



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

**VLIV MAKROELEMENTŮ Z POTRAVY NA DNA A
EPIGENETICKÝ PROFIL**

INFLUENCE OF MAKROELEMENTS FROM FOOD ON DNA AND EPIGENETIC PROFILE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Zdeněk Veselý

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1730/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Zdeněk Veselý**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vliv makroelementů z potravy na DNA a epigenetický profil

Zadání bakalářské práce:

- Kultivace nádorových a nenádorových buněk.
- Testování vlivu vybraných látek in vivo (nádorové a nenádorové buňky).
- Testování vlivu látek in vitro (CD spektroskopie, ThT assay).
- Stanovení globální metylace před a po působení vybraných látek (kit Abcam).
- Detekce epigenetických markerů – imunoprecipitace.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Zdeněk Veselý
student

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Makroelementy obsažené v potravě mají důležitou funkci pro lidský organismus. Podílí se na řadě biochemických reakcí v lidském těle a jejich vyvážené množství je důležité pro prevenci vážných onemocnění.

V teoretické části bakalářské práce byla popsána funkce minerálních látek v lidském organismu, funkce DNA a epigenetických mechanismů, jako je metylace DNA nebo modifikace histonů. Byl popsán vliv výživy a funkce vybraných makroelementů – sodík, hořčík, vápník, draslík na epigenetické modifikace a na stabilitu G-kvadruplexů. Cílem experimentální části práce bylo studovat vliv těchto látek na DNA struktury *in vitro* a připravit experimentálně pro studium *in vivo*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Živiny, G-kvadruplex, DNA, epigenetika.

ABSTRACT

The macroelements contained in food have an important function for the human body. They are involved in several of biochemical reactions in the body and their abundance can prevent serious diseases.

The theoretical part of the bachelor thesis describes the function of minerals in the human body, the function of DNA and epigenetic mechanisms such as DNA methylation or histone modification. The influence of nutrition and function of selected macroelements – sodium, magnesium, calcium, potassium on epigenetic modifications and on the stability of G-quadruplexes was described. The aim of the experimental part of this work was to study the effect of these substances on DNA structures *in vitro* and to prepare them experimentally for *in vivo* studies.

KEY WORDS

Nutrients, G-quadruplex, DNA, epigenetics.

VESELÝ, Zdeněk. *Vliv makroelementů z potravy na DNA a epigenetický profil* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139030>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Václav Brázda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Václavu Brázdovi, PhD. za výborné vedení, ochotu a čas. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Otílii Porubiakové za velkou pomoc, čas, úsilí a ochotu, kterou mi věnovala při zpracování téhle práce.

OBSAH

1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Minerální látky	6
2.2 Epigenetika	7
2.2.1 Epigenetické mechanismy	7
2.2.1.1 Metylace DNA	7
2.2.1.2 Modifikace histonů	8
2.2.2 Úloha výživy v epigenetice	9
2.3 DNA	10
2.4 G-kvadruplexy	11
2.4.1 Vliv kationtů na stabilitu G-kvadruplexů	12
2.4.2 Úloha G-kvadruplexů v epigenetice	12
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
3.1 Seznam vybavení	14
3.1.1 Materiály a metody	14
3.1.2 Chemikálie	15
3.2 Nejčastěji používané termíny	15
3.3 Metody	16
3.3.1 Experimenty <i>in vitro</i>	16
3.3.1.1 ThT test	16
3.3.1.2 Církulárně dichroická spektroskopie	16
3.3.2 Experimenty <i>in vivo</i>	17
3.3.2.1 Testy cytotoxicity	17
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	19
4.1 Experimenty <i>in vitro</i>	19
4.1.1 ThT test	19
4.1.2 Církulární dichroismus	22
4.2 Experimenty <i>in vivo</i>	28
4.2.1 Testy cytotoxicity	28
5 ZÁVĚR	31
ZDROJE	32
6 SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK	38

1 ÚVOD

Správná výživa je řazena mezi faktory, které tvoří zdravý životní styl. Životní styl je způsob života daného jedince. Správně zvolenou stravou se lze vyhnout různým civilizačním chorobám a psychickým poruchám spjaté s příjmem potravy [1]. Jídlo a výživa jsou časté problémy současnosti. Neznalost lidské výživy má za následek řadu moderních onemocnění, nejznámější je metabolický syndrom, charakterizovaný zvýšeným krevním tlakem, cukrovkou, aterosklerózou a kardiovaskulárními chorobami obecně. Současné výživové trendy se rychle mění, například studie vedená kanadskými vědci ukazuje, že mírná konzumace nasycených tuků může snížit riziko cévní mozkové příhody [2].

Uvádí se, že jedno úmrtí z pěti je spojeno s nezdravými stravovacími návyky, jako je například nedostatek živin. Studie z roku 2017 [3] dospěla k závěru, že většina populace nekonzumuje dostatek ořechů, semen, mléka a celozrnných výrobků, zatímco konzumuje příliš mnoho zpracovaného masa s vysokým obsahem sodíku, sladkých jídel a nápojů. Na celém světě ročně zemře na kardiovaskulární onemocnění asi 10 miliónů lidí; 913 000 na nádorové onemocnění a téměř 339 000 na diabetes druhého typu [4]. Opačné chování přehnané péče o výživu a záměrné vyhýbání se nezbytným potravinám a živinám z každodenní stravy si vybírá svou daň. Stravovací návyky vedoucí k neustálým dietním omezením jsou zodpovědné za nárůst výskytu mentální anorexie, ale i nutričních deficitů u dětí s omezenou dietou [5].

Zdravá výživa může být nástrojem v boji proti některým nemocem. Každý musí přemýšlet, co si dá na talíř a kterým surovinám se vyhnout, pro zachování metabolismu a udržení fyziologického a psychického zdraví. Jaký typ výživy doporučit jedinci závisí na jeho fyziologickém stavu, věku a souvisí s osobním životním stylem. Na stravu působí velké množství faktorů. Každý jedinec má určité stravovací návyky, které byly vyvíjeny především v dětství. Tyto návyky se mohou v průběhu let měnit, především kvůli změně způsobu života [6].

U vybraných kationtů kovů byl prokázán vliv na epigenetické modifikace [52] a podílení na biochemických pochodech v lidském těle [7], proto se budeme těmito látkami zabývat v téhle práci. Zejména na jejich vliv na G-kvadruplexovou strukturu DNA. Dále bude zjištěna cytotoxicita rozpouštědla dimetylsulfoxidu vůči vybraným buněčným liniím.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Minerální látky

Minerály sehrávají v lidském těle klíčovou roli při vykonávání nezbytných funkcí – od budování silných kostí po přenos nervových vzruchů – pro zdravý a dlouhý život [7]. Existence řady minerálů může nejen vytvářet různé hormony, ale také může regulovat standardní srdeční funkce. Některé makro- a mikro prvky se vyskytují ve struktuře zubů (Ca, P a F) a kostí (Ca, Mg, Mn, P, B a F), zatímco většina mikro prvků (Cu, Fe, Mn, Mg, Se a Zn) hraje zásadní roli jako strukturální součást mnoha enzymů [7]. Makro prvky (Ca, Mg, P, Na a K) ve srovnání s mikro prvky (I) mají v nervových buňkách mnohem významnější funkce (přenos a signalizace). Přestože mikroelementy hrají klíčovou roli při tvorbě buněk erytrocytů (Co, I a Fe), regulaci hladin glukózy (Cr) a jejich ochraně prostřednictvím aktivace antioxidantních enzymů (Mo), makro minerály jako Ca a K mají vysoký potenciál kontrolovat krevní tlak. Minerály se také účastní imunitního (Ca, Mg, Cu, Se a Zn) a mozkového (Cr a Mn) systému [7].

V posledních letech se velké množství vědeckých a technologických výzkumů soustředilo na překonání minerální podvýživy v průmyslových a rozvojových zemích, protože deficit Fe, Zn, I a Se ve světové populaci představuje přibližně 60, 30, 30 a 15 %, resp. Navíc nedostatek Zn, Fe a I spolu s nedostatkem vitamínu A může vést k ~20% úmrtnosti u dětí mladších 5 let [7]. Nedostatek Fe v těle se projevuje snížením hladin hem proteinů (např. hemoglobinu) a enzymů (s Fe jako kofaktorem) a způsobuje prevalenci anémie nebo snížení množství červených krvinek. Nedostatečný příjem Fe ve stravě může také vést k nižší rychlosti růstu a kognitivních schopností u dětí, většímu počtu poruch během těhotenství a horší pracovní výkonnosti u dospělých. Nedostatek zinku může mít mnoho nepříznivých účinků, jako je růst (ztráta hmotnosti a vlasů), trávení (průjem, ztráta chuti k jídlu a změny chuti) a imunita (odložené hojení ran a vysoká náchylnost k infekcím), sexuální (snížená spermatogeneze, mužský hypogonadismus a impotence) problémy [8]. Nedostatek jódu může také vést ke zvětšení „strumy“ štítné žlázy a odvrátitelné intelektuální neschopnosti [9]. Zvýšená celková úmrtnost byla spojena se špatnou imunitou, výskytem a rozvojem virových onemocnění/infekcí a nezměnitelným poraněním mozku [10].

Přestože celkové množství minerálu v potravině neodráží jeho dostupné množství v těle prostřednictvím absorpce, biologicky dostupné je pouze určité množství [11]. Biologická dostupnost makro a mikro minerálů je definována jako podíl požitého minerálu, který je absorbován a následně využit pro obvyklé fyziologické funkce [12]. Základním pravidlem je, že úroveň biologické dostupnosti je vysoce závislá na trávení, uvolňování z potravinové matrice, rychlosti absorpce cílové složky střevními buňkami a jejím transportním množstvím do buněk [12].

2.2 Epigenetika

Epigenetiku je možné definovat jako somaticky dědičné stavy genové exprese, vyplývající ze změn ve struktuře chromatinu bez změn v sekvenci DNA. Epigenetické modifikace zahrnují metylaci DNA, modifikaci histonů a remodelaci chromatinu [18].

V posledních desíti letech byly epigenetické studie cíleny hlavně na embryonální vývoj, stárnutí a rozvoj rakoviny. V současné době je epigenetika spojována také s obezitou, inzulinovou rezistencí, cukrovkou, kardiovaskulárními nebo neurodegenerativními onemocněními a onemocněními imunitního systému [19].

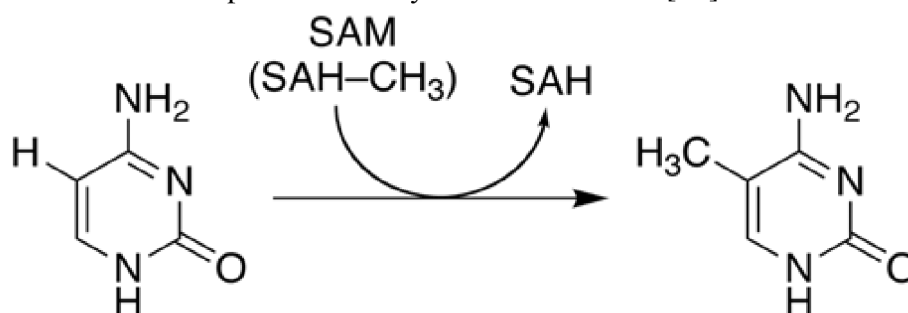
Epigenetické modifikace mohou být ovlivněny vnějšími nebo vnitřními faktory a mají schopnost měnit genovou expresi, proto je epigenetika v současné době považována za důležitý mechanismus v neznámé etiologii mnoha nemocí. Takto vyvolané epigenetické změny mohou být zděděny během buněčného dělení. Epigenetika může poskytnout nové možnosti pro hledání etiologických faktorů, a tedy i embryonálního vývoje a stárnutí [19].

