoter modulates transcription. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2016, **138**(8), 2563–2570. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.5b08596
- [162] YAFE, Anat, Shulamit ETZIONI, Pnina WEISMAN-SHOMER a Michael FRY. Formation and properties of hairpin and tetraplex structures of guanine-rich regulatory sequences of muscle-specific genes. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(9), 2887–2900. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki606
- [163] COGOI, Susanna, Manikandan PARAMASIVAM, Barbara SPOLAORE a Luigi E. XODO. Structural polymorphism within a regulatory element of the human KRAS promoter: formation of G4-DNA recognized by nuclear proteins. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(11), 3765–3780. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkn120
- [164] COGOI, Susanna a Luigi E. XODO. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(9), 2536–2549. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl286
- [165] RANKIN, Sarah, Anthony P. RESZKA, Julian HUPPERT, Mire ZLOH, Gary N. PARKINSON, Alan K. TODD, Sylvain LADAME, Shankar BALASUBRAMANIAN a Stephen NEIDLE. Putative DNA Quadruplex Formation within the Human c-kit Oncogene. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2005, **127**(30), 10584–10589. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja050823u
- [166] *A Conserved Quadruplex Motif Located in a Transcription Activation Site of the Human c-kit Oncogene / Biochemistry* [online]. [vid. 2022-07-30]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi0601510>
- [167] GUO, Kexiao, Alan POURPAK, Kara BEETZ-ROGERS, Vijay GOKHALE, Daekyu SUN a Laurence H. HURLEY. Formation of pseudo-symmetrical G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter region of the RET oncogene. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2007, **129**(33), 10220–10228. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja072185g
- [168] QIN, Yong, Evonne M. REZLER, Vijay GOKHALE, Daekyu SUN a Laurence H. HURLEY. Characterization of the G-quadruplexes in the duplex nuclease hypersensitive element of the PDGF-A promoter and modulation of PDGF-A promoter activity by TMPyP4. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(22), 7698–7713. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm538
- [169] PALUMBO, SunMi L., Regan M. MEMMOTT, Diana J. URIBE, Yulia KROTOVA-KHAN, Laurence H. HURLEY a Scot W. EBBINGHAUS. A novel G-quadruplex-forming GGA repeat region in the c-myc promoter is a critical regulator of promoter activity. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(6), 1755–1769. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm1069
- [170] PALUMBO, SunMi L., Scot W. EBBINGHAUS a Laurence H. HURLEY. Formation of a unique end-to-end stacked pair of G-quadruplexes in the hTERT core promoter with implications for inhibition of telomerase by G-

- quadruplex-interactive ligands. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2009, **131**(31), 10878–10891. ISSN 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/ja902281d
- [171] QIN, Yong, Jessica S. FORTIN, Denise TYE, Mary GLEASON-GUZMAN, Tracy A. BROOKS a Laurence H. HURLEY. Molecular cloning of the human PDGFR- β promoter and drug targeting of the G-quadruplex-forming region to repress PDGFR- β expression. *Biochemistry* [online]. 2010, **49**(19), 4208–4219. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi100330w
- [172] BROWN, Robert V., Ting WANG, Venkateshwar Reddy CHAPPETA, Guanhui WU, Buket ONEL, Reena CHAWLA, Hector QUIJADA, Sara M. CAMP, Eddie T. CHIANG, Quinea R. LASSITER, Carmen LEE, Shivani PHANSE, Megan A. TURNIDGE, Ping ZHAO, Joe G. N. GARCIA, Vijay GOKHALE, Danzhou YANG a Laurence H. HURLEY. The Consequences of Overlapping G-Quadruplexes and i-Motifs in the Platelet-Derived Growth Factor Receptor β Core Promoter Nuclease Hypersensitive Element Can Explain the Unexpected Effects of Mutations and Provide Opportunities for Selective Targeting of Both Structures by Small Molecules To Downregulate Gene Expression. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2017, **139**(22), 7456–7475. ISSN 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.6b10028
- [173] RUSTIGHI, Alessandra, Michela A. TESSARI, Fulvia VASCOTTO, Riccardo SGARRA, Vincenzo GIANCOTTI a Guidalberto MANFIOLETTI. A polypyrimidine/polypurine tract within the Hmga2 minimal promoter: a common feature of many growth-related genes. *Biochemistry* [online]. 2002, **41**(4), 1229–1240. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi011666o
- [174] YANG, Danzhou. G-Quadruplex DNA and RNA. *G-Quadruplex Nucleic Acids* [online]. 2019, **2035**, 1–24. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9666-7_1
- [175] EDDY, Johanna a Nancy MAIZELS. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(14), 3887–3896. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl529
- [176] HUPPERT, Julian L. a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(2), 406–413. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl1057
- [177] KOUZINE, Fedor, Suzanne SANFORD, Zichrini ELISHA-FEIL a David LEVENS. The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2008, **15**(2), 146–154. ISSN 1545-9985. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.1372
- [178] KOUZINE, Fedor a David LEVENS. Supercoil-driven DNA structures regulate genetic transactions. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* [online]. 2007, **12**, 4409–4423. ISSN 1093-9946. Dostupné z: doi:10.2741/2398
- [179] SUN, Daekyu a Laurence H. HURLEY. The importance of negative superhelicity in inducing the formation of G-quadruplex and i-motif structures in the c-Myc promoter: implications for drug targeting and control of gene expression. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2009, **52**(9), 2863–2874. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm900055s
- [180] ZHENG, Ke-Wei, Yi-de HE, Hong-He LIU, Xin-Min LI, Yu-Hua HAO a Zheng TAN. Superhelicity Constrains a Localized and R-Loop-Dependent Formation of G-Quadruplexes at the Upstream Region of Transcription. *ACS chemical biology* [online]. 2017, **12**(10), 2609–2618. ISSN 1554-8937. Dostupné z: doi:10.1021/acscchembio.7b00435
- [181] SEENISAMY, Jeyaprakashnarayanan, Evonne M. REZLER, Tiffanie J. POWELL, Denise TYE, Vijay GOKHALE, Chandana Sharma JOSHI, Adam SIDDIQUI-JAIN a Laurence H. HURLEY. The dynamic character of the G-quadruplex element in the c-MYC promoter and modification by TMPyP4. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2004, **126**(28), 8702–8709. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja040022b
- [182] PHAN, Anh Tuân, Yasha S. MODI a Dinshaw J. PATEL. Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human c-myc promoter. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2004, **126**(28), 8710–8716. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja048805k
- [183] 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

- [184] MATHAD, Raveendra I., Emmanuel HATZAKIS, Jixun DAI a Danzhou YANG. c-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5'-end of NHE III1 element: insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Research* [online]. 2011, **39**(20), 9023–9033. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkr612
- [185] GUÉDIN, Aurore, Julien GROS, Patrizia ALBERTI a Jean-Louis MERGNY. How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Research* [online]. 2010, **38**(21), 7858–7868. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq639
- [186] AGRAWAL, Prashansa, Clement LIN, Raveendra I. MATHAD, Megan CARVER a Danzhou YANG. The major G-quadruplex formed in the human BCL-2 proximal promoter adopts a parallel structure with a 13-nt loop in K⁺ solution. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2014, **136**(5), 1750–1753. ISSN 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/ja4118945
- [187] MICHELOTTI, G. A., E. F. MICHELOTTI, A. PULLNER, R. C. DUNCAN, D. EICK a D. LEVENS. Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1996, **16**(6), 2656–2669. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.16.6.2656
- [188] MICHELOTTI, E. F., T. TOMONAGA, H. KRUTZSCH a D. LEVENS. Cellular nucleic acid binding protein regulates the CT element of the human c-myc protooncogene. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(16), 9494–9499. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.16.9494
- [189] SAKATSUME, Osamu, Hatsumi TSUTSUI, Yifei WANG, Hui GAO, Xiaoren TANG, Taeko YAMAUCHI, Takehide MURATA, Keiichi ITAKURA a Kazunari K. YOKOYAMA. Binding of THZif-1, a MAZ-like Zinc Finger Protein to the Nuclease-hypersensitive Element in the Promoter Region of the c-MYC Protooncogene*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(49), 31322–31333. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.49.31322
- [190] TOMONAGA, T a D LEVENS. Activating transcription from single stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, **93**(12), 5830–5835. ISSN 0027-8424.
- [191] BERBERICH, S. J. a E. H. POSTEL. PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element. *Oncogene*. 1995, **10**(12), 2343–2347. ISSN 1476-5594.
- [192] PHAN, Anh Tuấn, Vitaly KURYAVYI, Sarah BURGE, Stephen NEIDLE a Dinshaw J. PATEL. Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human c-kit promoter. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2007, **129**(14), 4386–4392. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja068739h
- [193] CHEN, Yuwei, Prashansa AGRAWAL, Robert V. BROWN, Emmanuel HATZAKIS, Laurence HURLEY a Danzhou YANG. The major G-quadruplex formed in the human platelet-derived growth factor receptor β promoter adopts a novel broken-strand structure in K⁺ solution. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2012, **134**(32), 13220–13223. ISSN 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/ja305764d
- [194] ONEL, Buket, Megan CARVER, Prashansa AGRAWAL, Laurence H. HURLEY a Danzhou YANG. The 3'-end region of the human PDGFR- β core promoter nuclease hypersensitive element forms a mixture of two unique end-insertion G-quadruplexes. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* [online]. 2018, **1862**(4), 846–854. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2017.12.011
- [195] DAI, Jixun, Ding CHEN, Roger A. JONES, Laurence H. HURLEY a Danzhou YANG. NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(18), 5133–5144. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl610
- [196] KAISER, Christine E., Natalie A. VAN ERT, Prashansa AGRAWAL, Reena CHAWLA, Danzhou YANG a Laurence H. HURLEY. Insight into the Complexity of the i-Motif and G-Quadruplex DNA Structures Formed in the KRAS Promoter and Subsequent Drug-Induced Gene Repression. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2017, **139**(25), 8522–8536. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.7b02046
- [197] PARAMASIVAM, Manikandan, Susanna COGOI a Luigi E. XODO. Primer extension reactions as a tool to uncover folding motifs within complex G-rich sequences: analysis of the human KRASNHE. *Chemical Communications* [online]. 2011, **47**(17), 4965–4967. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C1CC10269A
- [198] COGOI, Susanna, Manikandan PARAMASIVAM, Vyacheslav FILICHEV, Imrich GÉCI, Erik B. PEDERSEN a Luigi E. XODO. Identification of a new G-quadruplex motif in the KRAS promoter and design of pyrene-modified

- G4-decoys with antiproliferative activity in pancreatic cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2009, **52**(2), 564–568. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm800874t
- [199] HSU, Shang-Te Danny, Peter VARNAI, Anthony BUGAUT, Anthony P. RESZKA, Stephen NEIDLE a Shankar BALASUBRAMANIAN. A G-Rich Sequence within the c-kit Oncogene Promoter Forms a Parallel G-Quadruplex Having Asymmetric G-Tetrad Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2009, **131**(37), 13399–13409. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja904007p
- [200] KURYAVYI, Vitaly, Anh Tuân PHAN a Dinshaw J. PATEL. Solution structures of all parallel-stranded monomeric and dimeric G-quadruplex scaffolds of the human c-kit2 promoter. *Nucleic Acids Research* [online]. 2010, **38**(19), 6757–6773. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq558
- [201] KANG, Hyun-Jin, Yunxi CUI, Holly YIN, Amy SCHEID, William P. D. HENDRICKS, Jessica SCHMIDT, Aleksandar SEKULIC, Deming KONG, Jeffrey M. TRENT, Vijay GOKHALE, Hanbin MAO a Laurence H. HURLEY. A Pharmacological Chaperone Molecule Induces Cancer Cell Death by Restoring Tertiary DNA Structures in Mutant hTERT Promoters. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2016, **138**(41), 13673–13692. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.6b07598
- [202] CHAIRES, Jonathan B., John O. TRENT, Robert D. GRAY, William L. DEAN, Robert BUSCAGLIA, Shelia D. THOMAS a Donald M. MILLER. An Improved Model for the hTERT Promoter Quadruplex. *PLOS ONE* [online]. 2014, **9**(12), e115580. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0115580
- [203] LIM, Kah Wai, Laurent LACROIX, Doris Jia En YUE, Jofina Kim Cheow LIM, Jocelyn Mei Wen LIM a Anh Tuân PHAN. Coexistence of Two Distinct G-Quadruplex Conformations in the hTERT Promoter. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2010, **132**(35), 12331–12342. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja101252n
- [204] 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
- [205] DUQUETTE, Michelle L., Priya HANDA, Jack A. VINCENT, Andrew F. TAYLOR a Nancy MAIZELS. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes & Development* [online]. 2004, **18**(13), 1618–1629. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1200804
- [206] LARSON, Erik D., Michelle L. DUQUETTE, W. Jason CUMMINGS, Raphael J. STREIFF a Nancy MAIZELS. MutSalphalpa binds to and promotes synapsis of transcriptionally activated immunoglobulin switch regions. *Current biology: CB* [online]. 2005, **15**(5), 470–474. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2004.12.077
- [207] DRYGIN, Denis, Adam SIDDIQUI-JAIN, Sean O'BRIEN, Michael SCHWAEBE, Amy LIN, Josh BLIESATH, Caroline B. HO, Chris PROFFITT, Katy TRENT, Jeffrey P. WHITTEN, John K. C. LIM, Daniel VON HOFF, Kenna ANDERES a William G. RICE. Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Research* [online]. 2009, **69**(19), 7653–7661. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1304
- [208] WANROOIJ, Paulina H., Jay P. UHLER, Tomas SIMONSSON, Maria FALKENBERGOVÁ a Claes M. GUSTAFSSON. G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(37), 16072–16077. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1006026107
- [209] WANROOIJ, Paulina H., Jay P. UHLER, Yonghong SHI, Fredrik WESTERLUND, Maria FALKENBERG a Claes M. GUSTAFSSON. A hybrid G-quadruplex structure formed between RNA and DNA explains the extraordinary stability of the mitochondrial R-loop. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012, **40**(20), 10334–10344. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks802
- [210] BHARTI, Sanjay Kumar, Joshua A. SOMMERS, Jun ZHOU, Daniel L. KAPLAN, Johannes N. SPELBRINK, Jean-Louis MERGNY a Robert M. BROSH. DNA sequences proximal to human mitochondrial DNA deletion breakpoints prevalent in human disease form G-quadruplexes, a class of DNA structures inefficiently unwound by the mitochondrial replicative Twinkle helicase. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, **289**(43), 29975–29993. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.567073
- [211] HUANG, Wei-Chun, Ting-Yuan TSENG, Ying-Ting CHEN, Cheng-Chung CHANG, Zi-Fu WANG, Chiung-Lin WANG, Tsu-Ning HSU, Pei-Tzu LI, Chin-Tin CHEN, Jing-Jer LIN, Pei-Jen LOU a Ta-Chau CHANG. Direct

- evidence of mitochondrial G-quadruplex DNA by using fluorescent anti-cancer agents. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, **43**(21), 10102–10113. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv1061
- [212] BESNARD, Emilie, Amélie BABLED, Laure LAPASSET, Ollivier MILHAVET, Hugues PARRINELLO, Christelle DANTEC, Jean-Michel MARIN a Jean-Marc LEMAITRE. Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2012, **19**(8), 837–844. ISSN 1545-9985. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.2339
- [213] HOWELL, R. a K. USDIN. The ability to form intrastrand tetraplexes is an evolutionarily conserved feature of the 3' end of L1 retrotransposons. *Molecular Biology and Evolution* [online]. 1997, **14**(2), 144–155. ISSN 0737-4038. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025747
- [214] LEXA, Matej, Pavlina STEFLOVA, Tomas MARTINEK, Michaela VORLICKOVA, Boris VYSKOT a Eduard KEJNOVSKY. Guanine quadruplexes are formed by specific regions of human transposable elements. *BMC Genomics* [online]. 2014, **15**(1), 1032. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-15-1032
- [215] SAHAKYAN, Aleksandr B., Pierre MURAT, Clemens MAYER a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplex structures within the 3' UTR of LINE-1 elements stimulate retrotransposition. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2017, **24**(3), 243–247. ISSN 1545-9985. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.3367
- [216] MARCEL, Virginie, Phong L. T. TRAN, Charlotte SAGNE, Ghyslaine MARTEL-PLANCHE, Laurence VASLIN, Marie-Paule TEULADE-FICHO, Janet HALL, Jean-Louis MERGNY, Pierre HAINAUT a Eric VAN DYCK. G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis* [online]. 2011, **32**(3), 271–278. ISSN 1460-2180. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/bgq253
- [217] WELDON, Carika, Justine G. DACANAY, Vijay GOKHALE, Peda Venkat L. BODDUPALLY, Isabelle BEHM-ANSMANT, Glenn A. BURLEY, Christiane BRANLANT, Laurence H. HURLEY, Cyril DOMINGUEZ a Ian C. EPERON. Specific G-quadruplex ligands modulate the alternative splicing of Bcl-X. *Nucleic Acids Research* [online]. 2018, **46**(2), 886–896. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkx1122
- [218] ZHANG, Jia-yu, Ke-wei ZHENG, Shan XIAO, Yu-hua HAO a Zheng TAN. Mechanism and Manipulation of DNA:RNA Hybrid G-Quadruplex Formation in Transcription of G-Rich DNA. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2014, **136**(4), 1381–1390. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja4085572
- [219] FRY, M. a L. A. LOEB. The fragile X syndrome d(CGG)n nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1994, **91**(11), 4950–4954. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.11.4950
- [220] BROWN, V., P. JIN, S. CEMAN, J. C. DARNELL, W. T. O'DONNELL, S. A. TENENBAUM, X. JIN, Y. FENG, K. D. WILKINSON, J. D. KEENE, R. B. DARNELL a S. T. WARREN. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* [online]. 2001, **107**(4), 477–487. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(01)00568-2
- [221] RIBEYRE, Cyril, Judith LOPES, Jean-Baptiste BOULÉ, Aurèle PIAZZA, Aurore GUÉDIN, Virginia A. ZAKIAN, Jean-Louis MERGNY a Alain NICOLAS. The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences In Vivo. *PLOS Genetics* [online]. 2009, **5**(5), e1000475. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1000475
- [222] PAESCHKE, Katrin, Matthew L. BOCHMAN, P. Daniela GARCIA, Petr CEJKA, Katherine L. FRIEDMAN, Stephen C. KOWALCZYKOWSKI a Virginia A. ZAKIAN. Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature* [online]. 2013, **497**(7450), 458–462. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature12149
- [223] ZHAO, Junhua, Albino BACOLLA, Guliang WANG a Karen M. VASQUEZ. Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2010, **67**(1), 43–62. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-009-0131-2
- [224] *C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease* | *Nature* [online]. [vid. 2022-08-03]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nature13124>
- [225] HARRIS, Lynne M. a Catherine J. MERRICK. G-Quadruplexes in Pathogens: A Common Route to Virulence Control? *PLOS Pathogens* [online]. 2015, **11**(2), e1004562. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1004562