2.2.1 Epigenetické mechanismy

Epigenetické mechanismy hrají důležitou roli v buněčných diferenciacích, z kterých metylace DNA a posttranslační modifikace histonů (acetylace, metylace, fosforylace, ubikvitinace a sumoylace) patří mezi nejdůležitější. Správná funkce těchto mechanismů ovlivňuje další biologické aktivity, jako je regulace genové transkripce, inaktivace X-chromozomů a udržování chromatinových struktur vyššího řádu [22].

2.2.1.1 Metylace DNA

Existuje mnoho epigenetických mechanismů, které mohou řídit genovou expresi. Metylace DNA je jednou z nich a v posledních desetiletích se metylace DNA stala zaměřením různých výzkumů. Metylace DNA má roli v regulaci genové exprese, je také popsána interakce s modifikacemi histonů a implikace s lidskými onemocněními [23].



Obr. 1: Mechanismus metylace DNA. S-Adenosyl methionin (SAM), S-Adenosyl homocystein (SAH) [23].

Pravděpodobně 70 % CpG dinukleotidů v genomu obratlovců je metylováno. DNA methylová skupina je kovalentně přidána pomocí zbytku kofaktoru S-adenosyl-methionin (SAM) do polohy 5 cytosinového zbytku. Reakce je katalyzována DNA metyltransferázami (DNMT). 5-methylcytosin (5mC) je produktem metylace DNA (Obr. 1). Je to jedna z bází

pozorovaná v savčím genomu, která je fyziologicky modifikovaná. DNA je stabilní díky vícenásobnému buněčnému dělení a reverzibilní modifikaci [24; 25].

Metylace DNA je proces, kdy je methylová skupina ze SAM transportována do cytosinových bází v DNA. Proces je katalyzován třemi DNA metyltransferázami DNMT1, DNMT3a, DNMT3b. DNMT jsou cennými regulátory genové transkripce. Bylo zjištěno, že vyšší hladiny exprese DNMT jsou zvýšeny u nádorových onemocnění [26]. Různé modifikace a interakce, které regulují aktivitu DNMT, hrají důležitou roli v regulaci metylace DNA. Existují 2 skupiny metyltransferáz, přičemž první z nich udržuje nebo kopíruje metylaci a druhý se podílí na zprostředkování *de novo* metylačních procesů DNA [27].

DNMT1 je zodpovědný hlavně za udržování metylace DNA. Další hlavní role nastává po replikaci DNA, kdy hlavní řetězec DNA pokračuje v metylaci, ale nově syntetizovaný řetězec nikoli. DNMT1 je připojen k hemimetylované DNA v místech CpG (cytosin-fosfát-guanin) a kopíruje metylační vzory v tomto novém řetězci. DNMT1 je také nezbytný pro správný embryonální vývoj, imprinting nebo inaktivaci X-chromozomu [26].

DNMT3a a DNMT3b jsou *de novo* DNA metyltransferázy, to znamená, že iniciují nové metylační markery na DNA. DNMT3a a DNMT3b nepotřebují k navázání hemimetylovanou DNA. Oba jsou nezbytné pro embryonální vývoj u savců. DNMT3L je enzym, který také patří do této skupiny, ale je katalyticky neaktivní. Tato DNA metyltransferáza může ovlivnit metylaci DNA. Váže se na katalytickou doménu DNMT3a a DNMT3b a reguluje jejich katalytickou aktivitu [28].

Nicméně v několika studiích [27, 28] bylo prokázáno, že DNMT spolupracují během metylace DNA a mohou si navzájem poskytovat své funkce. Například, když je nadměrně exprimován DNMT1, může se podílet na *de novo* metylaci a DNMT3 se může podílet na metylaci a udržovat funkci dalších DNMT.

2.2.1.2 Modifikace histonů

Histony jsou základní proteiny, které se skládají z pozitivně nabitých aminokyselin, obvykle lysinu nebo argininu. Nejznámějšími modifikacemi jsou metylace, acetylace, fosforylace, ubikvitinace a sumoylace. Tyto post-translační modifikace spolupracují na regulaci struktury chromatinu. Struktura chromatinu ovlivňuje biologické procesy včetně genové exprese, opravy DNA a kondenzace chromozomů [30, 31].

Acetylace histonů je vratná reakce. Acetylová skupina je přidána z donorové molekuly acetylkoenzymu A k aminokyselině lysinu na N-konci histonu. Tento krok odstraňuje kladný náboj z lysinu. Reakce je katalyzována histonacetyltransferázami [32].

Acetylace histonů způsobuje, že je chromatin uvolněnější a otevřenější, což má za následek zvýšení přístupnosti pro RNA polymerázu a transkripční faktory, které se vážou na promotorovou oblast genů. To vede k pevnější vazbě transkripčních faktorů a dochází k zvyšování transkripční aktivity. Acetylace histonů narušuje interakci mezi histonem a DNA. Mění také interakce histon-histon a histon-regulační proteiny. Všechny tyto změny mají obrovský vliv na transkripci DNA [31].

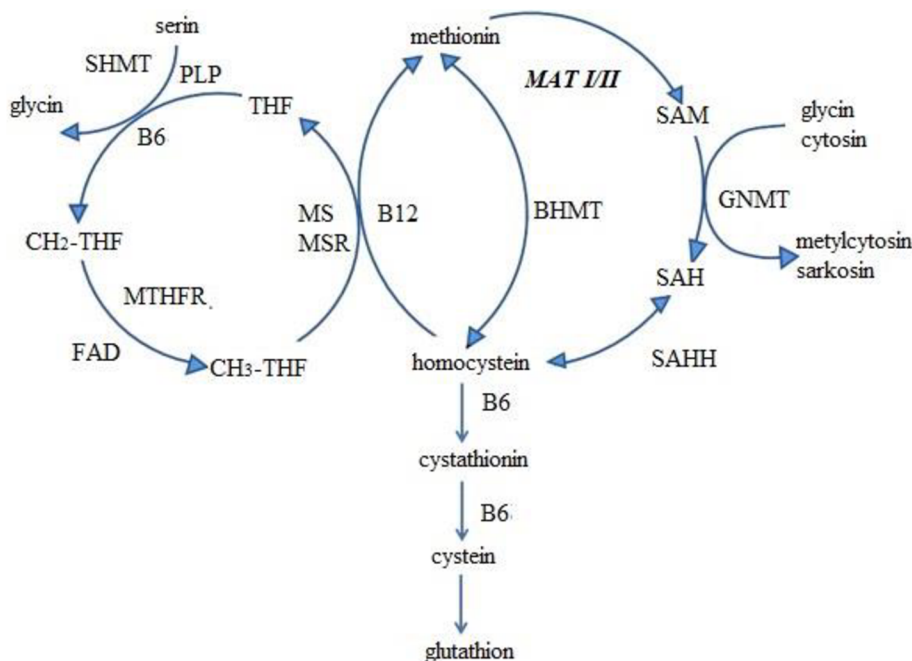
Histonová fosforylace hraje významnou roli v reakci na poškození DNA. Fosforylace histonů v savčích buňkách probíhá na aminokyselině serinu. Fosforylace histonů je důležitou součástí během buněčné odpovědi na poškození DNA, remodelaci chromatinu a regulaci transkripce [31].

Ubikvitinace a sumoylace histonů patří mezi posttranslační modifikace, které jsou nezbytné pro udržení stability genomu a regulaci opravy poškozené DNA. Polypeptidy ubikvitin a protein SUMO (malý signální protein, který vykazuje prostorovou podobnost s ubikvitinem) vázány na histony kovalentně [31].

2.2.2 Úloha výživy v epigenetice

Živiny, které jsou přijímány v potravě, mohou zvrátit nebo způsobit epigenetické jevy, jako je metylace DNA a modifikace histonů, a tím modifikovat expresi genů spojených s fyziologickými a patologickými procesy, včetně embryonálního vývoje, stárnutí a karcinogeneze [20].

V oblasti výživy je epigenetika mimořádně důležitá, protože živiny a bioaktivní složky potravy mohou modifikovat epigenetické jevy a měnit expresi genů na transkripční úrovni. Kyselina listová, vitamín B12, methionin, cholin, a betain mohou ovlivnit metylaci DNA a metylaci histonů prostřednictvím změny jedno uhlíkového (1C) metabolismu (Obr. 2) [20].



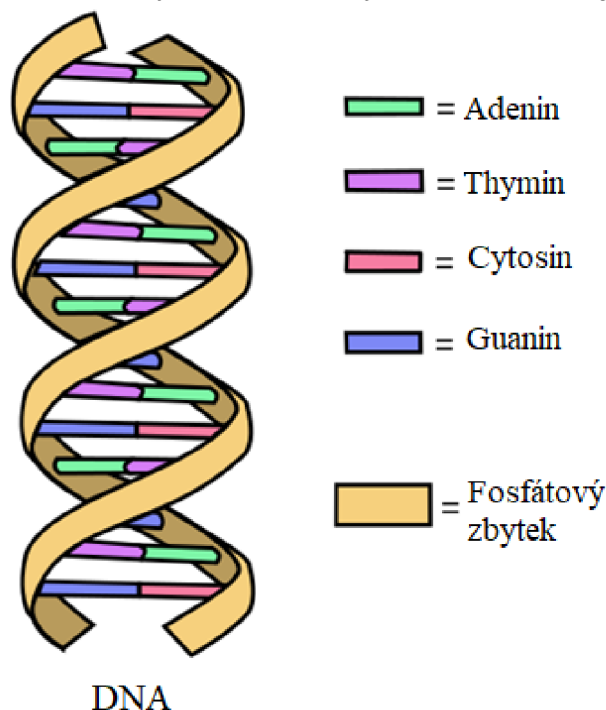
Obr. 2: Schéma jedno uhlíkového metabolismu [62].

Dva metabolity jedno uhlíkového metabolismu mohou ovlivnit metylaci DNA a histonů. SAM, který je donorem metylu pro metylační reakce, a SAH, který je produktovým inhibitorem metyltransferáz. Teoreticky tedy jakákoliv živina, bioaktivní složka nebo stav, který může ovlivnit hladiny SAM nebo SAH ve tkáni, může změnit metylaci DNA a histonů. Další ve vodě rozpustné vitamíny B, jako je biotin, niacin a kyselina pantotenová, také hrají

důležitou roli v modifikacích histonů. Biotin je substrátem histonové biotinylace. Niacin se účastní histonové ADP-ribosylace jako substrát poly(ADP-ribóza)polymerázy a také acetylace histonů jako substrát Sirt1, který funguje jako histondeacetyláza. Kyselina pantotenová je součástí CoA, ten se podílí na vzniku acetyl-CoA, který je zdrojem acetylové skupiny při acetylaci histonů. Bioaktivní složky potravy přímo ovlivňují enzymy zapojené do epigenetických mechanismů. Například genistein a čajový katechin ovlivňují DNA metyltransferázy. Katechiny zeleného čaje modulují metylaci DNA zeslabením účinku DNMT1 [61]. Resveratrol, butyrát, sulforafan a diallylsulfid inhibují HDAC (histon deacetyláza) a kurkumin inhibuje histon acetyltransferázy. Pozměněná enzymatická aktivita těchto sloučenin může ovlivnit fyziologické a patologické procesy během našeho života změnou genové exprese [21].

2.3 DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je molekula, která kóduje genetickou informaci. V jediném organismu má téměř každá buňka přesně stejnou DNA. V roce 1953 James Watson a Francis Crick objevili strukturu DNA [13]. Struktura DNA (Obr. 3) je pravotočivá dvoušroubovice, konstruovaná ze dvou nukleotidových řetězců navinutých kolem sebe. Řetězce se skládají z deoxyribózy, molekuly cukru a 4 dusíkatých bází: dvou purinů (adenin, guanin) a dvou pyrimidinů (thymin, cytosin), které jsou připojeny k molekule cukru fosfátovou skupinou. Specifické je párování dusíkatých bází. Adenin je vždy spárován s thyminem a guanin je spárován s cytosinem. Tyto dva řetězce DNA jsou komplementární, což znamená, že pokud je znám jeden řetězec, může být odvozen druhý. Molekula DNA je záporně nabitá [14].



Obr. 3: Struktura DNA [50].

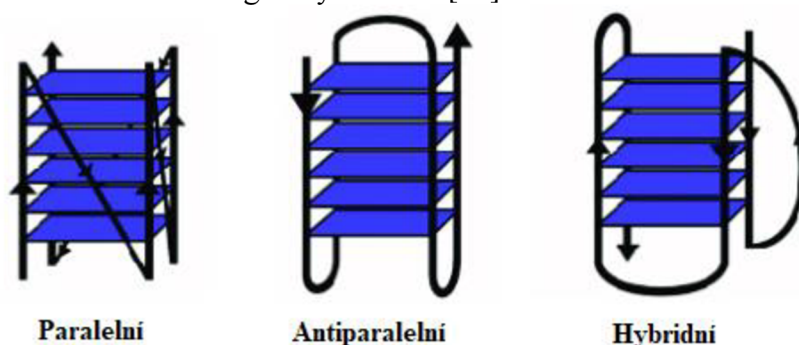
V eukaryotech jsou dlouhé molekuly DNA spojeny se specifickými proteiny a zabaleny do chromozomů. Každý chromozom se skládá z jedné DNA molekuly a komplexu proteinů - histonů, které umožňují DNA zabalit do pevnější struktury. Chromatin je komplex v jádře, tvořený z DNA a proteinů [15].

CpG dinukleotid je sekvence DNA, která se skládá ze dvou nukleotidů, cytosinu a guaninu. Cytosin a guanin jsou spojeny fosfodiesterovou vazbou. V genomu savců je typická mutace dinukleotidu CpG na dinukleotidy TpG (thymin-fosfát-guanin) [16]. Distribuce CpG je nerovnoměrná a většina genomu obratlovců obsahuje méně CpG. CpG dinukleotidy jsou umístěny buď v repetitivních sekvencích, nebo v krátkých sekvencích, které jsou bohaté na CpG. Říká se jim CpG ostrůvky a jsou dlouhé 1 - 2 kb [16]. V lidském genomu existuje asi 30 000 CpG ostrůvků [55]. Jsou umístěny poblíž místa začátku transkripce. V savčích genomech je přibližně 80 % CpG dinukleotidů metylováno. Dinukleotidy v CpG ostrůvcích jsou však obecně nemetylované, to je skutečně důležitý atribut genových promotorů a zprostředkování genové exprese [17].

Nukleové kyseliny mohou tvořit nekanonické struktury, jako jsou triplexy [56], tetraplexy G-kvadruplexů a i-motivová DNA [57]. Triplexy a G-kvadruplexy jsou nejčastěji pozorovány v genech souvisejících s onemocněním a má se za to, že hrají důležitou roli při nástupu a progresi onemocnění [35].

2.4 G-kvadruplexy

G-kvadruplexy (G4) jsou sekundární struktury nukleových kyselin sestávající z naskládaných G-kvartetů. Každý kvartet je tvořen ze čtyř guaninů (G) spojených Hoogsteenovou vodíkovou vazbou. G4 mohou být tvořeny jedním až čtyřmi vlákny bohatými na guaniny a jsou stabilizovány přítomností monovalentních kationtů. Jsou to polymorfní struktury, protože jedna sekvence bohatá na guaniny může přijmout různé konformace G4 v závislosti na experimentálních podmínkách, přilehlých sekvencích, koncentraci, protokolu přípravy nebo na živém organismu. Jedním z nejlepších příkladů je lidská telomerická sekvence, která se může skládat do nejméně 10 různých konformací [34]. Nejčastější konformace jsou znázorněny na obrázku (Obr. 4). Intramolekulární G4 mohou být tvořeny s DNA a RNA; sekvence s potenciálem tvořit struktury G4 se nacházejí v eukaryotických telomerech [34], v promotorech onkogenů [35], v minisatelitech [35] a v 5' a 3' netranslatovaných oblastech messengerových RNA [36].



Obr. 4: Možné konformace G-kvadruplexů [43]

Ne všechny sekvence bohaté na G tvoří stabilní G4, některé sekvence nemusí *in vitro* vytvořit strukturu G4 [37]. Proto je nezbytné experimentálně ověřit, zda tyto sekvence skutečně přijímají tuto strukturu. K dispozici je řada technik, kterými je možné detekovat strukturu G4, jako je stanovení teploty tání [38], tepelná nebo izotermická diferenční spektra [39], nukleární magnetická rezonance a cirkulární dichroismus, ale všechny jsou relativně časově náročné a vyžadují speciální vybavení [40].

2.4.1 Vliv kationtů na stabilitu G-kvadruplexů

Fyziologicky relevantními monovalentními kationty jsou K^+ a Na^+ , které stabilizují strukturu G4. Mezi kationty, které ovlivňují strukturu G4 se řadí zejména monovalentní kationty Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ a Tl^+ a dvojmocné kationty Sr^{2+} , Ba^{2+} a Pb^{2+} , u kterých je známo, že v některých specifických případech stabilizují strukturu G4 [52]. Bylo však pozorováno, že některé dvojmocné kationty narušují strukturu G4, například nízké koncentrace Mn^{2+} , Co^{2+} nebo Ni^{2+} narušují strukturu G4 i v přítomnosti K^+ iontů. Když jsou koncentrace G4 a monovalentních kationtů dostatečně nízké nebo je teplota dostatečně vysoká, mohou dvojmocné kationty, například Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} a Mg^{2+} , vyvolat destabilizaci G4 [53]. Bylo pozorováno, že dvojmocné kationty destabilizují dimerní antiparalelní G4 v následujícím pořadí: $Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ a indukují přechod na paralelní strukturu G4 [52]. Nicméně určité ionty dvojmocných kovů stabilizují G4 více než ostatní, ale takový účinek závisí na struktuře G4 [54].

2.4.2 Úloha G-kvadruplexů v epigenetice

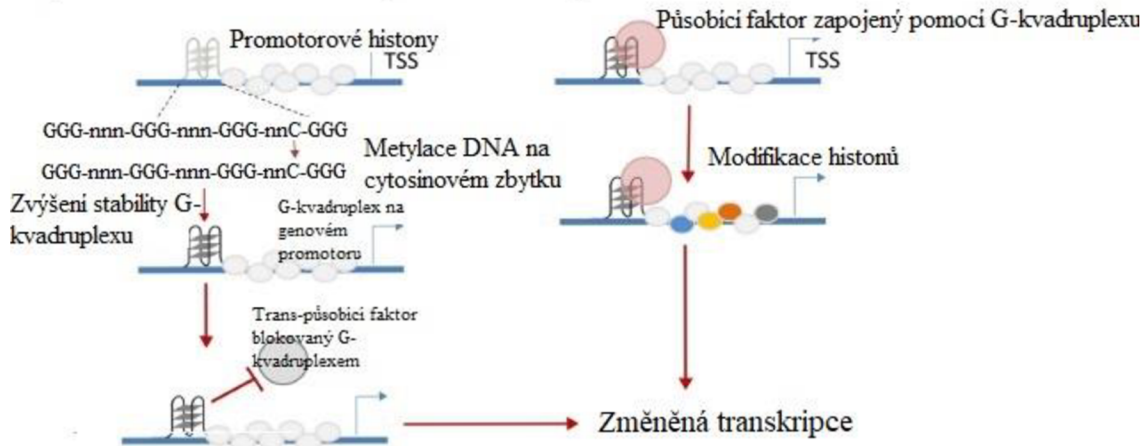
Výskyt struktur G4 v regulačních oblastech, jako jsou promotory a zesilovače (krátké sekvence které mohou být značně vzdáleny od genu, který ovlivňují), může ovlivnit genovou expresi buď pozitivně, nebo negativně, a tím vyvolat změny transkriptomu. Struktury G4 a epigenetické modifikace často kooperují, navzájem se pozitivně ovlivňují a přetvářejí transkripční výstupy genomu [44, 45].

Stabilita struktury G4 může být ovlivněna epigenetickými modifikacemi sekvencí, které tvoří G4 motiv ve stejném řetězci DNA, jako u metylace na 5 uhlíku u 5mC. Lze tvrdit, že spojení mezi stabilitou G4 a metylací cytosinu by mohlo mít relevantní důsledky *in vivo*, zejména proto, že metylace DNA obecně vede k redukcí dostupnosti chromatinu a transkripční aktivity. Výskyt vnitřně stabilních G4 a 5mC je nepřímo příbuzný u promotorů CpG ostrůvků různých lidských buněčných linií a tkání, což silně naznačuje, že G4 jsou epigenetické markery aktivního hypometylovaného chromatinu [46, 47, 48]. Na obrázku (Obr. 5) jsou znázorněny G4 v epigenetických modifikacích.

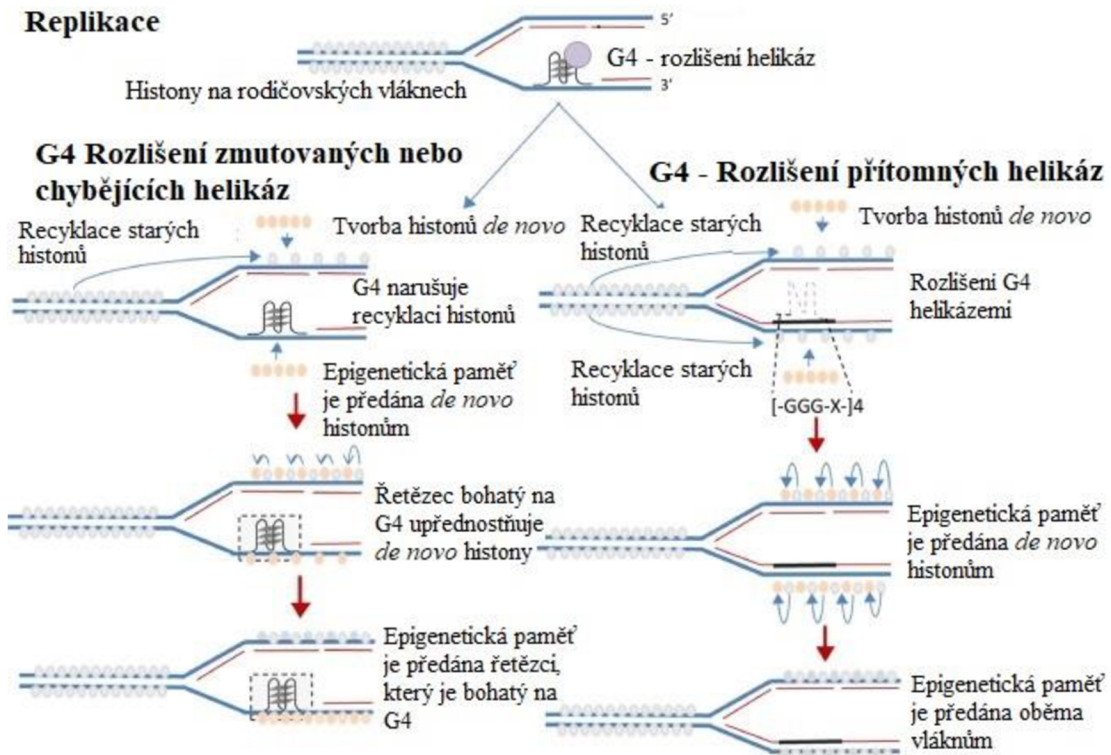
Transkripce

Metylace DNA ovlivňující transkripci zprostředkovanou G-kvadruplexem

Struktury G-kvadruplexů ovlivňují transkripci prostřednictvím modifikací histonů



Replikace



Obr. 5: G-kvadruplexy v epigenetických modifikacích [49].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam vybavení

3.1.1 Materiály a metody

- Analytické váhy (A&D INSTRUMENTS LTD)
- Laboratorní váhy (OHAUS)
- Mikrozkušavky 1,5 ml (EPPENDORF)
- CD spektrometr (JASCO INTERNATIONAL CO.)
- Flow-box (TELSTAR)
- Vortex (IKA)
- Inkubátor (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC)
- Automatická pipeta 0-2 μ l, 1-10 μ l, 1-20 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l (EPPENDORF)
- Kultivační láhev
- 96 jamková destička
- 384 jamková destička
- Jednorázové sterilní pipety 5, 10, 25 ml (VWR)
- Optický mikroskop
- Bürkerova komůrka
- Petriho miska
- Vícekanálková pipeta (GILSON)
- Výsledky byly vyhodnocené pomocí programu Graphpad Prism 9

3.1.2 Chemikálie

- Destilovaná sterilní voda (MiliQ)
- 100% DMSO (SIGMA ALDRICH)
- Trypsin (SIGMA ALDRICH)
- Médium (SIGMA ALDRICH)
- PBS - fosfátový pufr (SIGMA ALDRICH)
- AlamarBlue HS Cell Viability Reagent (THERMO FISHER)
- Tris-HCl (SIGMA ALDRICH)
- KCl (SIGMA ALDRICH)
- NaCl (SIGMA ALDRICH)
- CaCl₂ (SIGMA ALDRICH)
- MgCl₂ (SIGMA ALDRICH)
- Glutamin (SIGMA ALDRICH)
- 1x Penicilin-Streptomycin (SIGMA ALDRICH)

3.2 Nejčastěji používané termíny

H1299: Lidská buněčná linie plicního karcinomu odvozená z lymfatických uzlin [58].