- [226] NORSEEN, Julie, F. Brad JOHNSON a Paul M. LIEBERMAN. Role for G-Quadruplex RNA Binding by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in DNA Replication and Metaphase Chromosome Attachment. *Journal of Virology* [online]. 2009, **83**(20), 10336–10346. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00747-09
- [227] BEAUME, Nicolas, Rajiv PATHAK, Vinod Kumar YADAV, Swathi KOTA, Hari S. MISRA, Hemant K. GAUTAM a Shantanu CHOWDHURY. Genome-wide study predicts promoter-G4 DNA motifs regulate selective functions in bacteria: radioresistance of *D. radiodurans* involves G4 DNA-mediated regulation. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(1), 76–89. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1071
- [228] MADIREDDY, Advaita, Pravinkumar PURUSHOTHAMAN, Christopher P. LOOSBROOCK, Erle S. ROBERTSON, Carl L. SCHILDKRAUT a Subhash C. VERMA. G-quadruplex-interacting compounds alter latent DNA replication and episomal persistence of KSHV. *Nucleic Acids Research* [online]. 2016, **44**(8), 3675–3694. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw038
- [229] SUNDQUIST, W I a S HEAPHY. Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993, **90**(8), 3393–3397. ISSN 0027-8424.
- [230] PERRONE, Rosalba, Matteo NADAI, Iaria FRASSON, Jerrod A. POE, Elena BUTOVSKAYA, Thomas E. SMITHGALL, Manlio PALUMBO, Giorgio PALÙ a Sara N. RICHTER. A Dynamic G-Quadruplex Region Regulates the HIV-1 Long Terminal Repeat Promoter. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2013, **56**(16), 6521–6530. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm400914r
- [231] PERRONE, Rosalba, Matteo NADAI, Jerrod A. POE, Iaria FRASSON, Manlio PALUMBO, Giorgio PALÙ, Thomas E. SMITHGALL a Sara N. RICHTER. Formation of a Unique Cluster of G-Quadruplex Structures in the HIV-1 nef Coding Region: Implications for Antiviral Activity. *PLOS ONE* [online]. 2013, **8**(8), e73121. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0073121
- [232] PIEKNA-PRZYBYLSKA, Dorota, Mark A. SULLIVAN, Gaurav SHARMA a Robert A. BAMBARA. U3 Region in the HIV-1 Genome Adopts a G-Quadruplex Structure in Its RNA and DNA Sequence. *Biochemistry* [online]. 2014, **53**(16), 2581–2593. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi4016692
- [233] TLUČKOVÁ, Katarína, Maja MARUŠIČ, Petra TÓTHOVÁ, Lubos BAUER, Primož ŠKET, Janez PLAVEC a Viktor VÍGLASKÝ. Human Papillomavirus G-Quadruplexes. *Biochemistry* [online]. 2013, **52**(41), 7207–7216. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi400897g
- [234] KUSOV, Yuri, Jinzhi TAN, Enrique ALVAREZ, Luis ENJUANES a Rolf HILGENFELD. A G-quadruplex-binding macrodomain within the “SARS-unique domain” is essential for the activity of the SARS-coronavirus replication–transcription complex. *Virology* [online]. 2015, **484**, 313–322. ISSN 0042-6822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2015.06.016
- [235] FLEMING, Aaron M., Yun DING, Anton ALENKO a Cynthia J. BURROWS. Zika Virus Genomic RNA Possesses Conserved G-Quadruplexes Characteristic of the Flaviviridae Family. *ACS Infectious Diseases* [online]. 2016, **2**(10), 674–681. Dostupné z: doi:10.1021/acsinfecdis.6b00109
- [236] KRAFČÍKOVÁ, Petra, Erika DEMKOVIČOVÁ a Viktor VÍGLASKÝ. Ebola virus derived G-quadruplexes: Thiazole orange interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2017, **1861**(5, Part B), G-quadruplex, 1321–1328. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2016.12.009
- [237] RAWAL, Pooja, Veera Bhadra Rao KUMMARASETTI, Jinoy RAVINDRAN, Nirmal KUMAR, Kangkan HALDER, Rakesh SHARMA, Mitali MUKERJI, Swapan Kumar DAS a Shantanu CHOWDHURY. Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in *Escherichia coli* global regulation. *Genome Research* [online]. 2006, **16**(5), 644–655. ISSN 1088-9051, 1549-5469. Dostupné z: doi:10.1101/gr.4508806
- [238] WÖRMANN, Mirka E., Corey L. HORIEN, Julia S. BENNETT, Keith A. JOLLEY, Martin C. J. MAIDEN, Christoph M. TANG, Ellen L. AHO a Rachel M. EXLEY. Sequence, distribution and chromosomal context of class I and class II pilin genes of *Neisseria meningitidis* identified in whole genome sequences. *BMC Genomics* [online]. 2014, **15**(1), 253. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-15-253
- [239] THAKUR, Roshan Singh, Ambika DESINGU, Shivakumar BASAVARAJU, Shreelakshmi SUBRAMANYA, Desirazu N. RAO a Ganesh NAGARAJU. Mycobacterium tuberculosis DinG is a structure-specific helicase that unwinds G4 DNA: implications for targeting G4 DNA as a novel therapeutic approach. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, **289**(36), 25112–25136. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.563569

- [240] SMARGIASSO, Nicolas, Valérie GABELICA, Christian DAMBLON, Frédéric ROSU, Edwin DE PAUW, Marie-Paule TEULADE-FICHO, J. Alexandra ROWE a Antoine CLAESSENS. Putative DNA G-quadruplex formation within the promoters of *Plasmodium falciparum* var genes. *BMC Genomics* [online]. 2009, **10**(1), 362. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-10-362
- [241] STANTON, Adam, Lynne M. HARRIS, Gemma GRAHAM a Catherine J. MERRICK. Recombination events among virulence genes in malaria parasites are associated with G-quadruplex-forming DNA motifs. *BMC Genomics* [online]. 2016, **17**(1), 859. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-016-3183-3
- [242] YADAV, Vikas, HEMANSI, Nayun KIM, Narendra TUTEJA a Puja YADAV. G Quadruplex in Plants: A Ubiquitous Regulatory Element and Its Biological Relevance. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2017, **8** [vid. 2022-08-03]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01163
- [243] SAUER, Markus a Katrin PAESCHKE. G-quadruplex unwinding helicases and their function in vivo. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2017, **45**(5), 1173–1182. ISSN 1470-8752. Dostupné z: doi:10.1042/BST20170097
- [244] PAESCHKE, Katrin, John A. CAPRA a Virginia A. ZAKIAN. DNA Replication through G-Quadruplex Motifs Is Promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA Helicase. *Cell* [online]. 2011, **145**(5), 678–691. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.04.015
- [245] DE MAGIS, Alessio, Stefano G. MANZO, Marco RUSSO, Jessica MARINELLO, Rita MORIGI, Olivier SORDET a Giovanni CAPRANICO. DNA damage and genome instability by G-quadruplex ligands are mediated by R loops in human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2019, **116**(3), 816–825. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1810409116
- [246] LOPES, Judith, Aurèle PIAZZA, Rodrigo BERMEJO, Barry KRIEGSMAN, Arianna COLOSIO, Marie-Paule TEULADE-FICHO, Marco FOIANI a Alain NICOLAS. G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. *The EMBO journal* [online]. 2011, **30**(19), 4033–4046. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2011.316
- [247] PUIG LOMBARDI, Emilia, Allyson HOLMES, Daniela VERGA, Marie-Paule TEULADE-FICHO, Alain NICOLAS a Arturo LONDOÑO-VALLEJO. Thermodynamically stable and genetically unstable G-quadruplexes are depleted in genomes across species. *Nucleic Acids Research* [online]. 2019, **47**(12), 6098–6113. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz463
- [248] ZHANG, Amy Y. Q. a Shankar BALASUBRAMANIAN. The Kinetics and Folding Pathways of Intramolecular G-Quadruplex Nucleic Acids. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2012, **134**(46), 19297–19308. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja309851t
- [249] FANG, G. a T. R. CECH. The beta subunit of Oxytricha telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* [online]. 1993, **74**(5), 875–885. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(93)90467-5
- [250] YADAV, Prem Singh a Abubakar Muhammad WAKIL. *Telomerase Structure and Function, Activity and Its Regulation with Emerging Methods of Measurement in Eukaryotes* [online]. B.m.: IntechOpen, 2019 [vid. 2022-09-18]. ISBN 978-1-78984-575-4. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.89506
- [251] LI, Qian-Jin, Xia-Jing TONG, Yi-Min DUAN a Jin-Qiu ZHOU. Characterization of the intramolecular G-quadruplex promoting activity of Est1. *FEBS letters* [online]. 2013, **587**(6), 659–665. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2013.01.024
- [252] BIFFI, Giulia, David TANNAHILL a Shankar BALASUBRAMANIAN. An Intramolecular G-Quadruplex Structure Is Required for Binding of Telomeric Repeat-Containing RNA to the Telomeric Protein TRF2. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2012, **134**(29), 11974–11976. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja305734x
- [253] PAESCHKE, Katrin, Stefan JURANEK, Daniela RHODES a Hans Joachim LIPPS. Cell cycle-dependent regulation of telomere tethering in the nucleus. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* [online]. 2008, **16**(5), 721–728. ISSN 0967-3849. Dostupné z: doi:10.1007/s10577-008-1222-x
- [254] VALLUR, Aarthy C. a Nancy MAIZELS. Activities of human exonuclease 1 that promote cleavage of transcribed immunoglobulin switch regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(43), 16508–16512. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0805327105

- [255] LIU, Z. a W. GILBERT. The yeast KEM1 gene encodes a nuclease specific for G4 tetraplex DNA: implication of in vivo functions for this novel DNA structure. *Cell* [online]. 1994, **77**(7), 1083–1092. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(94)90447-2
- [256] SAFA, Loyal, Emmanuelle DELAGOUTTE, Irina PETRUSEVA, Patrizia ALBERTI, Olga LAVRIK, Jean-François RIOU a Carole SAINTOMÉ. Binding polarity of RPA to telomeric sequences and influence of G-quadruplex stability. *Biochimie* [online]. 2014, **103**, 80–88. ISSN 1638-6183. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2014.04.006
- [257] KOSIOL, Nils, Stefan JURANEK, Peter BROSSART, Annkristin HEINE a Katrin PAESCHKE. G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy. *Molecular Cancer* [online]. 2021, **20**(1), 40. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-021-01328-4
- [258] RUGGIERO, Emanuela a Sara N RICHTER. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Research* [online]. 2018, **46**(7), 3270–3283. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky187
- [259] CARVALHO, Josué, Jean-Louis MERGNY, Gilmar F SALGADO, João A QUEIROZ a Carla CRUZ. G-quadruplex, Friend or Foe: The Role of the G-quartet in Anticancer Strategies. *Trends in molecular medicine* [online]. 2020, **26**(9), 848–861. ISSN 1471-499X. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2020.05.002
- [260] CIMINO-REALE, Graziella, Nadia ZAFFARONI a Marco FOLINI. Emerging Role of G-quadruplex DNA as Target in Anticancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2016, **22**(44), 6612–6624. ISSN 1873-4286. Dostupné z: doi:10.2174/1381612822666160831101031
- [261] HAIDER, Shozeb M., Stephen NEIDLE a Gary N. PARKINSON. A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions. *Biochimie* [online]. 2011, **93**(8), 1239–1251. ISSN 1638-6183. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2011.05.012
- [262] LI, Qian, Jun-Feng XIANG, Qian-Fan YANG, Hong-Xia SUN, Ai-Jiao GUAN a Ya-Lin TANG. G4LDB: a database for discovering and studying G-quadruplex ligands. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(Database issue), D1115–1123. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1101
- [263] *Frontiers | Common G-Quadruplex Binding Agents Found to Interact With i-Motif-Forming DNA: Unexpected Multi-Target-Directed Compounds* [online]. [vid. 2022-09-11]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2018.00281/full>
- [264] ABDELHAMID, Mahmoud A. S., Andrew J. GATES a Zoë A. E. WALLER. Destabilization of i-Motif DNA at Neutral pH by G-Quadruplex Ligands. *Biochemistry* [online]. 2019, **58**(4), 245–249. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biochem.8b00968
- [265] FELSENSTEIN, Kenneth M., Lindsey B. SAUNDERS, John K. SIMMONS, Elena LEON, David R. CALABRESE, Shuling ZHANG, Aleksandra MICHALOWSKI, Peter GAREISS, Beverly A. MOCK a John S. SCHNEEKLOTH. Small Molecule Microarrays Enable the Identification of a Selective, Quadruplex-Binding Inhibitor of MYC Expression. *ACS chemical biology* [online]. 2016, **11**(1), 139–148. ISSN 1554-8937. Dostupné z: doi:10.1021/acschembio.5b00577
- [266] ASAMITSU, Sefan, Toshikazu BANDO a Hiroshi SUGIYAMA. Ligand Design to Acquire Specificity to Intended G-Quadruplex Structures. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* [online]. 2019, **25**(2), 417–430. ISSN 1521-3765. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201802691
- [267] ZAHLER, A. M., J. R. WILLIAMSON, T. R. CECH a D. M. PRESCOTT. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* [online]. 1991, **350**(6320), 718–720. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/350718a0
- [268] MOYE, Aaron L., Karina C. PORTER, Scott B. COHEN, Tram PHAN, Katherine G. ZYNER, Natsuki SASAKI, George O. LOVRECZ, Jennifer L. BECK a Tracy M. BRYAN. Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. *Nature Communications* [online]. 2015, **6**(1), 7643. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms8643
- [269] PAESCHKE, Katrin, Tomas SIMONSSON, Jan POSTBERG, Daniela RHODES a Hans Joachim LIPPS. Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2005, **12**(10), 847–854. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb982
- [270] PAUDEL, Bishnu P, Aaron Lavel MOYE, Hala ABOU ASSI, Roberto EL-KHOURY, Scott B COHEN, Jessica K HOLIEN, Monica L BIRRENTO, Siritron SAMOSORN, Kamthorn INTHARAPICHA, Christopher G TOMLINSON, Marie-Paule TEULADE-FICHO, Carlos GONZÁLEZ, Jennifer L BECK, Masad J DAMHA,

- Antoine M VAN OIJEN a Tracy M BRYAN. A mechanism for the extension and unfolding of parallel telomeric G-quadruplexes by human telomerase at single-molecule resolution. *eLife* [online]. 2020, **9**, e56428. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.56428
- [271] TAN, Jun a Li LAN. The DNA secondary structures at telomeres and genome instability. *Cell & Bioscience* [online]. 2020, **10**(1), 47. ISSN 2045-3701. Dostupné z: doi:10.1186/s13578-020-00409-z
- [272] NEIDLE, Stephen. Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *The FEBS journal* [online]. 2010, **277**(5), 1118–1125. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07463.x
- [273] T, Tauchi, Shin-Ya K, Sashida G, Sumi M, Nakajima A, Shimamoto T, Ohyashiki JH a Ohyashiki K. Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(34) [vid. 2022-08-03]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1206833
- [274] SALVATI, Erica, Carlo LEONETTI, Angela RIZZO, Marco SCARSELLA, Marcella MOTTOLESE, Rossella GALATI, Isabella SPERDUTI, Malcolm F. G. STEVENS, Maurizio D'INCALCI, Maria BLASCO, Giovanna CHIORINO, Serge BAUWENS, Béatrice HORARD, Eric GILSON, Antonella STOPPACCIARO, Gabriella ZUPI a Annamaria BIROCCIO. Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2007, **117**(11), 3236–3247. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI32461
- [275] 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), E1340. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11111340
- [276] ZHU, Li-Na, Shu-Juan ZHAO, Bin WU, Xiao-Zeng LI a De-Ming KONG. A New Cationic Porphyrin Derivative (TMPipEOPP) with Large Side Arm Substituents: A Highly Selective G-Quadruplex Optical Probe. *PLOS ONE* [online]. 2012, **7**(5), e35586. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0035586
- [277] BENIAMINOV, Artemy D., Roman A. NOVIKOV, Olga K. MAMAEVA, Vladimir A. MITKEVICH, Igor P. SMIRNOV, Mikhail A. LIVSHITS, Anna K. SHCHYOLKINA a Dmitry N. KALUZHNY. Light-induced oxidation of the telomeric G4 DNA in complex with Zn(II) tetracarboxymethyl porphyrin. *Nucleic Acids Research* [online]. 2016, **44**(21), 10031–10041. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw947
- [278] ZYNER, Katherine G, Darcie S MULHEARN, Santosh ADHIKARI, Sergio MARTÍNEZ CUESTA, Marco DI ANTONIO, Nicolas ERARD, Gregory J HANNON, David TANNAHILL a Shankar BALASUBRAMANIAN. Genetic interactions of G-quadruplexes in humans. *eLife* [online]. 2019, **8**, e46793. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.46793
- [279] 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. Dostupné z: doi:10.1016/j.chempr.2018.02.014
- [280] DE, Subhajyoti a Franziska MICHOR. DNA secondary structures and epigenetic determinants of cancer genome evolution. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2011, **18**(8), 950–955. ISSN 1545-9985. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.2089
- [281] YANG, Danzhou a Laurence H. HURLEY. Structure of the biologically relevant G-quadruplex in the c-MYC promoter. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* [online]. 2006, **25**(8), 951–968. ISSN 1525-7770. Dostupné z: doi:10.1080/15257770600809913
- [282] DANG, Chi V. MYC on the Path to Cancer. *Cell* [online]. 2012, **149**(1), 22–35. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.03.003
- [283] LIN, Charles Y., Jakob LOVÉN, Peter B. RAHL, Ronald M. PARANAL, Christopher B. BURGE, James E. BRADNER, Tong Ihn LEE a Richard A. YOUNG. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* [online]. 2012, **151**(1), 56–67. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.08.026
- [284] BRETONES, Gabriel, M. Dolores DELGADO a Javier LEÓN. Myc and cell cycle control. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2015, **1849**(5), 506–516. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbgrm.2014.03.013

- [285] NASIRI, Hamid R., Neil M. BELL, Keith I. E. MCLUCKIE, Jarmila HUSBY, Chris ABELL, Stephen NEIDLE a Shankar BALASUBRAMANIAN. Targeting a c-MYC G-quadruplex DNA with a fragment library. *Chemical Communications* [online]. 2014, **50**(14), 1704–1707. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C3CC48390H
- [286] CALABRESE, David R., Xiang CHEN, Elena C. LEON, Snehal M. GAIKWAD, Zaw PHYO, William M. HEWITT, Stephanie ALDEN, Thomas A. HILIMIRE, Fahu HE, Aleksandra M. MICHALOWSKI, John K. SIMMONS, Lindsey B. SAUNDERS, Shuling ZHANG, Daniel CONNORS, Kylie J. WALTERS, Beverly A. MOCK a John S. SCHNEEKLOTH. Chemical and structural studies provide a mechanistic basis for recognition of the MYC G-quadruplex. *Nature Communications* [online]. 2018, **9**(1), 4229. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-06315-w
- [287] BODDUPALLY, Peda V. L., Seongmin HAHN, Cristina BEMAN, Biswanath DE, Tracy A. BROOKS, Vijay GOKHALE a Laurence H. HURLEY. Anticancer activity and cellular repression of c-MYC by the G-quadruplex-stabilizing 11-piperazinylquinoline is not dependent on direct targeting of the G-quadruplex in the c-MYC promoter. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **55**(13), 6076–6086. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm300282c
- [288] BOCHMAN, Matthew L., Katrin PAESCHKE a Virginia A. ZAKIAN. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2012, **13**(11), 770–780. ISSN 1471-0064. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3296
- [289] VARSHNEY, Dhaval, Jochen SPIEGEL, Katherine ZYNER, David TANNAHILL a Shankar BALASUBRAMANIAN. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2020, **21**(8), 459–474. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-020-0236-x
- [290] BRYAN, Tracy M. Mechanisms of DNA Replication and Repair: Insights from the Study of G-Quadruplexes. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2019, **24**(19), E3439. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24193439
- [291] LERNER, Leticia Koch a Julian E. SALE. Replication of G Quadruplex DNA. *Genes* [online]. 2019, **10**(2), 95. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes10020095
- [292] VALTON, Anne-Laure a Marie-Noëlle PRIOLEAU. G-Quadruplexes in DNA Replication: A Problem or a Necessity? *Trends in Genetics* [online]. 2016, **32**(11), 697–706. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/j.tig.2016.09.004
- [293] WU, Yuliang, Kazuo SHIN-YA a Robert M. BROSH. FANCI helicase defective in Fanconi anemia and breast cancer unwinds G-quadruplex DNA to defend genomic stability. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2008, **28**(12), 4116–4128. ISSN 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.02210-07
- [294] LONDON, Timothy B. C., Louise J. BARBER, Georgina MOSEDALE, Gavin P. KELLY, Shankar BALASUBRAMANIAN, Ian D. HICKSON, Simon J. BOULTON a Kevin HIOM. FANCI Is a Structure-specific DNA Helicase Associated with the Maintenance of Genomic G/C Tracts *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(52), 36132–36139. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M808152200
- [295] WU, Wenwen, Nana ROKUTANDA, Jun TAKEUCHI, Yongqiang LAI, Reo MARUYAMA, Yukiko TOGASHI, Hiroyuki NISHIKAWA, Naoko ARAI, Yasuo MIYOSHI, Nao SUZUKI, Yasushi SAEKI, Keiji TANAKA a Tomohiko OHTA. HERC2 Facilitates BLM and WRN Helicase Complex Interaction with RPA to Suppress G-Quadruplex DNA. *Cancer Research* [online]. 2018, **78**(22), 6371–6385. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1877
- [296] WANG, Yuxiang, Jie YANG, Aaron T. WILD, Wei H. WU, Rachna SHAH, Carla DANUSSI, Gregory J. RIGGINS, Kasthuri KANNAN, Erik P. SULMAN, Timothy A. CHAN a Jason T. HUSE. G-quadruplex DNA drives genomic instability and represents a targetable molecular abnormality in ATRX-deficient malignant glioma. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1), 943. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-08905-8
- [297] RODRIGUEZ, Raphaël, Sebastian MÜLLER, Justin A. YEOMAN, Chantal TRENTESAUX, Jean-François RIOU a Shankar BALASUBRAMANIAN. A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2008, **130**(47), 15758–15759. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja805615w

- [298] RIZZO, Angela, Erica SALVATI, Manuela PORRU, Carmen D'ANGELO, Malcolm F. STEVENS, Maurizio D'INCALCI, Carlo LEONETTI, Eric GILSON, Gabriella ZUPI a Annamaria BIROCCIO. Stabilization of quadruplex DNA perturbs telomere replication leading to the activation of an ATR-dependent ATM signaling pathway. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(16), 5353–5364. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp582
- [299] BEAUVARLET, Jennifer, Paul BENSADOUN, Elodie DARBO, Gaelle LABRUNIE, Benoît ROUSSEAU, Elodie RICHARD, Irena DRASKOVIC, Arturo LONDONO-VALLEJO, Jean-William DUPUY, Rabindra NATH DAS, Aurore GUÉDIN, Guillaume ROBERT, Francois ORANGE, Sabrina CROCE, Valerie VALESCO, Pierre SOUBEYRAN, Kevin M. RYAN, Jean-Louis MERGNY a Mojgan DJAVAHERI-MERGNY. Modulation of the ATM/autophagy pathway by a G-quadruplex ligand tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells. *Nucleic Acids Research* [online]. 2019, **47**(6), 2739–2756. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz095
- [300] ZIMMER, Jutta, Eliana M. C. TACCONI, Cecilia FOLIO, Sophie BADIE, Manuela PORRU, Kerstin KLARE, Manuela TUMIATI, Enni MARKKANEN, Swagata HALDER, Anderson RYAN, Stephen P. JACKSON, Kristijan RAMADAN, Sergey G. KUZNETSOV, Annamaria BIROCCIO, Julian E. SALE a Madalena TARSOUNAS. Targeting BRCA1 and BRCA2 Deficiencies with G-Quadruplex-Interacting Compounds. *Molecular Cell* [online]. 2016, **61**(3), 449–460. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2015.12.004
- [301] RODRIGUEZ, Raphaël, Kyle M. MILLER, Josep V. FORMENT, Charles R. BRADSHAW, Mehran NIKAN, Sébastien BRITTON, Tobias OELSCHLAEGEL, Blerta XHEMALCE, Shankar BALASUBRAMANIAN a Stephen P. JACKSON. Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nature Chemical Biology* [online]. 2012, **8**(3), 301–310. ISSN 1552-4469. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.780
- [302] XU, Hong, Marco DI ANTONIO, Steven MCKINNEY, Veena MATHEW, Brandon HO, Nigel J. O'NEIL, Nancy Dos SANTOS, Jennifer SILVESTER, Vivien WEI, Jessica GARCIA, Farhia KABEER, Daniel LAI, Priscilla SORIANO, Judit BANÁTH, Derek S. CHIU, Damian YAP, Daniel D. LE, Frank B. YE, Anni ZHANG, Kelsie THU, John SOONG, Shu-chuan LIN, Angela Hsin Chin TSAI, Tomo OSAKO, Teresa ALGARA, Darren N. SAUNDERS, Jason WONG, Jian XIAN, Marcel B. BALLY, James D. BRENTON, Grant W. BROWN, Sohrab P. SHAH, David CESCO, Tak W. MAK, Carlos CALDAS, Peter C. STIRLING, Phil HIETER, Shankar BALASUBRAMANIAN a Samuel APARICIO. CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**(1), 14432. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms14432
- [303] BYWATER, Megan J., Gretchen POORTINGA, Elaine SANIJ, Nadine HEIN, Abigail PECK, Carleen CULLINANE, Meaghan WALL, Leonie CLUSE, Denis DRYGIN, Kenna ANDERES, Nanni HUSER, Chris PROFFITT, Joshua BLIESATH, Mustapha HADDACH, Michael K. SCHWAEBE, David M. RYCKMAN, William G. RICE, Clemens SCHMITT, Scott W. LOWE, Ricky W. JOHNSTONE, Richard B. PEARSON, Grant A. MCARTHUR a Ross D. HANNAN. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell* [online]. 2012, **22**(1), 51–65. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2012.05.019
- [304] BRUNO, Peter M., Mengrou LU, Kady A. DENNIS, Haider INAM, Connor J. MOORE, John SHEEHE, Stephen J. ELLEDGE, Michael T. HEMANN a Justin R. PRITCHARD. The primary mechanism of cytotoxicity of the chemotherapeutic agent CX-5461 is topoisomerase II poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2020, **117**(8), 4053–4060. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1921649117
- [305] MCLUCKIE, Keith I. E., Marco DI ANTONIO, Heather ZECCHINI, Jian XIAN, Carlos CALDAS, Ben-Fillippo KRIPPENDORFF, David TANNAHILL, Christopher LOWE a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplex DNA as a molecular target for induced synthetic lethality in cancer cells. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2013, **135**(26), 9640–9643. ISSN 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/ja404868t
- [306] CLYNES, David, Clare JELINSKA, Barbara XELLA, Helena AYYUB, Caroline SCOTT, Matthew MITSON, Stephen TAYLOR, Douglas R. HIGGS a Richard J. GIBBONS. Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX. *Nature Communications* [online]. 2015, **6**(1), 7538. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms8538

- [307] HEAPHY, Christopher M., Roeland F. DE WILDE, Yuchen JIAO, Alison P. KLEIN, Barish H. EDIL, Chanjuan SHI, Chetan BETTEGOWDA, Fausto J. RODRIGUEZ, Charles G. EBERHART, Sachidanand HEBBAR, G. Johan OFFERHAUS, Roger MCLENDON, B. Ahmed RASHEED, Yiping HE, Hai YAN, Darell D. BIGNER, Sueli Mieko OBA-SHINJO, Sueli Kazue Nagahashi MARIE, Gregory J. RIGGINS, Kenneth W. KINZLER, Bert VOGELSTEIN, Ralph H. HRUBAN, Anirban MAITRA, Nickolas PAPADOPOULOS a Alan K. MEEKER. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2011, **333**(6041), 425. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1207313
- [308] LOVEJOY, Courtney A., Wendi LI, Steven REISENWEBER, Supawat THONGTHIP, Joanne BRUNO, Titia DE LANGE, Saurav DE, John H. J. PETRINI, Patricia A. SUNG, Maria JASIN, Joseph ROSENBLUH, Yaara ZWANG, Barbara A. WEIR, Charlie HATTON, Elena IVANOVA, Laura MACCONAILL, Megan HANNA, William C. HAHN, Neal F. LUE, Roger R. REDDEL, Yuchen JIAO, Kenneth KINZLER, Bert VOGELSTEIN, Nickolas PAPADOPOULOS, Alan K. MEEKER, a ALT STARR CANCER CONSORTIUM. Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS genetics* [online]. 2012, **8**(7), e1002772. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1002772
- [309] CHAMBERS, Vicki S., Giovanni MARSICO, Jonathan M. BOUTELL, Marco DI ANTONIO, Geoffrey P. SMITH a Shankar BALASUBRAMANIAN. High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nature Biotechnology* [online]. 2015, **33**(8), 877–881. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.3295
- [310] SCHAFFITZEL, Christiane, Imre BERGER, Jan POSTBERG, Jozef HANES, Hans J. LIPPS a Andreas PLÜCKTHUN. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(15), 8572–8577. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.141229498
- [311] KOUZINE, Fedor, Damian WOJTOWICZ, Laura BARANELLO, Arito YAMANE, Steevenson NELSON, Wolfgang RESCH, Kyong-Rim KIEFFER-KWON, Craig J. BENHAM, Rafael CASELLAS, Teresa M. PRZYTYCKA a David LEVENS. Permanganate/S1 Nuclease Footprinting Reveals Non-B DNA Structures with Regulatory Potential across a Mammalian Genome. *Cell Systems* [online]. 2017, **4**(3), 344-356.e7. ISSN 2405-4712. Dostupné z: doi:10.1016/j.cels.2017.01.013
- [312] MERGNY, Jean-Louis a Laurent LACROIX. UV Melting of G-Quadruplexes. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* [online]. 2009, **37**(1), 17.1.1-17.1.15. ISSN 1934-9289. Dostupné z: doi:10.1002/0471142700.nc1701s37
- [313] CHEN, Lih-Yow, Sophie REDON a Joachim LINGNER. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature* [online]. 2012, **488**(7412), 540–544. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11269
- [314] HAEUSLER, Aaron R., Christopher J. DONNELLY, Goran PERIZ, Eric A. J. SIMKO, Patrick G. SHAW, Min-Sik KIM, Nicholas J. MARAGAKIS, Juan C. TRONCOSO, Akhilesh PANDEY, Rita SATTLER, Jeffrey D. ROTHSTEIN a Jiou WANG. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* [online]. 2014, **507**(7491), 195–200. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature13124
- [315] CARLE, Christine M., Hani S. ZAHER a Douglas L. CHALKER. A Parallel G Quadruplex-Binding Protein Regulates the Boundaries of DNA Elimination Events of Tetrahymena thermophila. *PLOS Genetics* [online]. 2016, **12**(3), e1005842. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1005842
- [316] GONZÁLEZ, Verónica, Kexiao GUO, Laurence HURLEY a Daekyu SUN. Identification and Characterization of Nucleolin as a c-myc G-quadruplex-binding Protein *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2009, **284**(35), 23622–23635. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M109.018028
- [317] LAGO, Sara, Elena TOSONI, Matteo NADAI, Manlio PALUMBO a Sara N. RICHTER. The cellular protein nucleolin preferentially binds long-looped G-quadruplex nucleic acids. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* [online]. 2017, **1861**(5 Pt B), 1371–1381. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.036
- [318] *Quadruplex Nucleic Acids* [online]. 2006 [vid. 2022-08-03]. ISBN 978-0-85404-374-3. Dostupné z: doi:10.1039/9781847555298
- [319] BIFFI, Giulia, David TANNAHILL, John MCCAFFERTY a Shankar BALASUBRAMANIAN. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nature Chemistry* [online]. 2013, **5**(3), 182–186. ISSN 1755-4349. Dostupné z: doi:10.1038/nchem.1548