HDF164: Lidské dermální fibroblasty.

MCF-7: Buněčná linie lidského karcinomu prsu s estrogenovými, progesteronovými a glukokortikoidními receptory [59].

Médium: Medium používané pro měření bylo připraveno z „DMEM High Glucose“ media (SIGMA ALDRICH), s obsahem 4 mM glutaminu a 10% FBS. Pro nádorové buňky bylo do média přidáváno antibiotikum 1x Penicilin/Streptomycin (SIGMA ALDRICH).

Trypsin: Jedná se o enzym, který slouží k uvolnění buněk z povrchu kultivační nádoby.

Laminární box: Box určený pro sterilní práci s neustálou cirkulací a odvodem vzduchu. Před, a po každém použití bylo nutné box sterilizovat pomocí UV světla a to nejméně 30 minut. Vše, co se do boxu vkládalo, bylo ošetřeno 70% etanolem pro zajištění sterility.

Inkubátor: Pro každou inkubaci buněk byl požit inkubátor se stálou teplotou 37°C (s odchylkou 0,2 °C), vlhkostí 5 % a 5 % CO₂.

Dimetylsulfoxid: DMSO je amfipatické rozpouštědlo, které je rozpustné ve vodě i v organických látkách. Často se používá k rozpouštění hydrofobních látek využívaných v biologickém výzkumu [64].

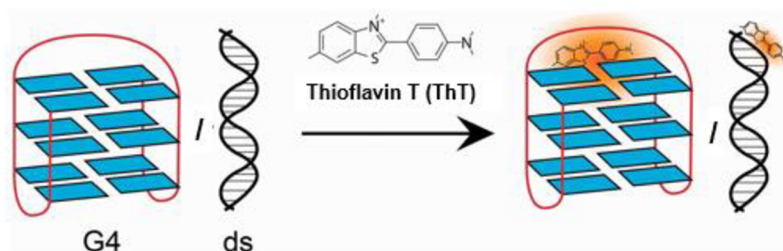
3.3 Metody

3.3.1 Experimenty *in vitro*

3.3.1.1 ThT test

Thioflavin T je benzothiazolové barvivo, které po navázání na amyloidní fibrily vykazuje zvýšenou fluorescenci a běžně se používá k diagnostice amyloidních fibril, jak *ex vivo*, tak *in vitro* [41].

ThT se přidává k předem připravené struktuře nukleové kyseliny v prostředí Tris-HCl. Po specifickém navázání ThT na G-kvadruplex, vykazuje zesílený fluorescenční signál. Může se vázat jak na jednovláknové tak na dvouvláknové oligonukleotidy se slabším fluorescenčním signálem, než v případě G4 [40]. Princip testu je znázorněn na obrázku (Obr. 6).



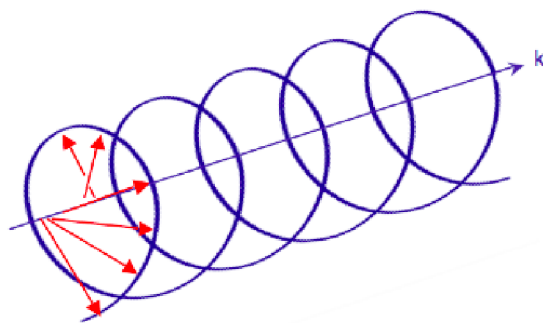
Obr. 6: Princip ThT testu [40].

Syntetické oligonukleotidy byly zředěny vodou na koncentraci 100 μM . Následně byly oligonukleotidy zředěny ve 400 mM Tris-HCl a 1M roztocích vybraných látek (NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 rozpuštěných ve vodě). Výsledná koncentrace takto připravených vzorků odpovídala 2 μM DNA, 100mM Tris-HCl s přídatkem 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128 mM vybraných látek. Stejným postupem byly připraveny vzorky obsahující DMSO o obsahu 2, 4, 6, 12, 24 a 50 %. Vzorky byly zahřívány po dobu 5 minut při 95 $^\circ\text{C}$ a poté ponechány k samovolnému ochlazení na laboratorní teplotu během 24 hodin. Thioflavin T byl zředěn vodou na konečnou koncentraci 1 μM .

Experiment byl prováděn v černé 384-jamkové destičce při laboratorní teplotě. Vzorky syntetických oligonukleotidů a ThT byly smíchány v poměru 1:1, v konečném objemu 20 μl a v molárním poměru 1:0,5 pro oligonukleotid a ThT, s přídatkem vybraných látek a DMSO. Fluorescenční emise byly měřeny při 490 nm po excitaci při 425 nm.

3.3.1.2 Cirkulárně dichroická spektroskopie

Cirkulární dichroismus představuje metodu absorpční spektroskopie založenou na diferenciální absorpci levotočivého a pravotočivého polarizovaného světla, pro studium struktur G-kvadruplexů. Opticky aktivní chirální molekuly přednostně absorbují jeden směr polarizovaného světla. Rozdíl v absorpci levého a pravého kruhově polarizovaného světla lze měřit a kvantifikovat. Cirkulárně dichroická spektroskopie se používá k určení aspektů sekundární struktury proteinu [42]. Schéma kruhově polarizovaného světla je znázorněno na obrázku (Obr. 7).



Obr. 7. – Schéma lineárně polarizovaného a kruhově polarizovaného světla [42].

CD spektra byla měřena na dichrografu Jasco 815 v mikrokyvetách při 20 °C. Vzorky syntetických oligonukleotidů byly naředěny pufr Tris-HCl na koncentraci 6×10^{-5} M. Následně byly mikrokyvety s připravenými vzorky syntetických oligonukleotidů (hTEL – telomerická sekvence) zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly pipetovány do mikrokyvet s výsledným objemem 220 μ l. Pro každý vzorek byla pořízena řada čtyř skenů v rozsahu vlnových délek 240–320 nm. Skeny byly zprůměrovány, vyhlazeny a bylo odečteno reakční prostředí. Nejprve byl změřen pufr Tris-HCl, následně roztok obsahující pouze syntetický oligonukleotid a poté byly přidávány roztoky vybraných látek v molárním poměru 0,1; 1; 2; 3; 4; 5 k DNA (1,18 μ M v 1ml).

3.3.2 Experimenty *in vivo*

3.3.2.1 Testy cytotoxicity

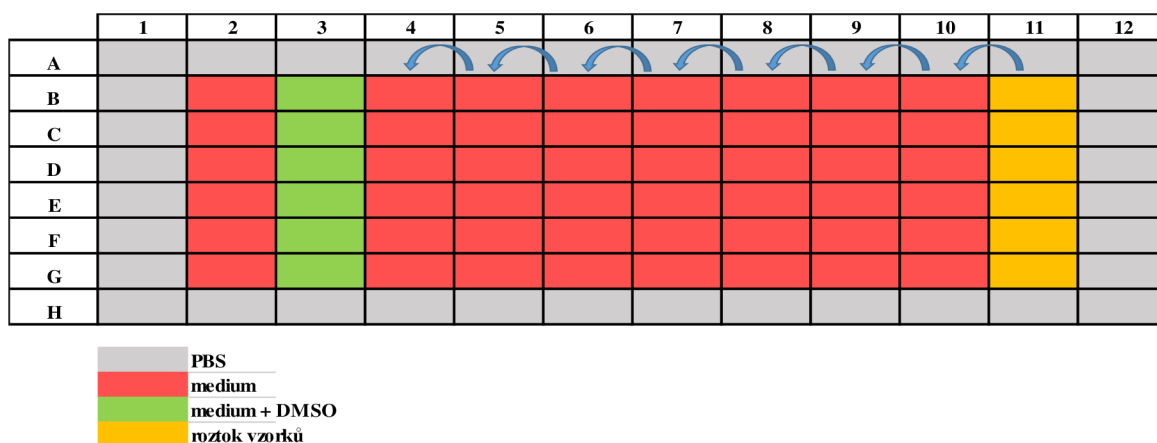
Činidlo AlamarBlue se používá ke kvantitativnímu měření viability savčích buněčných linií, bakterií a hub. Barvivo obsahuje fluorescenční indikátor oxidace-redukce (REDOX), který způsobuje změnu barvy v reakci na chemickou redukci růstového média v důsledku buněčné proliferace [51].

Barvivo AlamarBlue (resazurin) je ve své oxidované formě modré a nefluorescenční. Při jeho použití způsobují rostoucí buňky chemickou redukci barviva z nefluorescenční modré na červenou fluorescenční. Pokračující růst životaschopných buněk udržuje redukční prostředí (fluorescenční, červená) a inhibice růstu udržuje oxidované prostředí (nefluorescenční, modré), které lze detekovat pomocí fluorescenčního nebo absorpčního detektoru [51].

Pro test viability jednotlivých buněčných linií bylo vybráno rozpouštědlo DMSO. Účinky DMSO na buněčné funkce byly v minulosti studovány u velkého počtu buněk, ale s různými výsledky. Některé studie ukázaly, že DMSO blokuje vzestup intracelulárního vápníku [63], jiné studie uvedly, že DMSO způsobuje zvýšení extracelulárního sodíku, draslíku a vápníku [63]. DMSO má různé účinky na iontové transportéry a pumpy [63]. DMSO je často používáno v biologických výzkumech jako rozpouštědlo [64], proto byl zkoumán jeho vliv na vybrané buněčné linie.