- [320] VORLÍČKOVÁ, Michaela, Jana CHLÁDKOVÁ, Iva KEJNOVSKÁ, Markéta FIALOVÁ a Jaroslav KYPR. Guanine tetraplex topology of human telomere DNA is governed by the number of (TTAGGG) repeats. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(18), 5851–5860. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki898
- [321] CAO, Yanwei, Wenjing LI a Renjun PEI. Manipulating the Assembly of DNA Nanostructures and Their Enzymatic Properties by Incorporating a 5'-5' Polarity of Inversion Site in the G-Tract. *ACS Macro Letters* [online]. 2021 [vid. 2022-09-18]. Dostupné z: doi:10.1021/acsmacrolett.1c00490
- [322] HELLMAN, Lance M. a Michael G. FRIED. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols* [online]. 2007, **2**(8), 1849–1861. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.249
- [323] 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), 18–33. ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top067470
- [324] ONEL, Buket, Guanhui WU, Daekyu SUN, Clement LIN a Danzhou YANG. Electrophoretic Mobility Shift Assay and Dimethyl Sulfate Footprinting for Characterization of G-Quadruplexes and G-Quadruplex-Protein Complexes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2019, **2035**, 201–222. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9666-7_11
- [325] RYE, H. S., B. L. DREES, H. C. NELSON a A. N. GLAZER. Stable fluorescent dye-DNA complexes in high sensitivity detection of protein-DNA interactions. Application to heat shock transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, **268**(33), 25229–25238. ISSN 0021-9258.
- [326] FORWOOD, Jade K. a David A. JANS. Quantitative analysis of DNA-protein interactions using double-labeled native gel electrophoresis and fluorescence-based imaging. *Electrophoresis* [online]. 2006, **27**(16), 3166–3170. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200500872
- [327] LI, Yue, Zhaozhao JIANG, Haixu CHEN a Wei-Jun MA. A modified quantitative EMSA and its application in the study of RNA–protein interactions. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2004, **60**(2), 85–96. ISSN 0165-022X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbbm.2004.03.008
- [328] FRIED, M. G. Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis* [online]. 1989, **10**(5–6), 366–376. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.1150100515
- [329] TIJERINA, Pilar, Sabine MOHR a Rick RUSSELL. DMS footprinting of structured RNAs and RNA–protein complexes. *Nature Protocols* [online]. 2007, **2**(10), 2608–2623. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.380
- [330] MAXAM, A. M. a W. GILBERT. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1977, **74**(2), 560–564. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.74.2.560
- [331] HUPPERT, Julian Leon. Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chemical Society Reviews* [online]. 2008, **37**(7), 1375–1384. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b702491f
- [332] KIM, M. G. a R. D. CAMERINI-OTERO. An alteration in the structure of the minor groove of duplex DNA induced by the formation of an intermolecular d(GA)_n:d(GA)_n.d(TC)_n triplex. *Molecules and Cells*. 1997, **7**(5), 641–647. ISSN 1016-8478.
- [333] SUN, Daekyu a Laurence H. HURLEY. Biochemical Techniques for the Characterization of G-Quadruplex Structures: EMSA, DMS Footprinting, and DNA Polymerase Stop Assay. In: Peter BAUMANN, ed. *G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010 [vid. 2022-09-13], Methods in Molecular Biology, s. 65–79. ISBN 978-1-59745-363-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-59745-363-9_5
- [334] BUTCHER, Samuel E. a John M. BURKE. Structure-mapping of the Hairpin Ribozyme: Magnesium-dependent Folding and Evidence for Tertiary Interactions within the Ribozyme-Substrate Complex. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1994, **244**(1), 52–63. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1994.1703
- [335] ZHENG, Ke-wei, Zhao CHEN, Yu-hua HAO a Zheng TAN. Molecular crowding creates an essential environment for the formation of stable G-quadruplexes in long double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2010, **38**(1), 327–338. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp898

- [336] LI, Xin-min, Ke-wei ZHENG, Jia-yu ZHANG, Hong-he LIU, Yi-de HE, Bi-feng YUAN, Yu-hua HAO a Zheng TAN. Guanine-vacancy-bearing G-quadruplexes responsive to guanine derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2015, **112**(47), 14581–14586. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1516925112
- [337] UMEYAMA, Taichi a Takashi ITO. DMS-Seq for In Vivo Genome-wide Mapping of Protein-DNA Interactions and Nucleosome Centers. *Cell Reports* [online]. 2017, **21**(1), 289–300. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2017.09.035
- [338] 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. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* [online]. 2019, (150), e59071. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/59071
- [339] PAN, Yongping, Chung-Jung TSAI, Buyong MA a Ruth NUSSINOV. Mechanisms of transcription factor selectivity. *Trends in genetics: TIG* [online]. 2010, **26**(2), 75–83. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/j.tig.2009.12.003
- [340] SPITZ, François a Eileen E. M. FURLONG. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2012, **13**(9), 613–626. ISSN 1471-0064. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3207
- [341] IGGO, Richard, Justine RUDEWICZ, Elodie MONCEAU, Nicolas SEVENET, Jonas BERGH, Tobias SJOBLOM a Hervé BONNEFOI. Validation of a yeast functional assay for p53 mutations using clonal sequencing. *The Journal of Pathology* [online]. 2013, **231**(4), 441–448. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:10.1002/path.4243
- [342] KAEBERLEIN, Matt, Christopher R BURTNER a Brian K KENNEDY. Recent Developments in Yeast Aging. *PLoS Genetics* [online]. 2007, **3**(5), e84. ISSN 1553-7390. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.0030084
- [343] SCHÄRER, E a R IGGO. Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast. *Nucleic Acids Research*. 1992, **20**(7), 1539–1545. ISSN 0305-1048.
- [344] BELLÍ, G, E GARÍ, L PIEDRAFITA, M ALDEA a E HERRERO. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research*. 1998, **26**(4), 942–947. ISSN 0305-1048.
- [345] MUMBERG, D., R. MÜLLER a M. FUNK. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Research* [online]. 1994, **22**(25), 5767–5768. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/22.25.5767
- [346] WEINHANDL, Katrin, Margit WINKLER, Anton GLIEDER a Andrea CAMATTARI. Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, **13**(1), 5. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-13-5
- [347] INGA, Alberto, Francesca STORICI, Thomas A. DARDEN a Michael A. RESNICK. Differential Transactivation by the p53 Transcription Factor Is Highly Dependent on p53 Level and Promoter Target Sequence. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2002, **22**(24), 8612–8625. ISSN 0270-7306, 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.22.24.8612-8625.2002
- [348] TOMSO, Daniel J., Alberto INGA, Daniel MENENDEZ, Gary S. PITTMAN, Michelle R. CAMPBELL, Francesca STORICI, Douglas A. BELL a Michael A. RESNICK. Functionally distinct polymorphic sequences in the human genome that are targets for p53 transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2005, **102**(18), 6431–6436. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0501721102
- [349] STORICI, F., L. K. LEWIS a M. A. RESNICK. In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology* [online]. 2001, **19**(8), 773–776. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/90837
- [350] STORICI, Francesca a Michael A. RESNICK. The delitto perfetto approach to in vivo site-directed mutagenesis and chromosome rearrangements with synthetic oligonucleotides in yeast. *Methods in Enzymology* [online]. 2006, **409**, 329–345. ISSN 0076-6879. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(05)09019-1
- [351] SHARMA, Vasundhara, Paola MONTI, Gilberto FRONZA a Alberto INGA. Human transcription factors in yeast: the fruitful examples of P53 and NF-κB. *FEMS Yeast Research* [online]. 2016, **16**(7) [vid. 2020-04-02]. ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/fow083
- [352] HEKMAT-SCAFE, Daria S., Sara E. BROWNELL, Patricia Chandler SEAWELL, Shyamala MALLADI, Jamie F. Conklin IMAM, Veena SINGLA, Nicole BRADON, Martha S. CYERT a Tim STEARNS. Using yeast to determine the functional consequences of mutations in the human p53 tumor suppressor gene: An introductory course-based undergraduate research experience in molecular and cell biology. *Biochemistry and Molecular Biology Education: A*

- Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2017, **45**(2), 161–178. ISSN 1539-3429. Dostupné z: doi:10.1002/bmb.21024
- [353] ANDREOTTI, Virginia, Yari CIRIBILLI, Paola MONTI, Alessandra BISIO, Mattia LION, Jennifer JORDAN, Gilberto FRONZA, Paola MENICHINI, Michael A. RESNICK a Alberto INGA. p53 transactivation and the impact of mutations, cofactors and small molecules using a simplified yeast-based screening system. *PLoS One* [online]. 2011, **6**(6), e20643. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0020643
- [354] LEROY, Bernard, Jean Louis FOURNIER, Chikashi ISHIOKA, Paola MONTI, Alberto INGA, Gilberto FRONZA a Thierry SOUSSI. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(Database issue), D962-969. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1033
- [355] MONTI, Paola, Yari CIRIBILLI, Jennifer JORDAN, Paola MENICHINI, David M. UMBACH, Michael A. RESNICK, Lucio LUZZATTO, Alberto INGA a Gilberto FRONZA. Transcriptional Functionality of Germ Line p53 Mutants Influences Cancer Phenotype. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* [online]. 2007, **13**(13), 3789–3795. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2545
- [356] MONTI, Paola, Chiara PERFUMO, Alessandra BISIO, Yari CIRIBILLI, Paola MENICHINI, Debora RUSSO, David M. UMBACH, Michael A. RESNICK, Alberto INGA a Gilberto FRONZA. Dominant-negative features of mutant TP53 in germline carriers have limited impact on cancer outcomes. *Molecular cancer research: MCR* [online]. 2011, **9**(3), 271–279. ISSN 1557-3125. Dostupné z: doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0496
- [357] NIGRO, J. M., R. SIKORSKI, S. I. REED a B. VOGELSTEIN. Human p53 and CDC2Hs genes combine to inhibit the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1992, **12**(3), 1357–1365. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/mcb.12.3.1357-1365.1992
- [358] LEÃO, Mariana, Sara GOMES, José PEDRAZA-CHAVERRI, Neuza MACHADO, Emília SOUSA, Madalena PINTO, Alberto INGA, Clara PEREIRA a Lucília SARAIVA. A-mangostin and gambogic acid as potential inhibitors of the p53-MDM2 interaction revealed by a yeast approach. *Journal of Natural Products* [online]. 2013, **76**(4), 774–778. ISSN 1520-6025. Dostupné z: doi:10.1021/np400049j
- [359] HADJ AMOR, Ines Yacoubi, Kamel SMAOUI, Ines CHAABÈNE, Imed MABROUK, Lamia DJEMAL, Henda ELLEUCH, Michèle ALLOUCHE, Raja MOKDAD-GARGOURI a Ali GARGOURI. Human p53 induces cell death and downregulates thioredoxin expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* [online]. 2008, **8**(8), 1254–1262. ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00445.x
- [360] BODE, Ann M. a Zigang DONG. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2004, **4**(10), 793–805. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1455
- [361] LEVINE, Arnold J. a Moshe OREN. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews. Cancer* [online]. 2009, **9**(10), 749–758. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2723
- [362] VOUSDEN, Karen H. a Carol PRIVES. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* [online]. 2009, **137**(3), 413–431. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.04.037
- [363] LION, Mattia, Alessandra BISIO, Toma TEBALDI, Veronica DE SANCTIS, Daniel MENENDEZ, Michael A. RESNICK, Yari CIRIBILLI a Alberto INGA. Interaction between p53 and estradiol pathways in transcriptional responses to chemotherapeutics. *Cell Cycle* [online]. 2013, **12**(8), 1211–1224. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:10.4161/cc.24309
- [364] RAIMONDI, Ivan, Yari CIRIBILLI, Paola MONTI, Alessandra BISIO, Loredano POLLEGIONI, Gilberto FRONZA, Alberto INGA a Paola CAMPOMENOSI. P53 family members modulate the expression of PRODH, but not PRODH2, via intronic p53 response elements. *PLoS One* [online]. 2013, **8**(7), e69152. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0069152
- [365] ESPINOSA, J. M. Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene* [online]. 2008, **27**(29), 4013–4023. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2008.37
- [366] CAPUOZZO, Maurizio, Mariachiara SANTORSOLA, Marco BOCCHETTI, Francesco PERRI, Marco CASCELLA, Vincenza GRANATA, Venere CELOTTO, Oreste GUALILLO, Alessia Maria COSSU, Guglielmo NASTI, Michele CARAGLIA a Alessandro OTTAIANO. p53: From Fundamental Biology to Clinical Applications in Cancer. *Biology* [online]. 2022, **11**(9), 1325. ISSN 2079-7737. Dostupné z: doi:10.3390/biology11091325

- [367] HARRIS, C. C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1996, **88**(20), 1442–1455. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/88.20.1442
- [368] TANAKA, Toshimichi, Masahiko WATANABE a Keishi YAMASHITA. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget* [online]. 2018, **9**(22), 16234–16247. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.24611
- [369] BRADY, Colleen A., Dadi JIANG, Stephano S. MELLO, Thomas M. JOHNSON, Lesley A. JARVIS, Margaret M. KOZAK, Daniela KENZELMANN BROZ, Shashwati BASAK, Eunice J. PARK, Margaret E. MCLAUGHLIN, Anthony N. KARNEZIS a Laura D. ATTARDI. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell* [online]. 2011, **145**(4), 571–583. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.03.035
- [370] OLINER, Jonathan D., Jennifer A. PIETENPOL, Sam THIAGALINGAM, Jenő GYURIS, Kenneth W. KINZLER a Bert VOGELSTEIN. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* [online]. 1993, **362**(6423), 857–860. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/362857a0
- [371] KUBBUTAT, Michael H. G., Stephen N. JONES a Karen H. VOUSDEN. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* [online]. 1997, **387**(6630), 299–303. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/387299a0
- [372] TOLEDO, Franck, Crystal J. LEE, Kurt A. KRUMMEL, Luo-Wei RODEWALD, Chung-Wen LIU a Geoffrey M. WAHL. Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2007, **27**(4), 1425–1432. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.00999-06
- [373] ZHU, Jianhui, Jieyuan JIANG, Wenjing ZHOU, Kuichun ZHU a Xinben CHEN. Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene* [online]. 1999, **18**(12), 2149–2155. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1202533
- [374] BARAN, Katherine, Mao YANG, Christopher P. DILLON, Leona L. SAMSON a Douglas R. GREEN. The proline rich domain of p53 is dispensable for MGMT-dependent DNA repair and cell survival following alkylation damage. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2017, **24**(11), 1925–1936. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2017.116
- [375] BERGER, M., R. VOGT SIONOV, A. J. LEVINE a Y. HAUPT. A role for the polyproline domain of p53 in its regulation by Mdm2. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(6), 3785–3790. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M008879200
- [376] HALAZONETIS, T. D. a A. N. KANDIL. Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *The EMBO journal* [online]. 1993, **12**(13), 5057–5064. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb06199.x
- [377] CHEN, Yongheng, Raja DEY a Lin CHEN. Crystal structure of the p53 core domain bound to a full consensus site as a self-assembled tetramer. *Structure (London, England : 1993)* [online]. 2010, **18**(2), 246–256. ISSN 0969-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2009.11.011
- [378] JEFFREY, Philip D., Svetlana GORINA a Nikola P. PAVLETICH. Crystal Structure of the Tetramerization Domain of the p53 Tumor Suppressor at 1.7 Ångströms. *Science* [online]. 1995, **267**(5203), 1498–1502. Dostupné z: doi:10.1126/science.7878469
- [379] WAGNER, Peter, Annette FUCHS, Claudia GÖTZ, Wolfgang NASTAINCZYK a Mathias MONTENARH. Fine mapping and regulation of the association of p53 with p34cdc2. *Oncogene* [online]. 1998, **16**(1), 105–111. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1201510
- [380] GABIZON, Ronen, Tobias BRANDT, Shahar SUKENIK, Noa LAHAV, Mario LEBENDIKER, Deborah E. SHALEV, Dmitry VEPRINTSEV a Assaf FRIEDLER. Specific recognition of p53 tetramers by peptides derived from p53 interacting proteins. *PloS One* [online]. 2012, **7**(5), e38060. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0038060
- [381] WEINBERG, Richard L., Dmitry B. VEPRINTSEV a Alan R. FERSHT. Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2004, **341**(5), 1145–1159. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2004.06.071

- [382] MAKI, C. G. Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, **274**(23), 16531–16535. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.23.16531
- [383] LEE, S., B. ELENBAAS, A. LEVINE a J. GRIFFITH. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* [online]. 1995, **81**(7), 1013–1020. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(05)80006-6
- [384] *cbt.7.9.pdf* [online]. [vid. 2022-10-07]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cbt.7.9.6473>
- [385] LAPTENKO, Oleg, Idit SHIFF, Will FREED-PASTOR, Andrew ZUPNICK, Melissa MATTIA, Ella FREULICH, Inbal SHAMIR, Noam KADOURI, Tamar KAHAN, James MANFREDI, Itamar SIMON a Carol PRIVES. The p53 C terminus controls site-specific DNA binding and promotes structural changes within the central DNA binding domain. *Molecular Cell* [online]. 2015, **57**(6), 1034–1046. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2015.02.015
- [386] SHIRANGI, Troy R., Alex ZAIKA a Ute M. MOLL. Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. 2002, **16**(3), 420–422. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01-0617fje
- [387] LEVINE, Arnold J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* [online]. 1997, **88**(3), 323–331. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81871-1
- [388] BUNZ, F., A. DUTRIAUX, C. LENGAUER, T. WALDMAN, S. ZHOU, J. P. BROWN, J. M. SEDIVY, K. W. KINZLER a B. VOGELSTEIN. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1998, **282**(5393), 1497–1501. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.282.5393.1497
- [389] HARPER, J. W., G. R. ADAMI, N. WEI, K. KEYOMARSI a S. J. ELLEDGE. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* [online]. 1993, **75**(4), 805–816. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(93)90499-g
- [390] FISCHER, Martin, Lydia STEINER a Kurt ENGELAND. The transcription factor p53: not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* [online]. 2014, **13**(19), 3037–3058. ISSN 1551-4005. Dostupné z: doi:10.4161/15384101.2014.949083
- [391] ZHAN, Qimin, Michael J. ANTINORE, Xin Wei WANG, France CARRIER, Martin L. SMITH, Curtis C. HARRIS a Albert J. FORNACE. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* [online]. 1999, **18**(18), 2892–2900. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1202667
- [392] TAMURA, R. E., J. F. DE VASCONCELLOS, D. SARKAR, T. A. LIBERMANN, P. B. FISHER a L. F. ZERBINI. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current Molecular Medicine* [online]. 2012, **12**(5), 634–651. ISSN 1875-5666. Dostupné z: doi:10.2174/156652412800619978
- [393] PENNINGTON, K. L., T. Y. CHAN, M. P. TORRES a J. L. ANDERSEN. The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein–protein interactions. *Oncogene* [online]. 2018, **37**(42), 5587–5604. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-018-0348-3
- [394] PARK, M., H. D. CHAE, J. YUN, M. JUNG, Y. S. KIM, S. H. KIM, M. H. HAN a D. Y. SHIN. Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest. *Cancer Research*. 2000, **60**(3), 542–545. ISSN 0008-5472.
- [395] PENG, C. Y., P. R. GRAVES, R. S. THOMA, Z. WU, A. S. SHAW a H. PIWNICA-WORMS. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1997, **277**(5331), 1501–1505. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.277.5331.1501
- [396] CHIU, Hung-Chuan, Wei-Ru HUANG, Tsai-Ling LIAO, Pei-I. CHI, Brent L. NIELSEN, Jyung-Hurng LIU a Hung-Jen LIU. Mechanistic insights into avian reovirus p17-modulated suppression of cell cycle CDK–cyclin complexes and enhancement of p53 and cyclin H interaction. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2018, **293**(32), 12542–12562. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA118.002341
- [397] STEWART, N., G. G. HICKS, F. PARASKEVAS a M. MOWAT. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*. 1995, **10**(1), 109–115. ISSN 0950-9232.