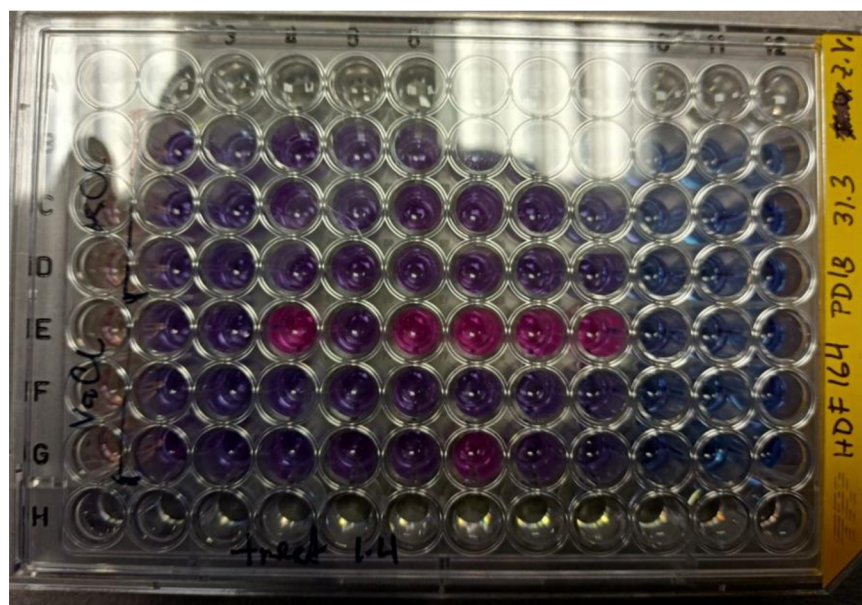
Pro testy byly použity buněčné linie H1299, MCF-7 a HDF164. Do 96-jamkových destiček bylo pipetováno medium s danou buněčnou kulturou, s výsledným objemem 70 μ l v jedné jamce a o koncentraci 3 500 buněk/cm². Do druhého sloupce bylo přidáno medium a do třetího

sloupce byl přidán roztok media a 1% DMSO. Krajiní jamky destičky byly zaplněny puřem 1x PBS v objemu 300 μ l, k zabránění odpařeni vzorků při dlouhodobé inkubaci. Destička byla vložena do inkubátoru na 24 hodin. Následující den bylo medium vyměněno. Do posledního sloupce byly pipetovány vzorky DMSO naředěného v médiu na 11,11 % a o objemu 140 μ l. Následně byl objem 70 μ l z posledního sloupce pipetován do předchozích sloupců, čímž byly jednotlivé sloupce naředěny vždy v poměru 1:1 (výsledné koncentrace v jednotlivých sloupcích byly 0; 0,08; 0,17; 0,35; 0,69; 1,39; 2,78; 5,55; 11,11 % ve směru z leva doprava).



Obr. 8. – Schéma 96-jamkové destičky

Následně byla destička vložena do inkubátoru na 72 hodin. Poté bylo odsáto veřkeré médium a 1x PBS z posledního a prvního sloupce. Do prvního sloupce bylo pipetováno 100 μ l média a do ostatních jamek bylo pipetováno 100 μ l roztoku AlamarBlue s médiem v poměru 1:11. Následně byla měřena fluorescence při vlnové délce 595 nm po excitaci při 555 nm v čase 0 hodin a v čase 2 hodiny.



Obr. 9. – 96-jamková destička naplněná činidlem AlamarBlue

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Experimenty *in vitro*

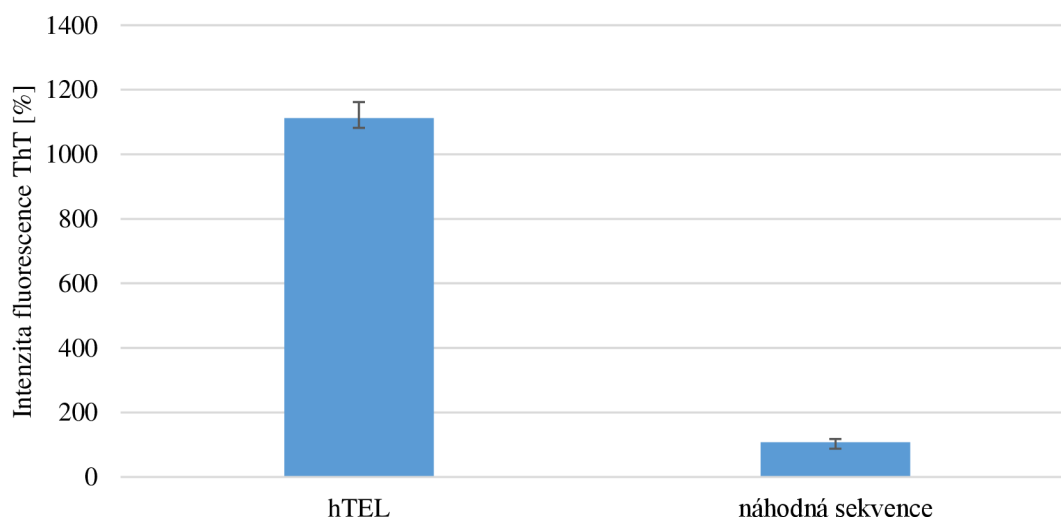
4.1.1 ThT test

Pro ThT test byly použity dva vybrané oligonukleotidy, telomerická sekvence (hTEL) a náhodná sekvence (Tabulka 1.) s různými přísadkami vybraných látek k ověření interakce s přítomnou G4 strukturou. Dále byla ověřena interakce mezi DMSO a přítomným G4. Thioflavin T je benzothiazolové barvivo, které se přidává do připravené struktury nukleové kyseliny a po navázání na G4 vykazuje zvýšenou fluorescenci [40, 41].

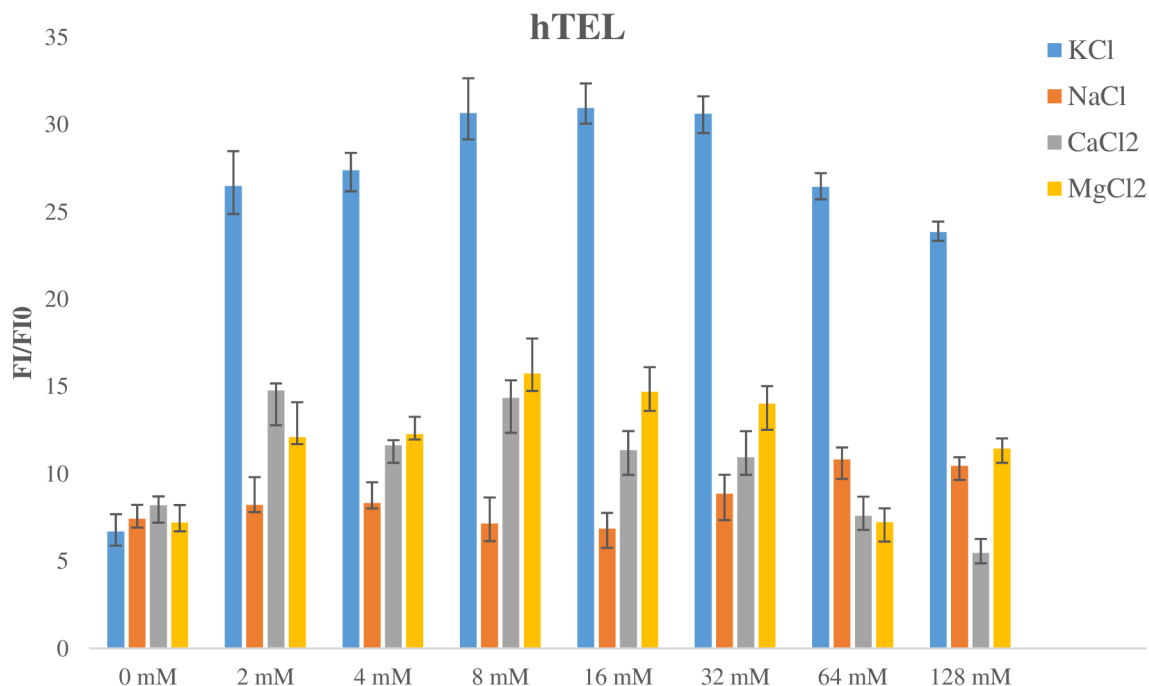
Tabulka 1. Použité oligonukleotidy charakterizovány jejich sekvencí a délkou [nt].

	Sekvence	Délka [nt]
hTEL	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG G	51
Náhodná sekvence	ACCAGAGCTGATGGTATCCTAAGTTGACGACCCCGAGGGTGCCGCAAGGA	50

Byl testován syntetický oligonukleotid hTEL a náhodná sekvence. Náhodná sekvence neobsahuje G4, a proto po přidání ThT nedošlo k jeho navázání k cílovému místu. Díky tomu interakce ThT a náhodné sekvence vykazuje zanedbatelný signál oproti oligonukleotidu hTEL, který G4 motiv obsahuje. Při interakci ThT se sekvencí hTEL docházelo k 89 % navýšení signálu v porovnání s negativní kontrolou (náhodná sekvence). Průměrné hodnoty pro sekvence s přidáním ThT jsou znázorněny v grafu (Graf 1).

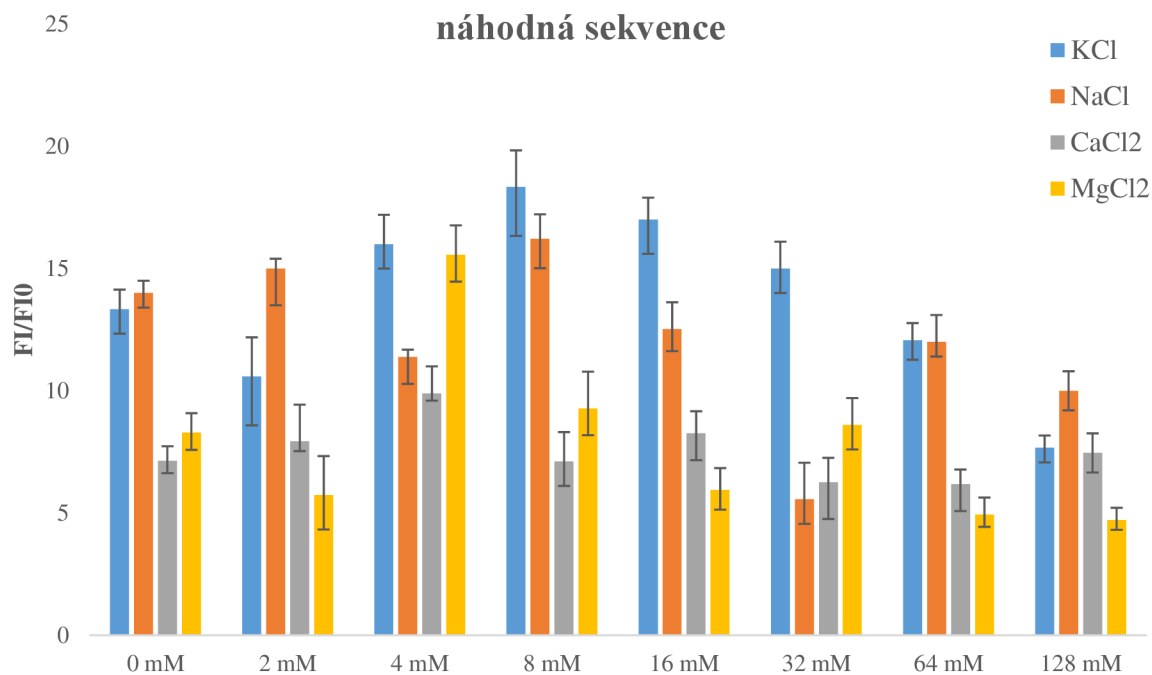


Graf 1: ThT test pro syntetický oligonukleotid hTEL a náhodnou sekvenci. Fluorescenční emise byly měřeny při 490 nm po excitaci při 425 nm. Na histogramu jsou vyznačeny směrodatné odchylky z 3 opakování.



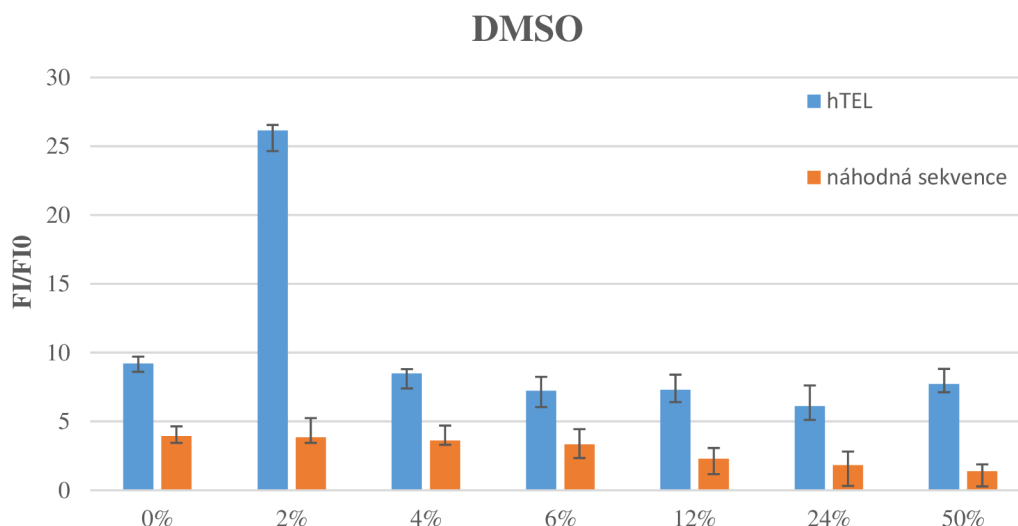
Graf 2: ThT kompetiční test pro syntetický oligonukleotid hTEL a vybrané látky chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, chlorid hořečnatý. Látky byly přidávány v 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128 mM koncentracích. Intenzita fluorescence (FI) je vyjádřena poměrem intenzity fluorescence vybrané látky o dané koncentraci k intenzitě fluorescence pufru Tris-HCl s ThT (FI0). V grafu jsou zaznamenány směrodatné odchylky z 3 opakování.