- [398] TAYLOR, William R., Samuel E. DEPRIMO, Archana AGARWAL, Munna L. AGARWAL, Axel H. SCHÖNTHAL, Karen S. KATULA a George R. STARK. Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53. *Molecular Biology of the Cell*. 1999, **10**(11), 3607–3622. ISSN 1059-1524.
- [399] INNOCENTE, S. A., J. L. ABRAHAMSON, J. P. COGSWELL a J. M. LEE. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1999, **96**(5), 2147–2152. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.5.2147
- [400] KRAUSE, Karen, Mark WASNER, Wibke REINHARD, Ulrike HAUGWITZ, Christine LANGE-ZU DOHNA, Joachim MÖSSNER a Kurt ENGELAND. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B. *Nucleic Acids Research*. 2000, **28**(22), 4410–4418. ISSN 0305-1048.
- [401] GORGOULIS, Vassilis, Peter D. ADAMS, Andrea ALIMONTI, Dorothy C. BENNETT, Oliver BISCHOF, Cleo BISHOP, Judith CAMPISI, Manuel COLLADO, Konstantinos EVANGELOU, Gerardo FERBEYRE, Jesús GIL, Eiji HARA, Valery KRIZHANOVSKY, Diana JURK, Andrea B. MAIER, Masashi NARITA, Laura NIEDERNHOFER, João F. PASSOS, Paul D. ROBBINS, Clemens A. SCHMITT, John SEDIVY, Konstantinos VOUGAS, Thomas VON ZGLINICKI, Daohong ZHOU, Manuel SERRANO a Marco DEMARIA. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* [online]. 2019, **179**(4), 813–827. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2019.10.005
- [402] SANCAR, Aziz, Laura A. LINDSEY-BOLTZ, Keziban UNSAL-KAÇMAZ a Stuart LINN. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2004, **73**, 39–85. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
- [403] ECKARDT-SCHUPP, F. a C. KLAUS. Radiation inducible DNA repair processes in eukaryotes. *Biochimie* [online]. 1999, **81**(1–2), 161–171. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/s0300-9084(99)80049-2
- [404] GILLET, Ludovic C. J. a Orlando D. SCHÄRER. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical Reviews* [online]. 2006, **106**(2), 253–276. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr040483f
- [405] MIN, Eun-Young, In-Hye KIM, Jungim LEE, Eun-Young KIM, Youn-Hee CHOI a Taek-Jeong NAM. The effects of fucodan on senescence are controlled by the p16INK4a-pRb and p14Arf-p53 pathways in hepatocellular carcinoma and hepatic cell lines. *International Journal of Oncology* [online]. 2014, **45**(1), 47–56. ISSN 1791-2423. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2014.2426
- [406] VADDAVALLI, Pavana Lakshmi a Björn SCHUMACHER. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging. *Trends in Genetics* [online]. 2022, **38**(6), 598–612. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/j.tig.2022.02.010
- [407] SCHULZ-HEDDERGOTT, Ramona, Nadine STARK, Shelley J. EDMUNDS, Jinyu LI, Lena-Christin CONRADI, Hanibal BOHNENBERGER, Fatih CETECI, Florian R. GRETEN, Matthias DOBBELSTEIN a Ute M. MOLL. Therapeutic Ablation of Gain-of-Function Mutant p53 in Colorectal Cancer Inhibits Stat3-Mediated Tumor Growth and Invasion. *Cancer Cell* [online]. 2018, **34**(2), 298-314.e7. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2018.07.004
- [408] YANG, Fang, Jacqueline F. WANG, Yucai WANG, Baorui LIU a Julian R. MOLINA. Comparative Analysis of Predictive Biomarkers for PD-1/PD-L1 Inhibitors in Cancers: Developments and Challenges. *Cancers* [online]. 2021, **14**(1), 109. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14010109
- [409] NOWAK, Dawid G., Hyejin CHO, Tali HERZKA, Kaitlin WATRUD, Daniel V. DEMARCO, Victoria M. Y. WANG, Serif SENTURK, Christof FELLMANN, David DING, Tumas BEINORTAS, David KLEINMAN, Muhan CHEN, Raffaella SORDELLA, John E. WILKINSON, Mireia CASTILLO-MARTIN, Carlos CORDON-CARDO, Brian D. ROBINSON a Lloyd C. TROTMAN. MYC Drives Pten/Trp53-Deficient Proliferation and Metastasis due to IL6 Secretion and AKT Suppression via PHLPP2. *Cancer Discovery* [online]. 2015, **5**(6), 636–651. ISSN 2159-8290. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1113
- [410] MEHTA, S. A., K. W. CHRISTOPHERSON, P. BHAT-NAKSHATRI, R. J. GOULET, H. E. BROXMEYER, L. KOPELOVICH a H. NAKSHATRI. Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. *Oncogene* [online]. 2007, **26**(23), 3329–3337. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1210120

- [411] MITKIN, Nikita A., Christina D. HOOK, Anton M. SCHWARTZ, Subir BISWAS, Dmitry V. KOCHETKOV, Alisa M. MURATOVA, Marina A. AFANASYEVA, Julia E. KRAVCHENKO, Arindam BHATTACHARYYA a Dmitry V. KUPRASH. p53-dependent expression of CXCR5 chemokine receptor in MCF-7 breast cancer cells. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1), 9330. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep09330
- [412] RUDELLELL, A., K. S. KELLY-SPRATT, M. FURUYA, S. S. PARGHI a C. J. KEMP. p19/Arf and p53 suppress sentinel lymph node lymphangiogenesis and carcinoma metastasis. *Oncogene* [online]. 2008, **27**(22), 3145–3155. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1210973
- [413] GUO, Gang, Luis MARRERO, Paulo RODRIGUEZ, Luis DEL VALLE, Augusto OCHOA a Yan CUI. Trp53 inactivation in the tumor microenvironment promotes tumor progression by expanding the immunosuppressive lymphoid-like stromal network. *Cancer Research* [online]. 2013, **73**(6), 1668–1675. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3810
- [414] HE, Xue-Yan, Cong XIANG, Chen-Xi ZHANG, Yin-Yin XIE, Lai CHEN, Guo-Xin ZHANG, Yi LU a Geng LIU. p53 in the Myeloid Lineage Modulates an Inflammatory Microenvironment Limiting Initiation and Invasion of Intestinal Tumors. *Cell Reports* [online]. 2015, **13**(5), 888–897. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.09.045
- [415] PHILIP, Mary, Donald A. ROWLEY a Hans SCHREIBER. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2004, **14**(6), 433–439. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2004.06.006
- [416] UBERTINI, V., G. NORELLI, D. D'ARCANGELO, A. GURTNER, E. CESAREO, S. BALDARI, M. P. GENTILESCHI, G. PIAGGIO, P. NISTICÒ, S. SODDU, A. FACCHIANO a G. BOSSI. Mutant p53 gains new function in promoting inflammatory signals by repression of the secreted interleukin-1 receptor antagonist. *Oncogene* [online]. 2015, **34**(19), 2493–2504. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2014.191
- [417] MENENDEZ, Daniel, Julie M. LOWE, Joyce SNIPE a Michael A. RESNICK. Ligand dependent restoration of human TLR3 signaling and death in p53 mutant cells. *Oncotarget* [online]. 2016, **7**(38), 61630–61642. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.11210
- [418] SIDDIQUI, Shoib Sarwar, Sofia RAHMAN, H. P. Vasantha RUPASINGHE a Cijo George VAZHAPPILLY. Dietary Flavonoids in p53-Mediated Immune Dysfunctions Linking to Cancer Prevention. *Biomedicines* [online]. 2020, **8**(8), E286. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines8080286
- [419] LAUWEN, Marjolein M., Sander ZWAVELING, Linda DE QUARTEL, S. Carmela FERREIRA MOTA, Janine A. C. GRASHORN, Cornelis J. M. MELIEF, Sjoerd H. VAN DER BURG a Rienk OFFRINGA. Self-tolerance does not restrict the CD4+ T-helper response against the p53 tumor antigen. *Cancer Research* [online]. 2008, **68**(3), 893–900. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3166
- [420] ZWAVELING, Sander, Michel P. M. VIERBOOM, Sandra C. FERREIRA MOTA, Jennifer A. HENDRIKS, Marlies E. OOMS, Roger P. M. SUTMULLER, Kees L. M. C. FRANKEN, Hans W. NIJMAN, Ferry OSSENDORP, Sjoerd H. VAN DER BURG, Rienk OFFRINGA a Cornelis J. M. MELIEF. Antitumor efficacy of wild-type p53-specific CD4(+) T-helper cells. *Cancer Research*. 2002, **62**(21), 6187–6193. ISSN 0008-5472.
- [421] MALEKZADEH, Parisa, Anna PASETTO, Paul F. ROBBINS, Maria R. PARKHURST, Biman C. PARIJA, Li JIA, Jared J. GARTNER, Victoria HILL, Zhiya YU, Nicholas P. RESTIFO, Abraham SACHS, Eric TRAN, Winifred LO, Robert Pt SOMERVILLE, Steven A. ROSENBERG a Drew C. DENIGER. Neoantigen screening identifies broad TP53 mutant immunogenicity in patients with epithelial cancers. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2019, **129**(3), 1109–1114. ISSN 1558-8238. Dostupné z: doi:10.1172/JCI123791
- [422] 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
- [423] WYLIE, Annika, Amanda E. JONES, Alejandro D'BROT, Wan-Jin LU, Paula KURTZ, John V. MORAN, Dinesh RAKHEJA, Kenneth S. CHEN, Robert E. HAMMER, Sarah A. COMERFORD, James F. AMATRUDA a John M. ABRAMS. p53 genes function to restrain mobile elements. *Genes & Development* [online]. 2016, **30**(1), 64–77. ISSN 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.266098.115
- [424] EL-DEIRY, W. S., S. E. KERN, J. A. PIETENPOL, K. W. KINZLER a B. VOGELSTEIN. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics* [online]. 1992, **1**(1), 45–49. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng0492-45

- [425] SAMMONS, Morgan A., Jiajun ZHU, Adam M. DRAKE a Shelley L. BERGER. TP53 engagement with the genome occurs in distinct local chromatin environments via pioneer factor activity. *Genome Research* [online]. 2015, **25**(2), 179–188. ISSN 1549-5469. Dostupné z: doi:10.1101/gr.181883.114
- [426] RUBBI, Carlos P. a Jo MILNER. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *The EMBO journal* [online]. 2003, **22**(4), 975–986. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdg082
- [427] MENENDEZ, Daniel, Alberto INGA a Michael A. RESNICK. Potentiating the p53 network. *Discovery Medicine*. 2010, **10**(50), 94–100. ISSN 1944-7930.
- [428] WANG, Bei, Ziwei XIAO a Ee Chee REN. Redefining the p53 response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(34), 14373–14378. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0903284106
- [429] MENENDEZ, Daniel, Alberto INGA a Michael A. RESNICK. Estrogen receptor acting in cis enhances WT and mutant p53 transactivation at canonical and noncanonical p53 target sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(4), 1500–1505. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0909129107
- [430] SMEENK, Leonie, Simon J. VAN HEERINGEN, Max KOEPEL, Marc A. VAN DRIEL, Stefanie J. J. BARTELS, Robert C. AKKERS, Sergei DENISSOV, Hendrik G. STUNNENBERG a Marion LOHRUM. Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(11), 3639–3654. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkn232
- [431] 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 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt657
- [432] 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
- [433] 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
- [434] HORVATH, Monica M., Xuting WANG, Michael A. RESNICK a Douglas A. BELL. Divergent Evolution of Human p53 Binding Sites: Cell Cycle Versus Apoptosis. *PLOS Genetics* [online]. 2007, **3**(7), e127. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.0030127
- [435] LOZANO, Guillermina. Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, **2**(4), a001115. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a001115
- [436] JANA, Jagannath a Klaus WEISZ. Thermodynamic Stability of G-Quadruplexes: Impact of Sequence and Environment. *ChemBioChem* [online]. 2021, **22**(19), 2848–2856. ISSN 1439-7633. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.202100127
- [437] 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). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21010127
- [438] TOLSTORUKOV, M Y, V I IVANOV, G G MALENKOV, R L JERNIGAN a V B ZHURKIN. Sequence-dependent B<-->A transition in DNA evaluated with dimeric and trimeric scales. *Biophysical Journal*. 2001, **81**(6), 3409–3421. ISSN 0006-3495.
- [439] JOHNSTONE, R. W., W. WEI, A. GREENWAY a J. A. TRAPANI. Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16. *Oncogene* [online]. 2000, **19**(52), 6033–6042. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1204005
- [440] LI, Xi, Yinghua PENG a Xiaogang QU. Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B–A transition in solution. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(13), 3670–3676. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl513

- [441] BRÁZDA, Václav, Jan COUFAL, Jack C. C. LIAO a Cheryl H. ARROWSMITH. Preferential binding of IFI16 protein to cruciform structure and superhelical DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2012, **422**(4), 716–720. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.065
- [442] KYPR, Jaroslav, Iva KEJNOVSKÁ, Daniel RENČIUK a Michaela VORLÍČKOVÁ. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(6), 1713–1725. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp026
- [443] KYPR, Jaroslav, Iva KEJNOVSKÁ, Klára BEDNÁŘOVÁ a Michaela VORLÍČKOVÁ. Circular Dichroism Spectroscopy of Nucleic Acids. In: *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2012 [vid. 2023-04-12], s. 575–586. ISBN 978-1-118-12039-2. Dostupné z: doi:10.1002/9781118120392.ch17
- [444] PERRONE, Rosalba, Enrico LAVEZZO, Erika RIELLO, Riccardo MANGANELLI, Giorgio PALÙ, Stefano TOPPO, Roberta PROVVEDI a Sara N. RICHTER. Mapping and characterization of G-quadruplexes in Mycobacterium tuberculosis gene promoter regions. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 5743. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05867-z
- [445] WOO, Hye-Min, Jin-Moo LEE, Sanggyu YIM a Yong-Joo JEONG. Isolation of Single-Stranded DNA Aptamers That Distinguish Influenza Virus Hemagglutinin Subtype H1 from H5. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(4), e0125060. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0125060
- [446] POON, K. a R. B. MACGREGOR. Formation and structural determinants of multi-stranded guanine-rich DNA complexes. *Biophysical Chemistry* [online]. 2000, **84**(3), 205–216. ISSN 0301-4622. Dostupné z: doi:10.1016/s0301-4622(00)00106-x
- [447] DO, Ngoc Quang, Kah Wai LIM, Ming Hoon TEO, Brahim HEDDI a Anh Tuân PHAN. Stacking of G-quadruplexes: NMR structure of a G-rich oligonucleotide with potential anti-HIV and anticancer activity†. *Nucleic Acids Research* [online]. 2011, **39**(21), 9448–9457. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkr539
- [448] BUGAUT, Anthony a Shankar BALASUBRAMANIAN. A Sequence-Independent Study of the Influence of Short Loop Lengths on the Stability and Topology of Intramolecular DNA G-Quadruplexes. *Biochemistry* [online]. 2008, **47**(2), 689–697. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi701873c
- [449] LAGES, Ana, Christopher G. PROUD, John W. HOLLOWAY a Igor VORECHOVSKY. Thioflavin T Monitoring of Guanine Quadruplex Formation in the rs689-Dependent INS Intron 1. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* [online]. 2019, **16**, 770–777. ISSN 2162-2531. Dostupné z: doi:10.1016/j.omtn.2019.04.026
- [450] JOACHIMI, Astrid, Armin BENZ a Jörg S. HARTIG. A comparison of DNA and RNA quadruplex structures and stabilities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2009, **17**(19), 6811–6815. ISSN 1464-3391. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2009.08.043
- [451] BUGAUT, Anthony a Shankar BALASUBRAMANIAN. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012, **40**(11), 4727–4741. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks068

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1D	jednorozměrný (z angl. one-dimensional)
3D	trojrozměrný (z angl. three-dimensional)
A	adenin
<i>ADE2</i>	gen pro fosforibosylaminoimidazolkarboxylázu
AIM2	interferonem indukovatelný protein chybí v melanomu (z angl. absent in melanoma 2)
ALR	rodiny cytosolických DNA receptorů podobných AIM2 (z angl. AIM2 like receptors)
AP	aktivační protein (z angl. activator protein)
APO1	receptor pro programovanou buněčnou smrt, Fas receptor (z angl. apoprotein 1 nebo fas cell surface death receptor)
ASC	adaptorový protein spojený s apoptózou, podobný skvrnitému proteinu obsahující CARD (z angl. apoptosis-associated speck-like protein containing CARD)
AspRS	tRNA (transferová RNA) syntetáza kyseliny asparagové (z angl. Aspartic acid transfer RNA synthetase)
a-TEBP	protein <i>Arabidopsis thaliana</i> vázající responzivní element obsahující ethylen (z angl. <i>Arabidopsis thaliana</i> ethylene-responsive element binding protein)
ATM	serin/threonin kinasa ATM (z angl. Ataxia-telangiectasia mutated)
ATRX	regulátor transkripce ATRX také známý jako ATP-dependntní helikáza ATRX, nebo X-vázaná helikáza II (z angl. ATP-dependent helicase)
BASC	komplex proteinů asociovaný s genem BRCA1 pro protein náchylnosti k rakovině prsu typu 1 (z angl. a super complex of BRCA1 (breast cancer type 1)-associated proteins)
Bax	regulátor apoptosy (z angl. BCL2 associated X)
BCL-2	lymfom B-buněk 2 (z angl. B-cell lymphoma 2)
BER	oprava vyřiznutím bází (z angl. base excision repair)
BIRC5	bakulovirový inhibitor repetice apoptózy obsahující 5 (z angl. baculoviral IAP repeat containing 5)
bp	páry bází (z angl. base pairs)
BRIP1	protein FANCI
C	cytosin
C9orf72	otevřený čtecí rámec 72 chromosomu 9 (z angl. chromosome 9 open reading frame 72)
Casp-1	kaspáza 1 (z angl. caspase 1)
CD spektroskopie	spektroskopie cirkulárního dichroismu (z angl. circular dichroism spectroscopy)
CD4+	skupina T-lymfocytů s diferenciační skupinou povrchových glykoproteinů lokalizovaných převážně na vnější straně cytoplazmatické membrány
CDK	cyklin-dependntní kináza (z angl. cyklin-dependent kinase)
<i>c-KIT</i>	gen pro tyrosinkinázový receptor KIT
c-MYB	protein z rodiny transkripčních faktorů MYB
cMYC	sekvence DNA odvozená z promotoru genu <i>myc</i>
DBD	DNA-vázající doména (z angl. DNA-binding domain)

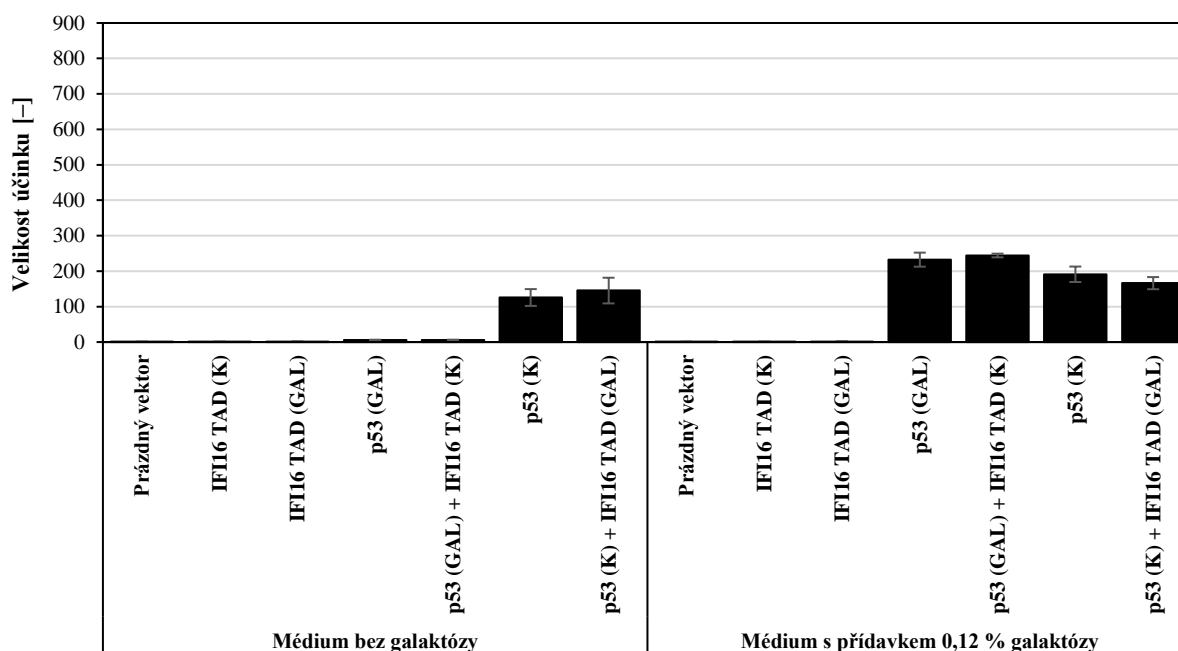
DMS	dimethylsulfid (z angl. dimethyl sulfide)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (z angl. deoxyribonucleic acid)
DNA2	ATP-dependentní helikáza/nukleáza DNA2 replikující DNA (z angl. DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2)
DOG-1	homolog BRIP1/FANCI
DR5	receptor buněčné smrti 5 označován jako KILLER (z angl. death receptor 5)
dsDNA	dvouřetězcová DNA (z angl. double-stranded DNA)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2F	skupina transkripčních faktorů zapojených do regulace buněčného cyklu a syntézy DNA v savčích buňkách
E3	ubikvitin-protein ligáza
EBV	virus Epstein-Barrové (z angl. Epstein-Barr Virus)
EMSA	elektroforetický test posunu mobility (z angl. electrophoretic mobility shift assay)
ERAP1	Aminopeptidáza 1 endoplazmatického retikula (z angl. endoplasmic reticulum aminopeptidase 1)
Est1	telomerázový elongační protein EST1 (z angl. telomere elongation protein EST1)
EXO1	exonukleasa 1 (z angl. exonuclease 1)
FANCI	protein Fanconioho anémie skupiny J (z angl. Fanconi anemia group J protein)
Fas	receptor pro programovanou buněčnou smrt lokalizovaný na povrchu buněk, znám rovněž jako APO-1 nebo APT
FEN1	endonukleáza chlopně 1 (z angl. flap endonuclease 1)
FMR1	messengerový ribonukleoprotein fragilního X (z angl. fragile X messenger ribonucleoprotein 1)
FXS	syndrom fragilního X (z angl. fragile X syndrome)
G	guanin
G4	G-kvadruplex (z angl. G-quadruplex)
Gadd45	protein odpovědný za zastavení růstu a opravy poškozené DNA alfa (z angl. growth arrest and DNA damage inducible alpha)
GAL1	galaktózou indukovaný promotor 1
HCMV	lidský cytomegalovirus (z angl. Human Cytomegalovirus)
HIF-1 α	hypoxií indukovatelný faktor 1-alfa (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HIN-200	rodina interferonem indukovatelných jaderných proteinů nesoucích HIN doménu tvořenou 200-aminokyselinovým motivem
<i>HIS3</i>	gen pro Imidazolglycerol-fosfát dehydratázu
HIV	virus lidské imunodeficiency (z angl. human immunodeficiency virus)
HSV-1	virus herpes simplex typ 1 (z angl. Herpes Simplex Virus 1)
HTEL	DNA odvozená ze sekvence lidské telomerické DNA (z angl. human-like telomeric DNA)
hTERT	lidská telomasová reverzní transkriptáza (z angl. human telomerase reverse transcriptase)
IFIX	interferonem indukovatelný protein X (z angl. interferon gamma inducible protein X)
IFN	interferon

IL	interleukin
IRF3	interferonový regulační faktor (z angl. interferon regulatory factor)
K214	lysin v pozici 214
K _{252A}	lysin v pozici 252 substituovaný alaninem
Kem1	exonukleáza XRN1
KRAS	gen pro proto-onkogen K-RAS (z angl. Kirsten rat sarcoma virus)
KSHV	herpesvirus spojený s Kaposiho sarkomem (z angl. Kaposi's Sarcome-Associated Herpesvirus)
lacZ	laktosový operon Z
LUC1	gen pro produkci luciferázy 1
MDM2	negativní regulátor p53 (z angl. mouse double minute 2 homolog)
mj.	mimo jiné
MMR	oprava chybného párování DNA (z angl. DNA mismatch repair)
MNDA	nukleární diferenační antigen myeloidních buněk (z angl. myeloid cell nuclear differentiation antigen)
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
MtCK	mitochondriální keratin kináza (z angl. mitochondrial creatine kinase)
mTOR	proteinkináza (z angl. mammalian target of rapamycin)
N373	asparagin v pozici 373
NAP1L1	nukleosomy sestavující protein 1 (z angl. nucleosome assembly protein 1-like 1)
např.	například
NER	oprava excize nukleotidů (z angl. nucleotide excision repair)
NES	jaderný signál exportu (z angl. nuclear export signal)
NF-κB	nukleární faktor kappa B (z angl. nuclear factor kappa B)
NHEJ	nehomologní spojování konců (z angl. non-homologous end joining)
NK	nukleové kyseliny
NLS	jaderný lokalizační signál (z angl. nuclear localization signal)
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
NPM1	nukleofosmin (z angl. nucleophosmin)
OB záhyby	oblasti proteinu vázající se k oligonukleotidům nebo oligosacharidům (z angl. oligonucleotide/oligosaccharide binding folds)
P1G4	sérový amyloid A1 znám i jako SAA1 (z angl. cell proliferation-inducing gene 4)
p21	protein tlumící činnost jakéhokoliv komplexu cyklin-dependentních kináz s cyklinem a tím brání vstupu buněk do dalších kol buněčného cyklu
p53	buněčný nádorový antigen, „strážce genomu“ (z angl. cellular tumor antigen p53)
PARP1	poly[ADP-ribóza]polymeráza 1 (z angl. poly [ADP-ribose] polymerase 1)
PDGF	destičkový růstový faktor (z angl. platelet-derived growth factor)
pRb	protein související s retinoblastomem (z angl. retinoblastoma-related protein)
PRD	doména bohatá na prolin (z angl. proline-rich domain)
proCasp-1	prokaspáza 1 (z angl. procaspase-1)
pro-IL	prointerleukin
příp.	případně

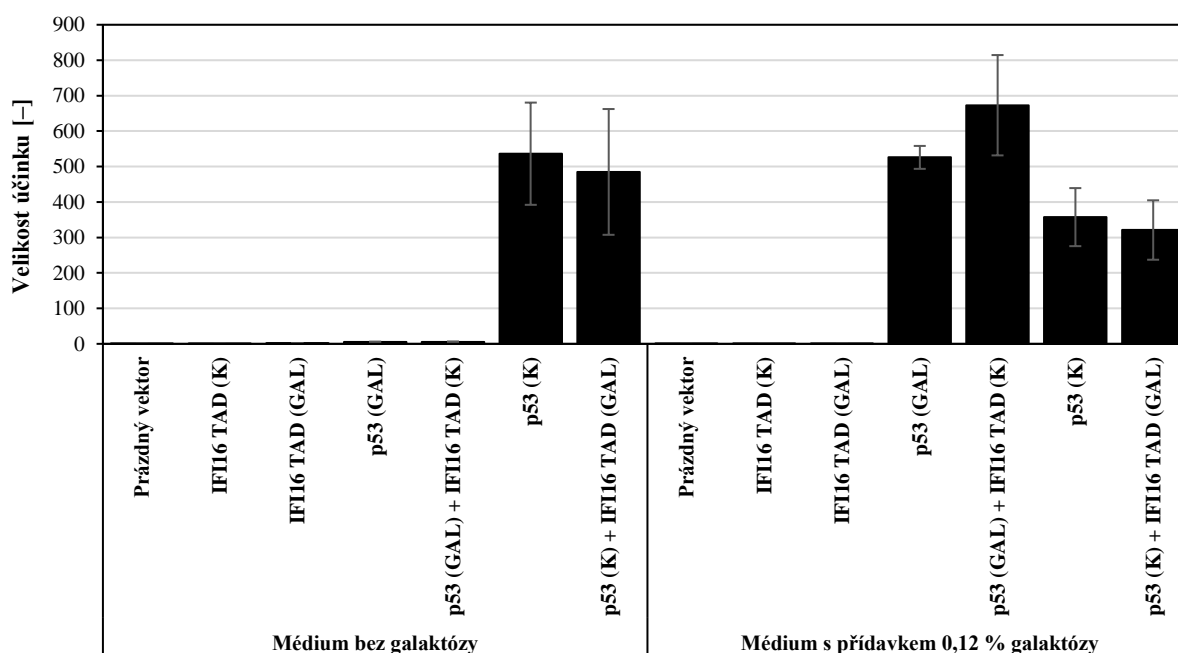
Pu39	oblast bohatá na G v promotoru P1 onkogenu BCL-2
Q374	glutamin v pozici 374
R273H	arginin v pozici 273 substituovaný za histidin
R368	arginin v pozici 368
Rb	retinoblastom (z angl. retinoblastoma)
resp.	respektive
RET	receptorová kináza pro členy rodiny neurotrofilních faktorů odvozených od gliových buněk kódovaná proto-onkogenem identifikovaným v buněčné linii fibroblastů po transfekci DNA odebrané z lidských lymfomových buněk (z angl. rearranged during transfection)
RF	restrikční faktor (z angl. restriction factor)
RIG	gen indukovatelný kyselinou retinovou (z angl. retinoic acid-inducible gene)
RNA	kyselina ribonukleová (z angl. ribonucleic acid)
ROS	radikály kyslíku (z angl. oxygen-containing reactive species)
RPA	replikační protein A (z angl. replication protein A)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S614	serin v pozici 614
SARS	těžký akutní respirační syndrom (z angl. severe acute respiratory syndrome)
scFv	jednořetězcový variabilní fragment (z angl. single-chain variable fragment)
Sgs1	supresor pomalého růstu (z angl. slow growth suppressor 1)
SLE	systémový lupus erythematosus (z angl. lupus erythematosus disseminatus)
Sp1	protein specifčnosti 1 (z angl. specificity protein 1)
ssDNA	jednořetězcová DNA (z angl. single-stranded DNA)
STAT3	převodník signálu a aktivátor transkripce 3 (z angl. signal transducer and activator of transcription 3)
STING	stimulátor interferonových genů (z angl. stimulator of interferon genes)
SV40	opičí vakuolizující virus 40 (z angl. simian vacuolating virus 40)
T	thymin
TAD	transkripčně-aktivační doména (z angl. trans-activation domain)
TAP1	transportér spojený se zpracováním antigenu 1 (z angl. transporter associated with antigen processing 1)
TBK	TANK vazebná kináza (z angl. TANK-binding kinase)
TEBP	protein vázající konce telomer (z angl. telomere end-binding protein)
TERRA	RNA obsahující telomerické repetice (z angl. telomeric repeat-containing RNA)
ThT	Thioflavin T (z angl. thioflavine T)
tj.	to je
TLR3	recetor pro rozpoznávání vzorů vrozeného imunitního systému (z angl. toll-like receptor 3)
TP53	gen pro protein p53 (z angl. tumor protein p53)
TRF2	vazebný faktor telomerické repetice (z angl. telomeric repeat binding factor 2)
tzv.	takzvaný
UL-54	strukturní protein lidského cytomegaloviru

ULBP1	UL16 vazebný protein 1 (z angl. UL16 binding protein 1)
<i>URA3</i>	gen pro orotidin 5-fosfát dekarboxylázu
UTR	nepřekládaná oblast mRNA (z angl. untranslated region)
UV	ultrafialové (záření) (z angl. ultraviolet)
<i>VEGF</i>	gen pro cévní endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
WRN	helikáza Wernerova syndromu (z angl. Werner syndrome helicase)
$\Delta\varepsilon$	změna molárního absorpčního koeficientu
ε_L	molární absorpční koeficient levotočivého polarizovaného světla
ε_R	molární absorpční koeficient pravotočivého polarizovaného světla
λ	vlnová délka
ω	úhlová rychlost