U oligonukleotidu hTEL (Graf 2), který obsahuje G4 motiv, je vidět zvýšení fluorescenčního signálu po přidavku zvyšující se koncentrace látky KCl, kde již od přidavku nejmenší koncentrace, 2 mM, je vidět znatelný nárůst fluorescence. V porovnání s negativní kontrolou (0 mM) dochází u koncentrace 2 mM ke zvýšení fluorescenčního signálu o 78 %. U látek CaCl₂ a MgCl₂ je viditelné malé zvýšení fluorescenčního signálu a u látky NaCl je vidět nárůst signálu jen při koncentracích 64 a 128 mM. Z grafu lze vyvodit, že KCl nejlépe stabilizuje tvorbu G4 a to už při nízkých koncentracích. Intenzita fluorescence je vyjádřena poměrem intenzity fluorescence (FI) vybrané látky o dané koncentraci k intenzitě fluorescence pufru Tris-HCl s ThT (FI0).



Graf 3: ThT test pro náhodnou sekvenci a vybrané látky NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂. Látky byly přidávány v 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128 mM koncentracích. Intenzita fluorescence (FI) je vyjádřena poměrem intenzity fluorescence vybrané látky o dané koncentraci k intenzitě fluorescence pufru Tris-HCl s ThT (FI₀). V grafu jsou zaznamenány směrodatné odchylky z 3 opakování.

Náhodná sekvence neobsahuje G4 motiv a nemůže tedy docházet k stabilizaci tvorby G4. Se zvyšující se koncentrací vybraných látek docházelo pouze k mírné změně intenzity fluorescenčního signálu (Graf 3). Intenzita fluorescence je vyjádřena poměrem intenzity fluorescence (FI) vybrané látky o dané koncentraci k intenzitě fluorescence pufru Tris-HCl s ThT (FI₀). Zatímco přidavek KCl u sekvence hTEL vedl k zvýšení fluorescence o 78 %, tak přidavek u této sekvence nevedl k významným změnám v detekované fluorescenci.



Graf 4: ThT test pro náhodnou sekvenci a syntetický oligonukleotid hTEL za přidavku 0, 2, 4, 6, 12, 24, 50% DMSO. Intenzita fluorescence je vyjádřena poměrem intenzity fluorescence (FI) vybrané látky o dané koncentraci k intenzitě fluorescence pufru Tris-HCl s ThT (FI0). V grafu jsou zaznamenány směrodatné odchylky z 3 opakování.

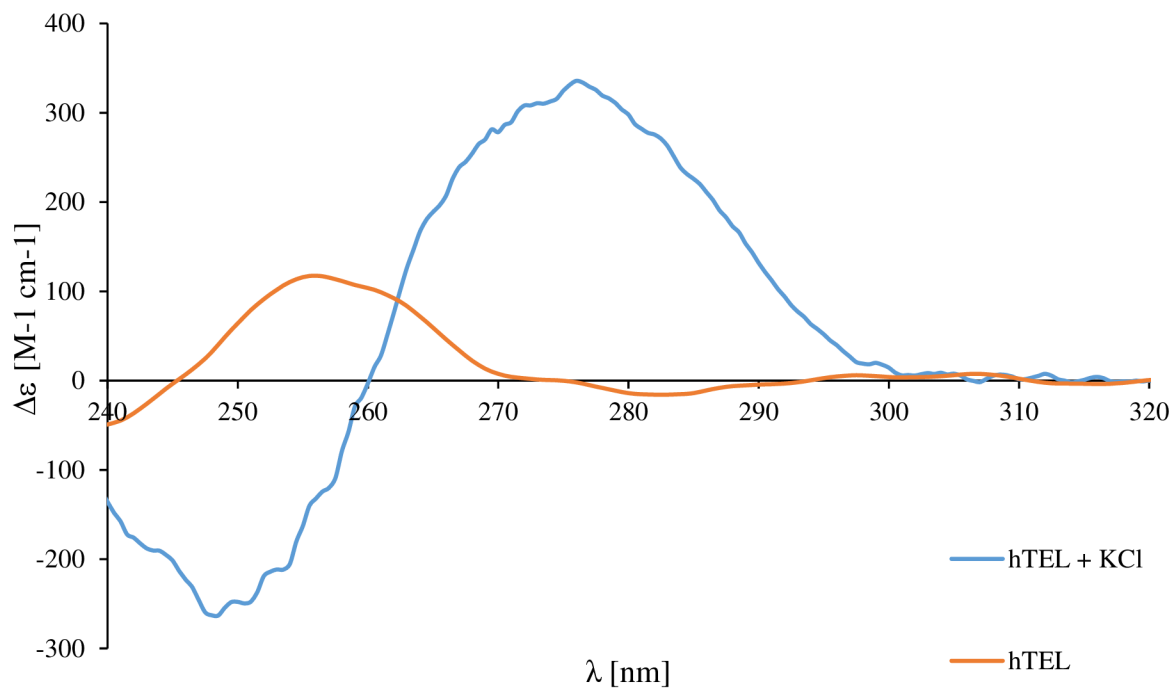
ThT test byl proveden i pro rozpouštědlo DMSO, jako kontrolu, zda dokáže rozpouštědlo používané běžně v biologických výzkumech ovlivnit G4 strukturu. Z grafu (Graf 4) je zřejmé, že G4 struktura se tvořila pouze v přítomnosti 2% DMSO. U ostatních koncentrací a u náhodné sekvence nedocházelo k výrazným změnám ve fluorescenci. Intenzita fluorescence je vyjádřena poměrem intenzity fluorescence (FI) vybrané látky o dané koncentraci k intenzitě fluorescence pufru Tris-HCl s ThT (FI0).

Z vybraných látek byla potvrzena nejlepší tvorba G-kvadruplexů při přítomnosti KCl, jak je vidět v grafu 2. U látky KCl byl znát nárůst fluorescenčního signálu již od nejmenší koncentrace. KCl se běžně používá jako stabilizátor G4 struktur. U ostatních vybraných látek nebyla indukována tvorba G-kvadruplexů tak efektivně jako u KCl. Vyšší koncentrace DMSO nevedly ke zvýšení fluorescenčního signálu.

4.1.2 Cirkulární dichroismus

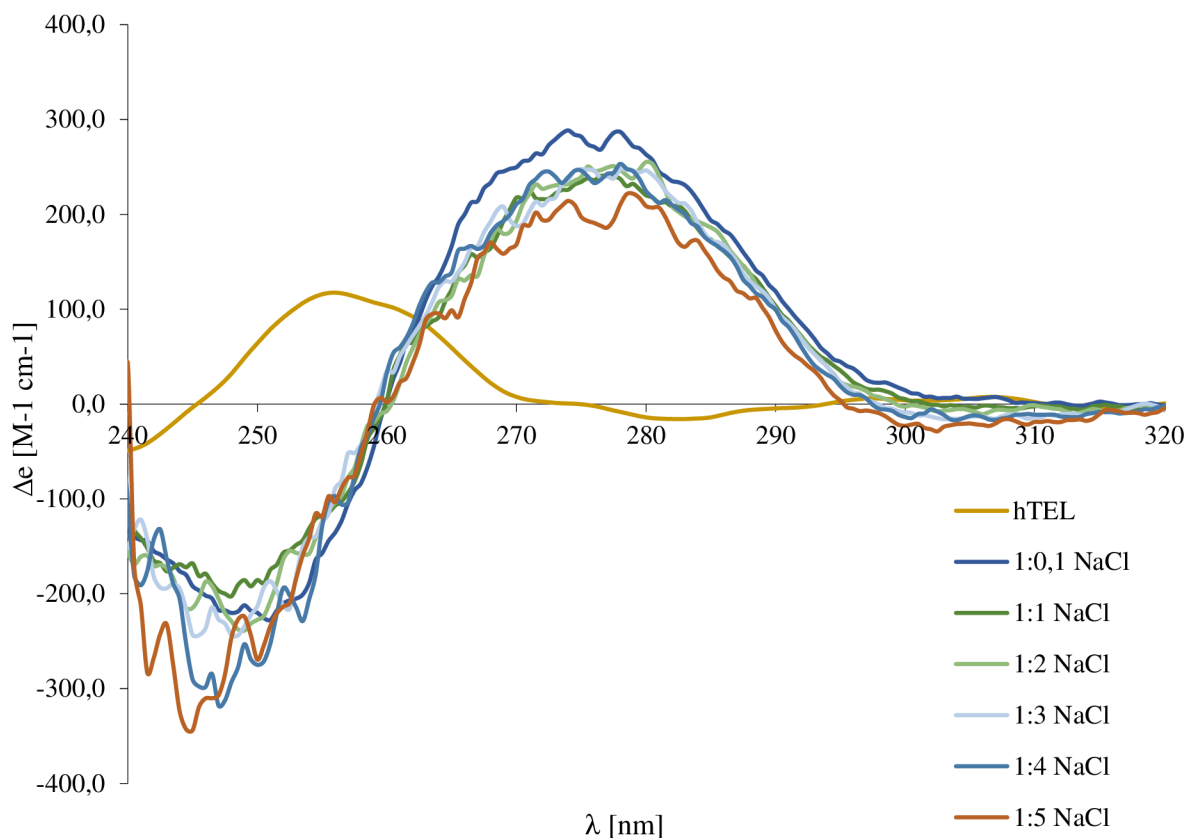
Pomocí CD spektroskopie byla studována konformace DNA za působení vybraných látek (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂).

Syntetické oligonukleotidy byly naředěny v pufru Tris-HCl s nebo bez přidavku KCl, zahřáty na 95 °C a následně ponechány k samovolnému ochlazení. Výsledky pro syntetický oligonukleotid hTEL a hTEL s přidavkem KCl jsou zobrazeny v grafu (Graf 5).



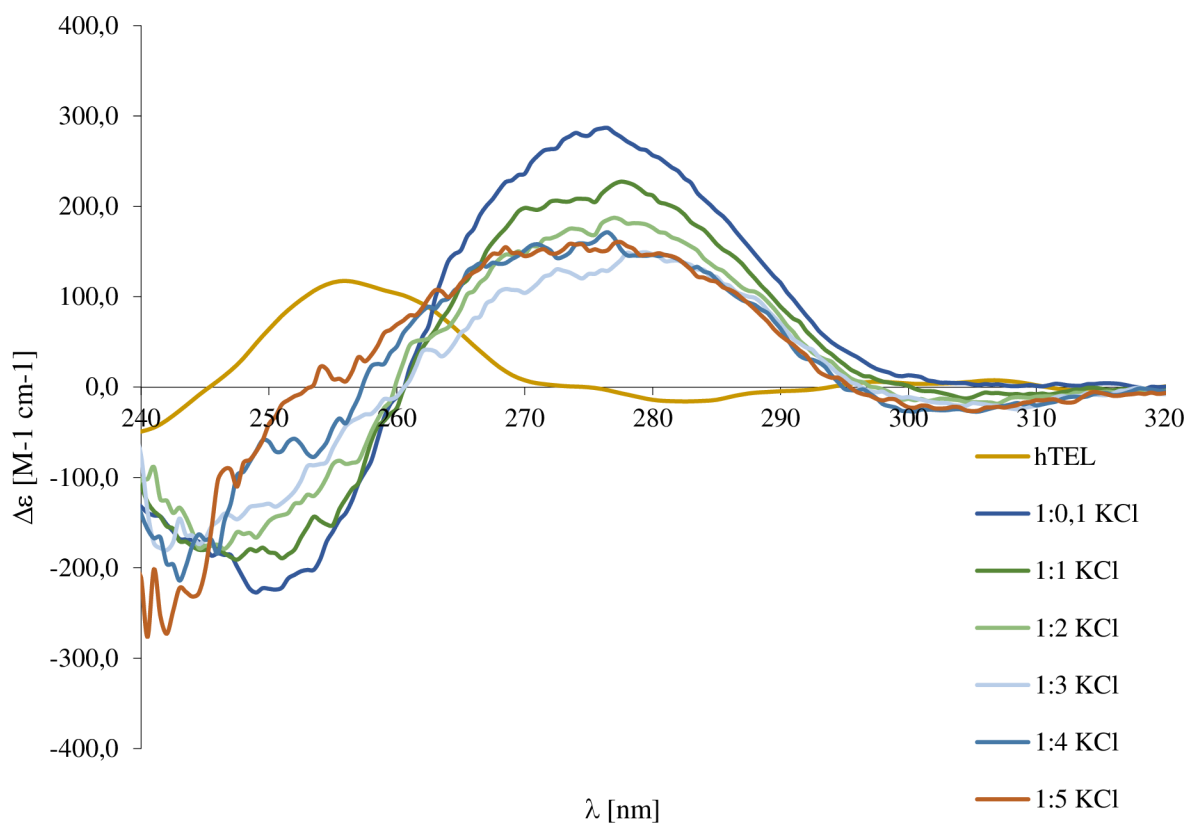
Graf 5: CD spektroskopie DNA u syntetického oligonukleotidu hTEL a jeho stabilizace pomocí KCl. Nukleotid hTEL bez přídavku KCl nevykazuje G4 konformaci. Nukleotid hTEL s přídavkem KCl vykazuje antiparalelní konformaci (negativní pík při 245 nm, pozitivní pík při 275 nm).

DNA sekvence hTEL s přídavkem KCl (Graf 5) stabilizuje G4 antiparalelní konformaci této DNA. V dalším experimentu byly přidávány vybrané látky k DNA v poměru 1:0,1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5. Po každém přídavku byl vzorek proměřen.



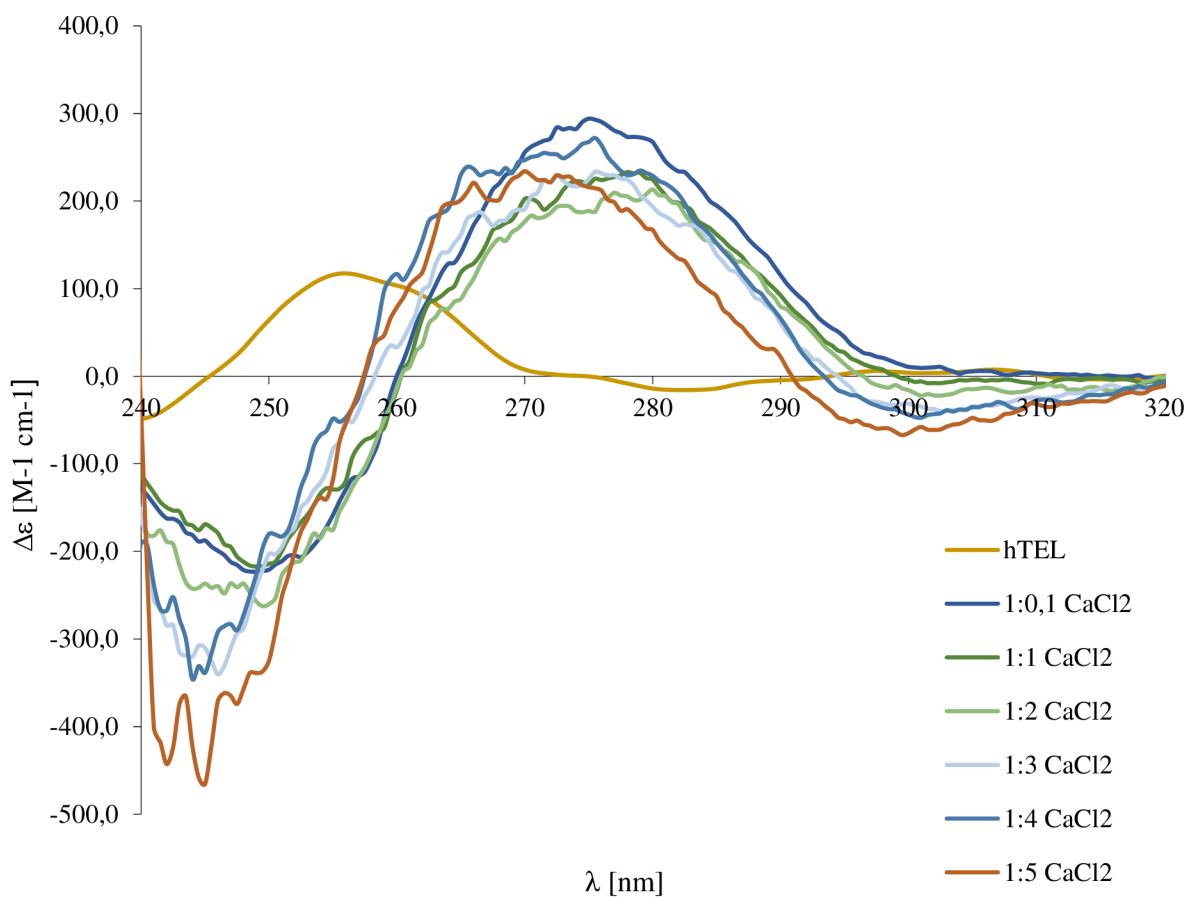
Graf 6: CD spektra G4 u oligonukleotidu hTEL a hTEL s přidavky vybraných vzorků v molárním poměru k DNA – 1:0,1 NaCl; 1:1 NaCl; 1:2 NaCl; 1:2 NaCl; 1:4 NaCl; 1:5 NaCl.

Po přidavku 1:0,1 roztoku NaCl k DNA vykazuje sekvence hTEL antiparalelní konformaci a lze pozorovat výrazný posun negativního i pozitivního píku. Z toho lze usoudit, že NaCl stabilizuje antiparalelní konformaci oligonukleotidu hTEL. Po přidání většího množství roztoku NaCl je vidět mírný pokles negativního i pozitivního píku. V testu ThT látka NaCl vykazovala mírné zvýšení fluorescenčního signálu až od přidavku 64 mM, ale je dostatečně silná pro působení jako stabilizátor G4, jak lze vidět v grafu. (Graf 6).



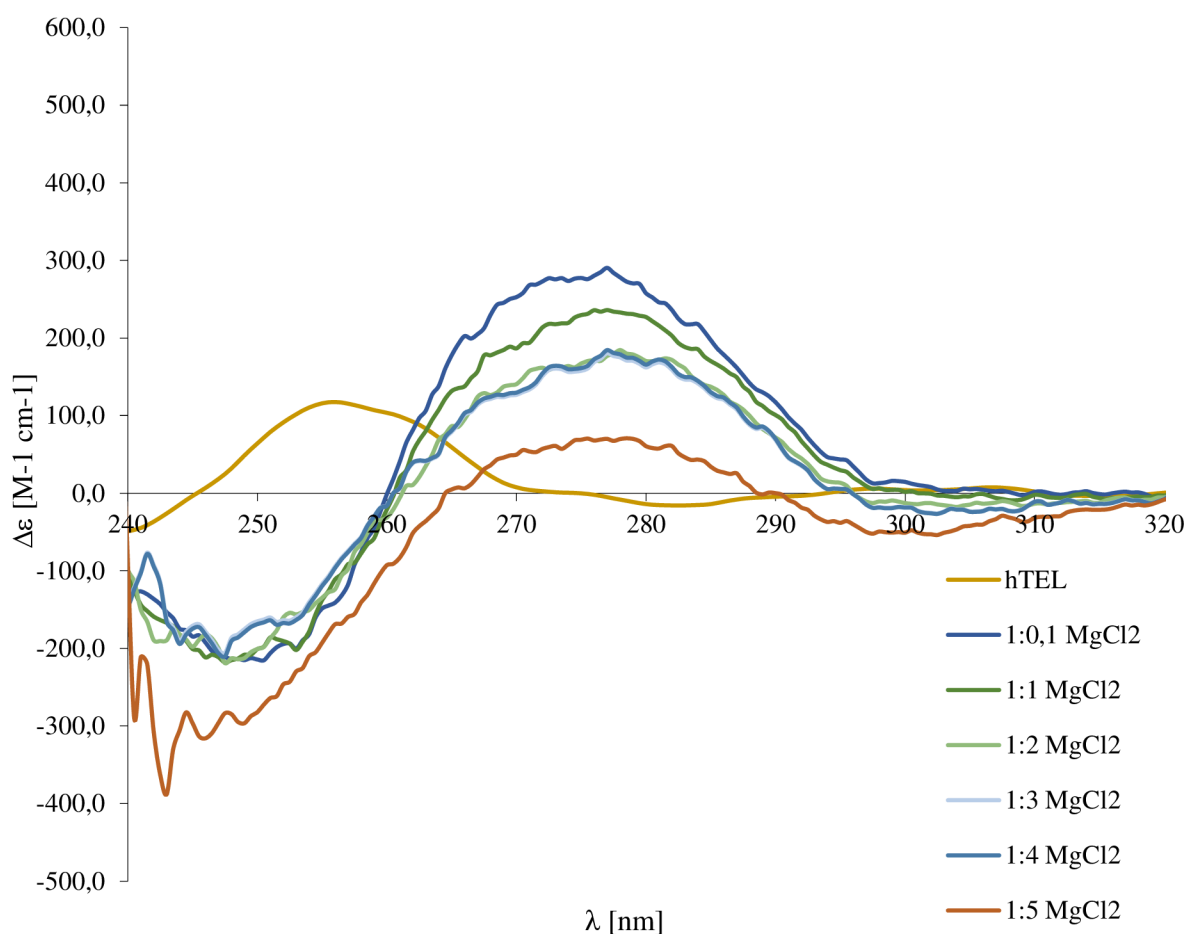
Graf 7: CD spektra G4 u oligonukleotidu hTEL a hTEL s přidavky vybraných vzorků v molárním poměru k DNA – 1:0,1 KCl; 1:1 KCl; 1:2 KCl; 1:2 KCl; 1:4 KCl; 1:5 KCl.

Po přidání roztoku KCl k syntetickému oligonukleotidu hTEL lze vidět posunutí negativního píku i pozitivního píku do antiparalelní konformace. Pro nejlepší stabilizaci se jeví poměr 1:0,1 oligonukleotidu s KCl (Graf 7). Látka má vysoký vliv na stabilizaci už v menších poměrech.



Graf 8: CD spektra G4 u oligonukleotidu hTEL a hTEL s přidavky vybraných vzorků v molárním poměru k DNA – 1:0,1 CaCl₂; 1:1 CaCl₂; 1:2 CaCl₂; 1:3 CaCl₂; 1:4 CaCl₂; 1:5 CaCl₂.

Po přidavku roztoku CaCl₂ k syntetickému oligonukleotidu lze pozorovat výrazný posun negativního i pozitivního píku do antiparalelní konformace (Graf 8). Jako nejlepší poměr pro stabilizaci G4 v hTEL se jeví 1:0,1 oligonukleotidu s CaCl₂.