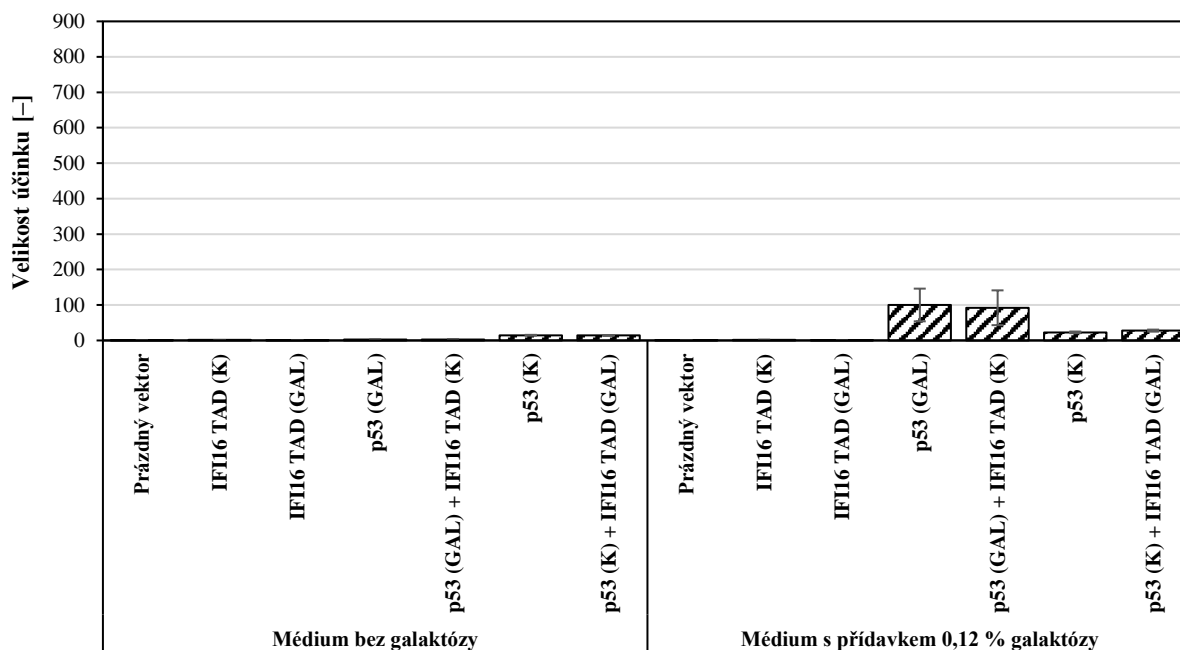
9 PŘÍLOHY



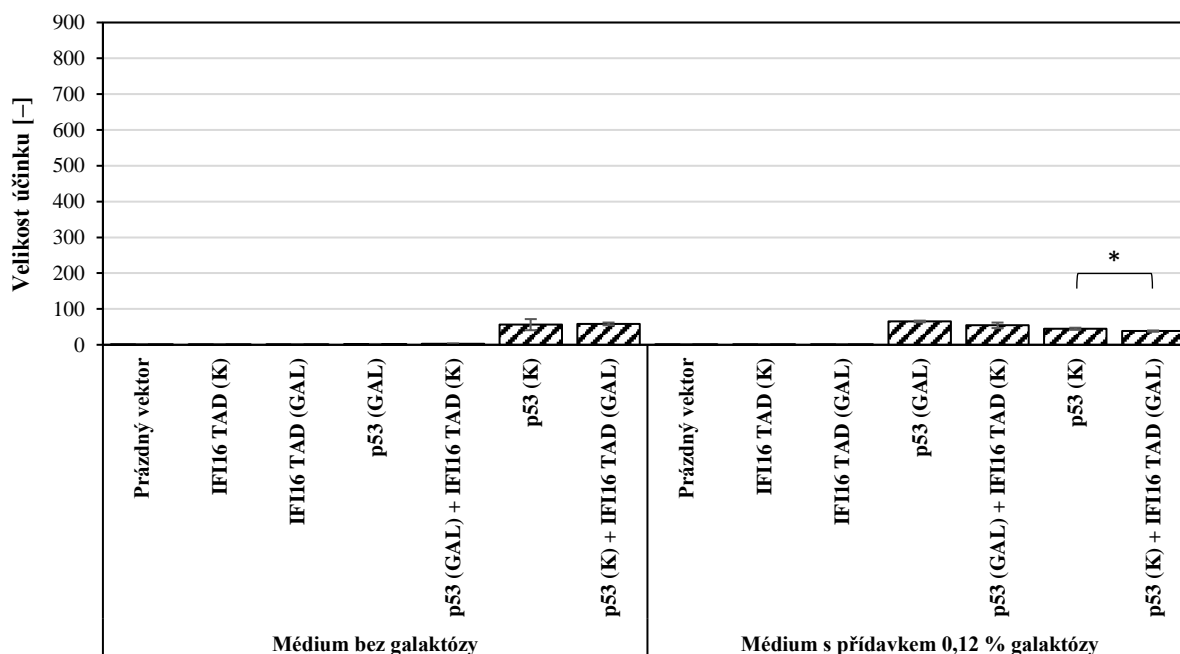
Obrázek P1: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmene PUMA v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



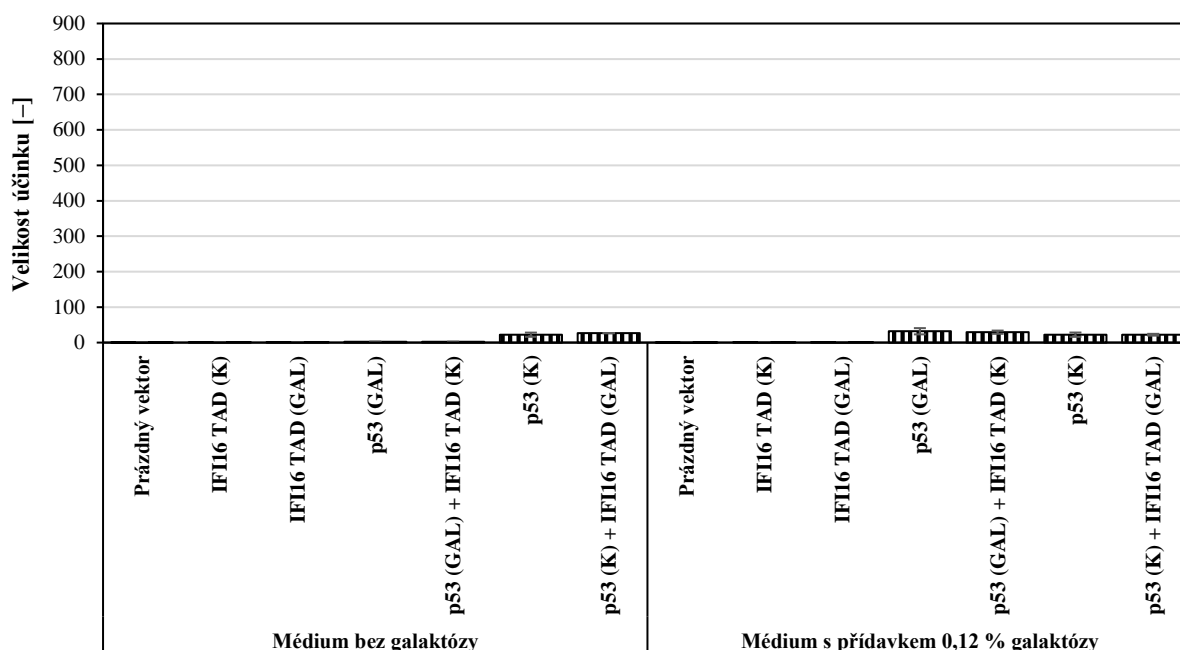
Obrázek P2: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmene PUMA v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



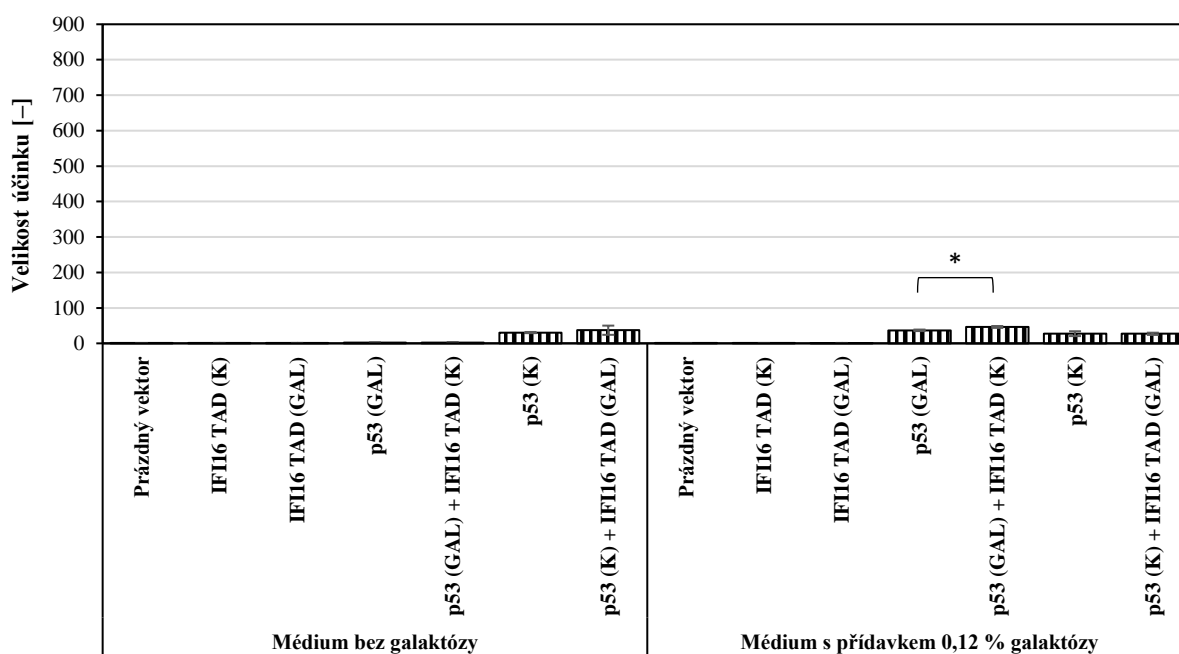
Obrázek P3: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



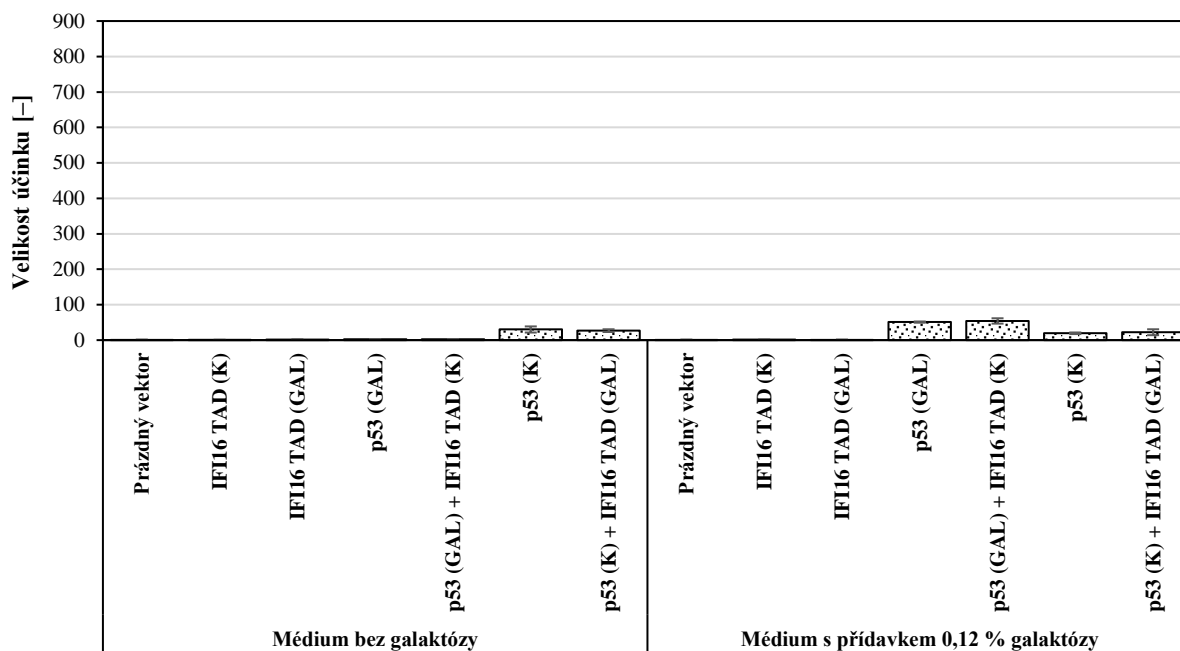
Obrázek P4: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



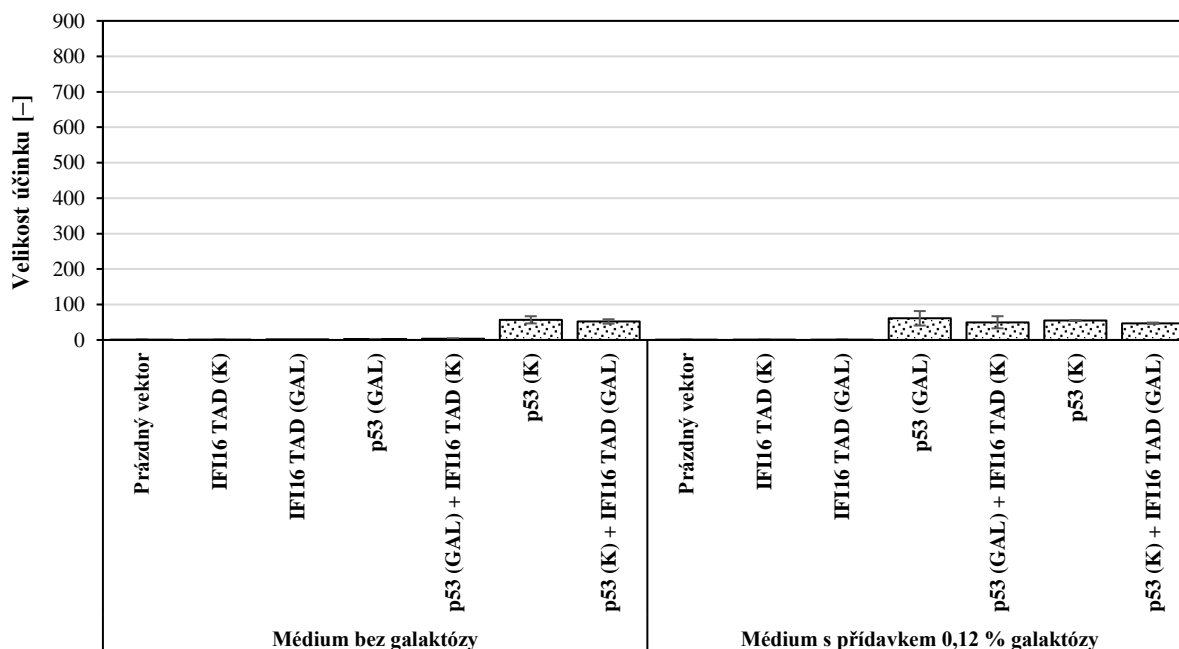
Obrázek P5: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-1no v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53^{l89} – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



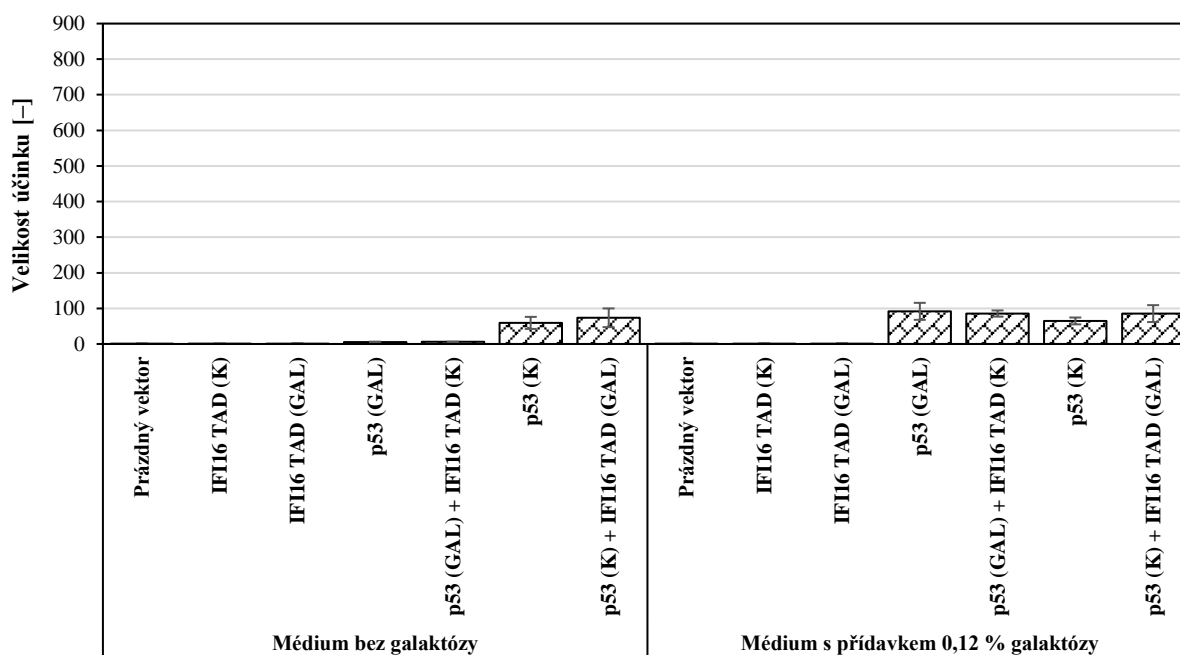
Obrázek P6: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-1no v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53^{l89} – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



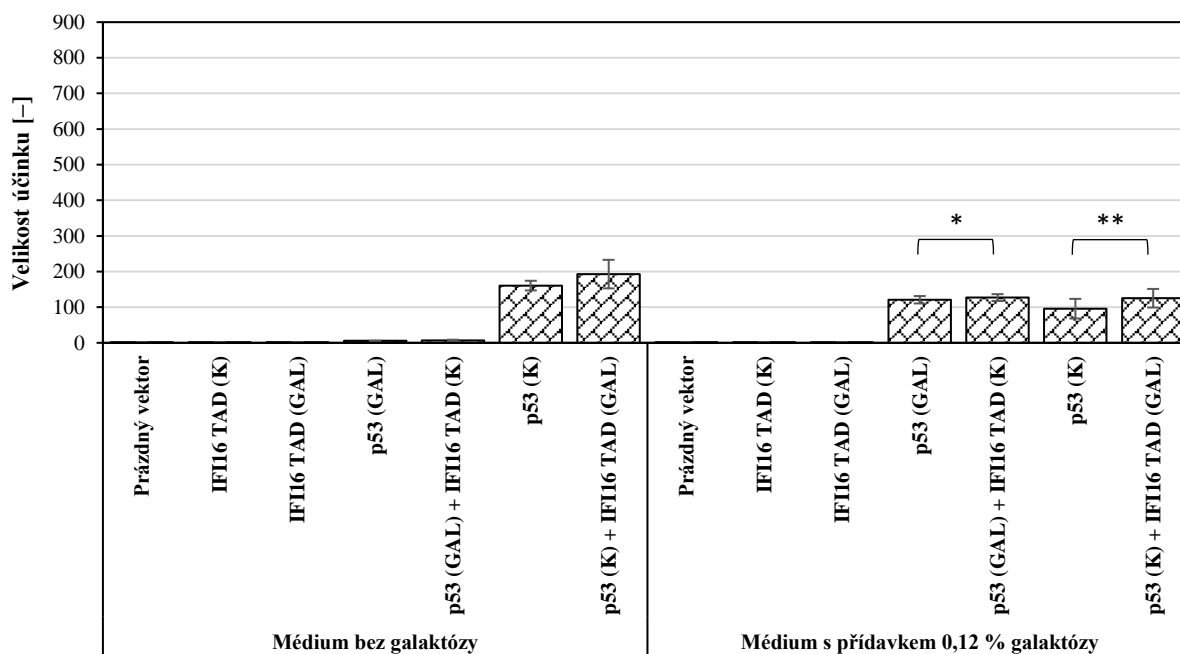
Obrázek P7: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-2no v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



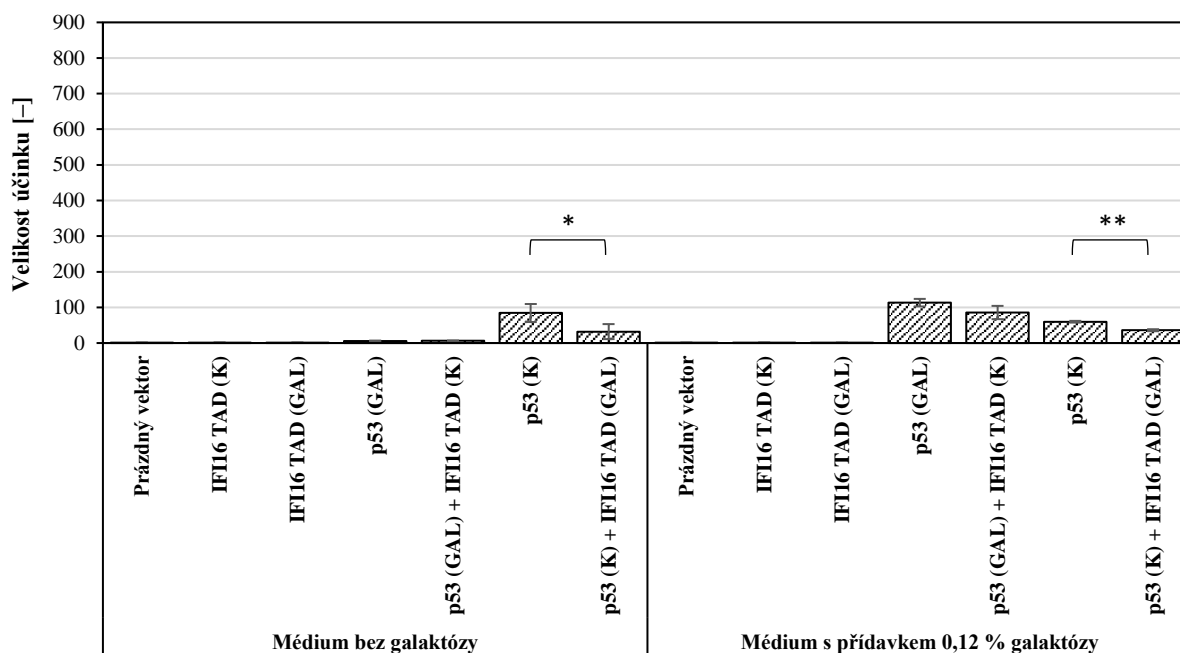
Obrázek P8: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-2no v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



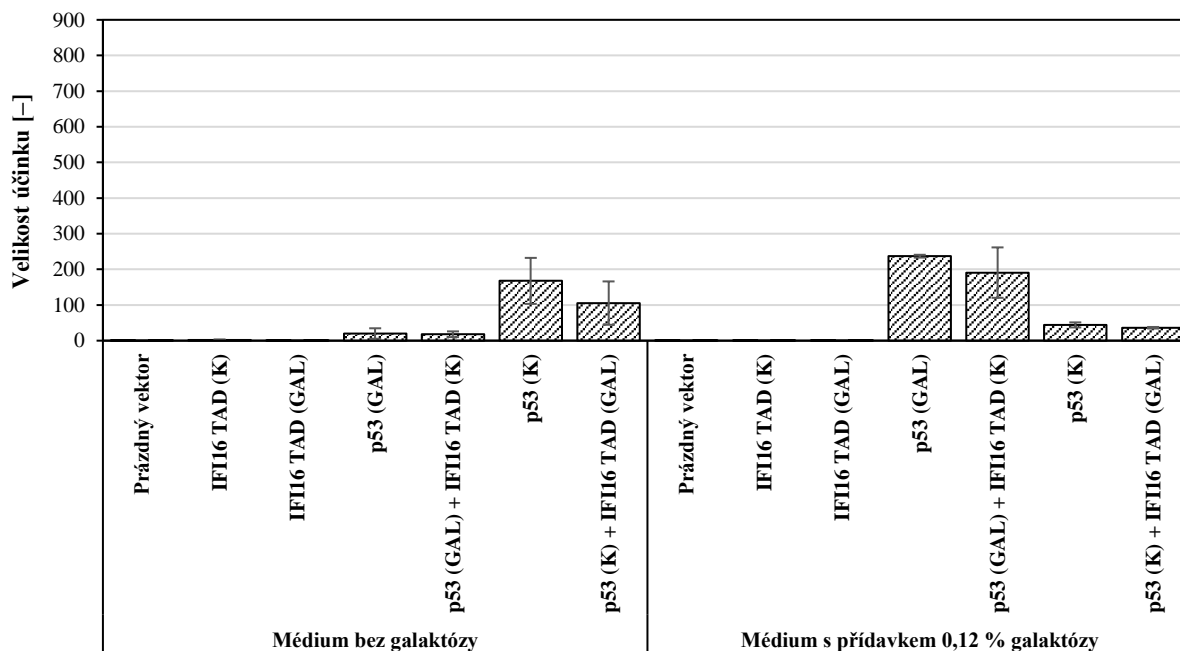
Obrázek P9: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-3no v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – indukibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – indukibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



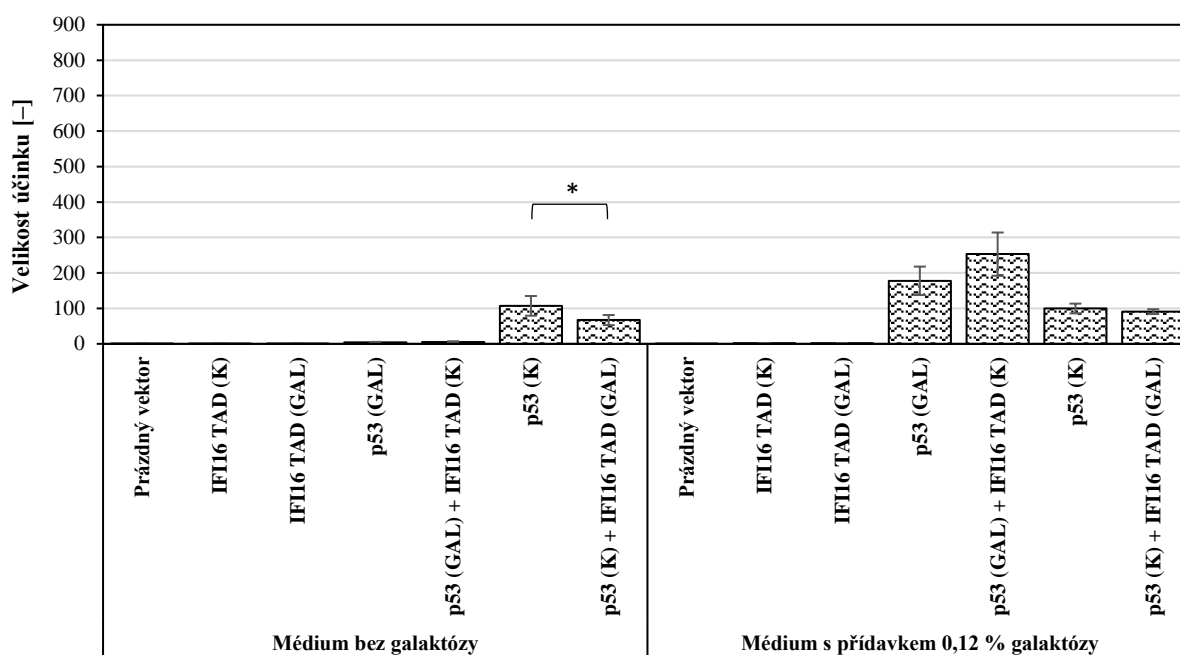
Obrázek P10: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-3no v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – indukibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – indukibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



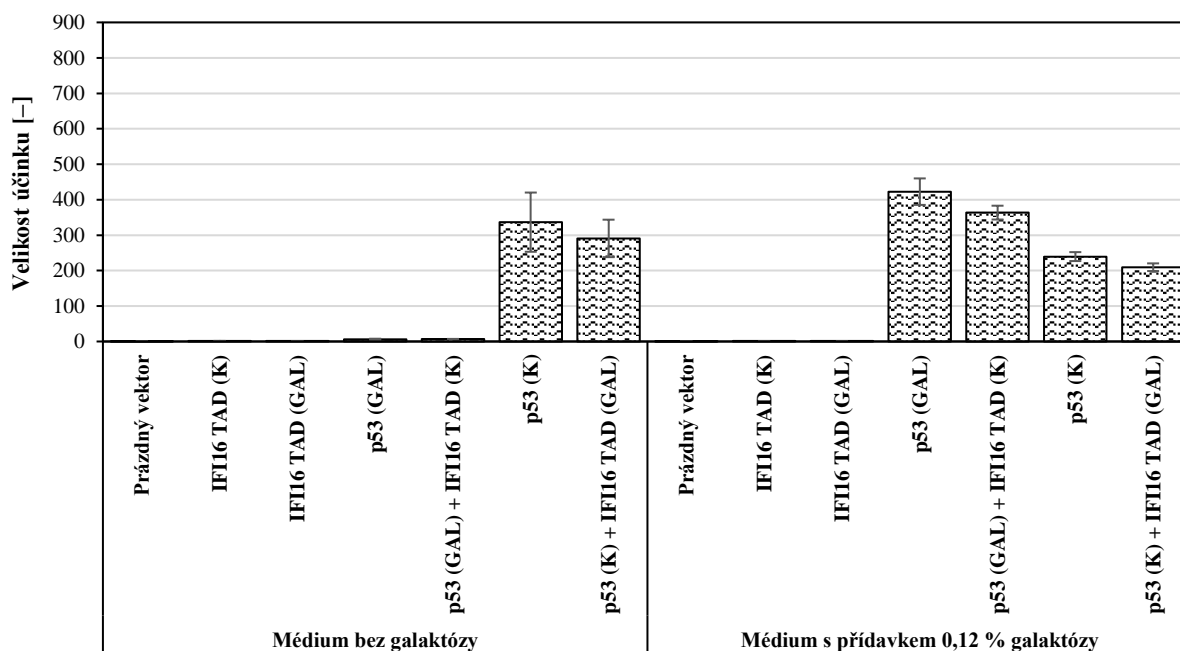
Obrázek P11: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-Mut1.0 v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – indukibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – indukibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***)



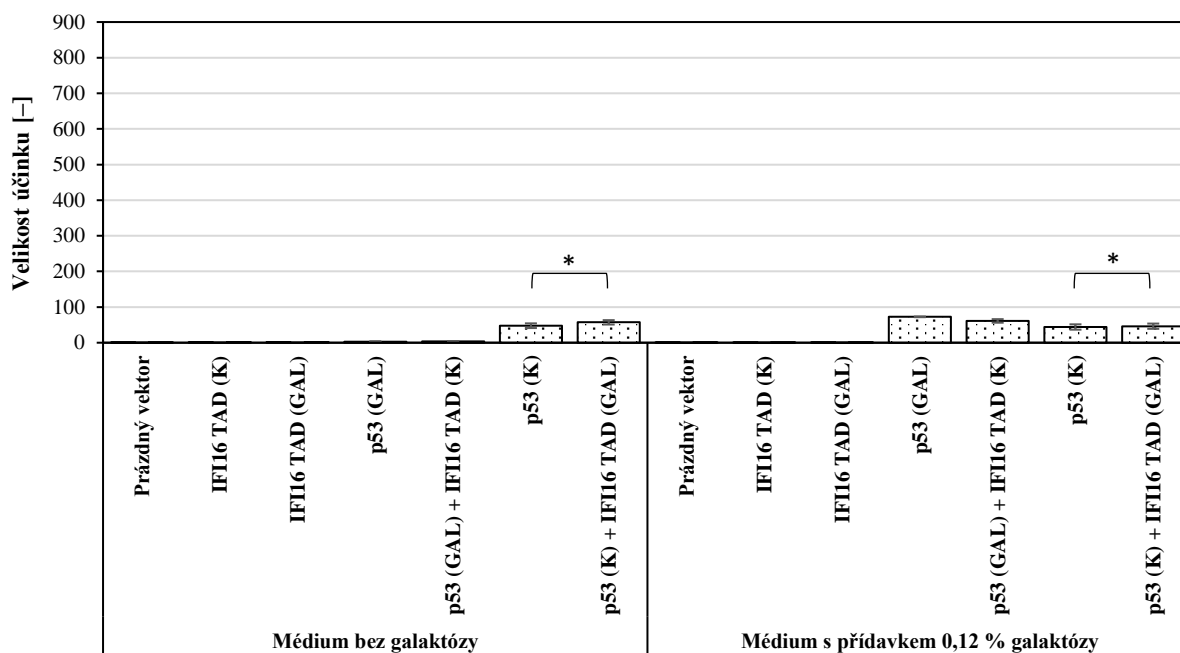
Obrázek P12: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-Mut1.0 v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – indukibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – indukibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***)



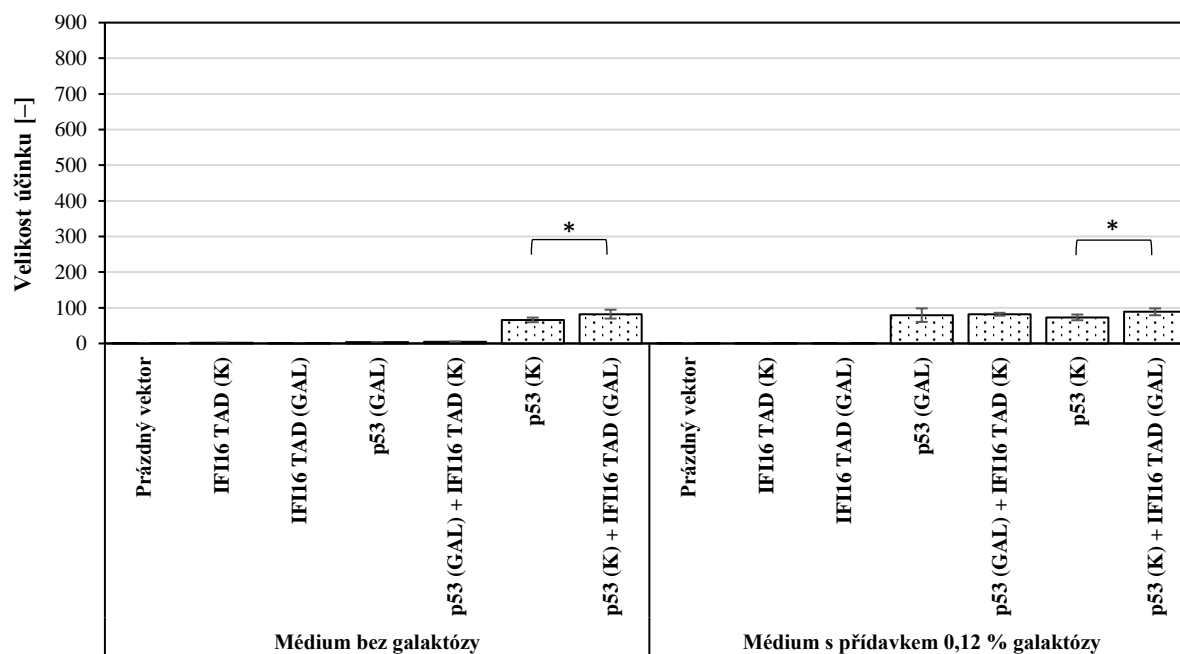
Obrázek P13: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-Mut1.5 v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



Obrázek P14: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-Mut1.5 v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; p53 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***).



Obrazek P15: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-Mut2.0 v čase T6. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; plls89 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***)



Obrazek P16: Vyhodnocení výsledků luciferázových reportérových testů kmenu PUMA-KSHV-Mut2.0 v čase T24. Závislost udává velikosti účinků jednotlivých transformantů exprimujících proteiny IFI16 (pTSAD TAD IFI16 – konstitutivní p.; pTSAG TAD IFI16 – inducibilní p.), p53 (pls p53 WT – konstitutivní p.; plls89 – inducibilní p.) a IFI16 v koexpresi s proteinem p53. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly na hladinách $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,001$ (***)