Graf 9: CD spektra G4 u oligonukleotidu hTEL a hTEL s přidavky vybraných vzorků v molárním poměru k DNA – 1:0,1 MgCl₂; 1:1 MgCl₂; 1:2 MgCl₂; 1:2 MgCl₂; 1:4 MgCl₂; 1:5 MgCl₂.

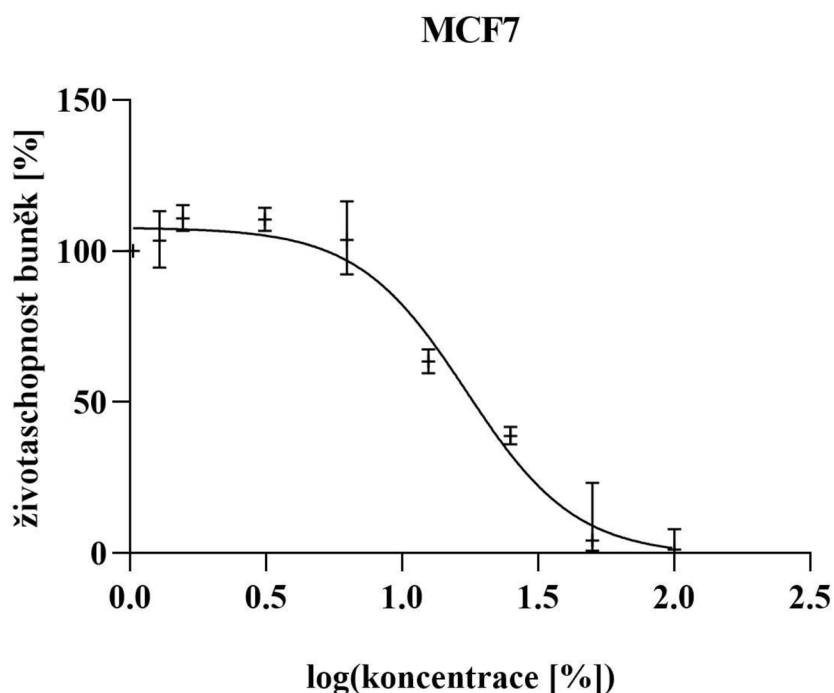
Po přidavku roztoku MgCl₂ k syntetickému oligonukleotidu lze pozorovat výrazný posun negativního i pozitivního píku antiparalelní konformace. Jako nejlepší poměr pro stabilizaci G4 v hTEL se jeví už nejmenší přidavek MgCl₂ (Graf 9).

U všech vybraných látek byl během CD spektroskopie pozorován posun píku do konformace typického pro G4, z toho lze usoudit, že všechny vybrané látky dokážou stabilizovat struktury G4. V testu ThT bylo zjištěno, že nejlépe stabilizuje tvorbu G4 látka KCl, kde byl velký nárůst fluorescenčního signálu už od nejmenší koncentrace. U látek CaCl₂ a MgCl₂ byl pozorován mírný nárůst fluorescenčního signálu a u látky NaCl byl vidět nárůst až od koncentrace 64 mM.

4.2 Experimenty *in vivo*

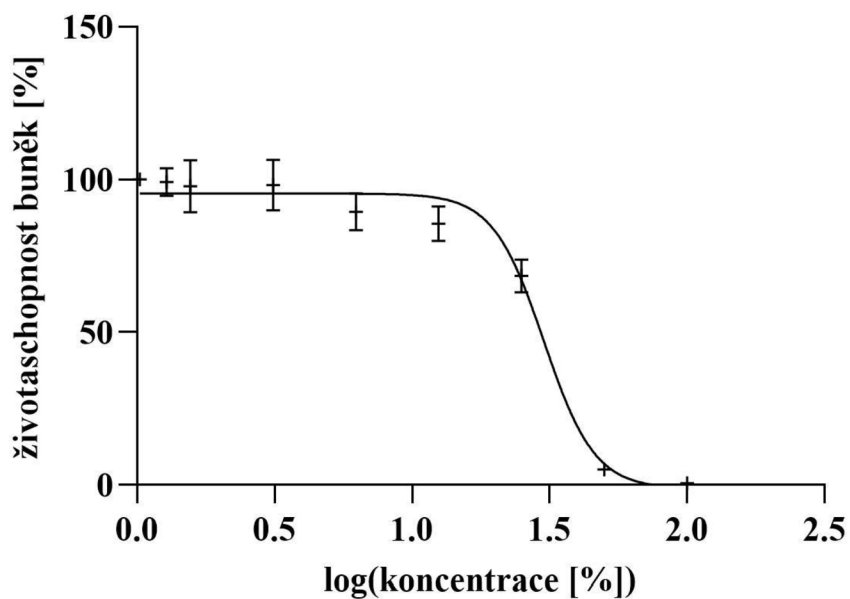
4.2.1 Testy cytotoxicity

Primárním krokem při testování viability lidských buněk, HDF164, H1299 a MCF-7, bylo zjistit letální dávku DMSO pro 50 % buněk (LD50). Byl využit spektrofotometrický test viability pomocí AlamarBlue. Buňky během růstu mění modré nefluorescenční barvivo na červené fluorescenční. Pro zjištění cytotoxicity rozpouštědla bylo použito 100% DMSO naředěné v médiu na 11,11% DMSO. Na základě naměřených dat byly vypracované grafy (Graf 10, Graf 11, Graf 12) se závislostí živých buněk v procentech na logaritmu koncentrace sledované látky.



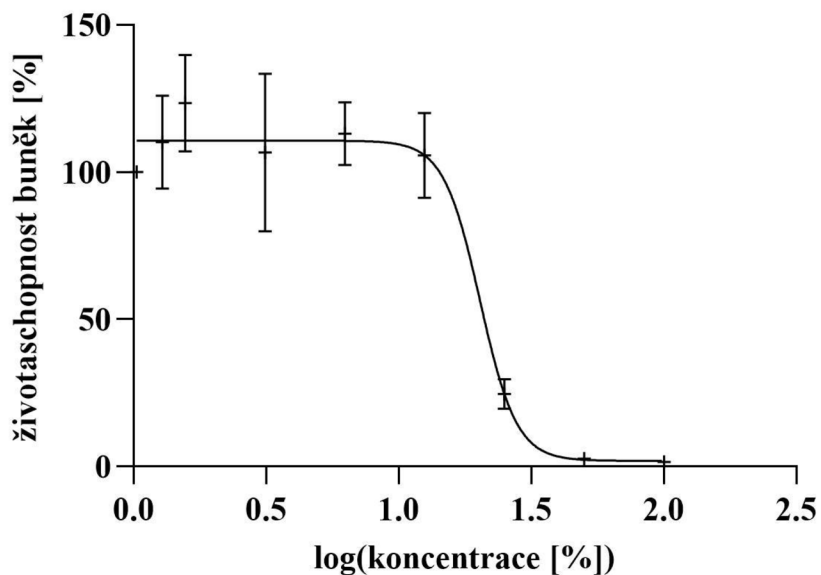
Graf 10: Závislost počtu živých buněk MCF-7 v procentech na dekadickém logaritmu koncentrace DMSO. V grafu jsou zaznačené směrodatné odchylky z 3 opakování.

HDF164



Graf 11: Závislost počtu živých buněk HDF164 v procentech na dekadickém logaritmu koncentrace DMSO. V grafu jsou zaznačené směrodatné odchylky z 3 opakování.

H1299



Graf 12: Závislost počtu živých buněk H1299 v procentech na dekadickém logaritmu koncentrace DMSO. V grafu jsou zaznačené směrodatné odchylky z 3 opakování.

Grafy byly vytvořené v programu Prisma, kde byla vypočtena letální dávka pro 50 % buněk (LD50). Hodnoty pro jednotlivé buněčné linie HDF164, MCF-7 a H1299 jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Koncentrace LD50 pro buňky MCF-7, HDF164 a H1299

	DMSO [%]
MCF-7	1,91
HDF164	3,35
H1299	2,25

DMSO vykazovalo největší cytotoxicitu vůči buněčným liniím MCF-7 s LD50 1,91 %. Nejmenší cytotoxické vlastnosti způsobovalo DMSO buněčným liniím HDF164 s LD50 3,35 %. Buněčným liniím H1299 způsobovalo DMSO cytotoxicitu LD50 2,25 %. Z výsledků lze určit, že buňky lidských dermálních fibroblastů (HDF164) jsou nejodolnější vůči rozpouštědлу DMSO.

5 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na studium vlivu vybraných makroelementů z potravy na DNA a její epigenetický profil. Teoretická část obsahuje základní poznatky o živinách a jejich vliv na zdravý životní styl. Dále se zabývá epigenetikou – jejími mechanismy a vlivem živin na její profil. Dále byla práce zaměřena na DNA a její sekundární struktury, G-kvadruplexy, a jejich význam v epigenetických mechanismech. Výživa a složky v ní mají velký vliv na mechanismy v lidském organismu, zaručují správný chod biochemických procesů a mohou sloužit jako prevence proti různým onemocněním.

V experimentální části práce byl studován vliv makroelementů na DNA metodami *in vitro* pomocí ThT testu a cirkulárně dichroické spektroskopie. Dále byl testován vliv DMSO *in vivo* na vybrané buněčné linie.

Byl zkoumán vliv vybraných makroelementů z potravy, konkrétně sodík, draslík, vápník a hořčík na DNA. Byly otestovány jejich vazebné vlastnosti k G4 *in vitro* pomocí ThT testu u syntetického oligonukleotidu hTEL, který představuje telomerickou sekvenci. Ze zkoumaných látek docházelo ke stabilizaci G4 zejména při použití KCl, u ostatních látek NaCl, CaCl₂ a MgCl₂ byly změny menší. Roztok KCl se běžně používá u CD spektroskopie pro stabilizování G4 struktur syntetických oligonukleotidů [60]. Vliv na konformaci G4 byl sledován pomocí cirkulárně dichroické spektroskopie. Samotná sekvence hTEL tvoří antiparalelní konformaci a přídavky všech látek způsobovali posun píku ze sekvence netvořící G4 k této konformaci. Nejvyšší signály jsme pozorovali u přídavků nejmenšího poměru vybraných látek vůči DNA. V testu ThT přídavky látek NaCl, MgCl₂ CaCl₂ neukazovali na efektivní tvorbu G4 struktury v DNA, ovšem v CD spektroskopii bylo dokázáno, že tyto látky dokážou stabilizovat strukturu G4. U syntetického oligonukleotidu hTEL vykazovali všechny vybrané látky stabilizační vlastnosti pro G4. ThT test byl proveden kontrolně i pro rozpouštědlo DMSO, kde se jako jediná efektivní jevila 2% koncentrace DMSO.

Dále byly provedeny testy cytotoxicity pro buněčné linie HDF164, H1299 a MCF-7, pomocí činidla AlamarBlue. Nejmenší cytotoxicitu vykazovalo rozpouštědlo DMSO vůči buněčným liniím HDF164, s viditelným rozdílem vůči buněčným liniím H1299 a MCF7. Z výsledků lze předpokládat, že nenádorové buňky jsou odolnější vůči cytotoxicitě rozpouštědla DMSO než buňky nádorové.

U kationtů kovů byla potvrzená afinita ke G4 strukturám, které jsou významně obohaceny v CpG oblastech a tím byl předpokládán jejich vliv na epigenetický profil. CD spektroskopie a ThT testy potvrdili pozitivní vlastnosti všech vybraných látek na G4. Po přidání všech iontů vybraných látek se změnila lokalizace píku a byla tvořena G4 struktura.

ZDROJE

- [1] Zvírotský, Michal, 1980-. *Zdravý Životní Styl*. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, <https://www.worldcat.org/oclc/897869601>.
- [2] Dehghan, Mahshid, et al. “Associations of Fats and Carbohydrate Intake with Cardiovascular Disease and Mortality in 18 Countries from Five Continents (PURE): A Prospective Cohort Study.” *The Lancet*, vol. 390, no. 10107, Nov. 2017, pp. 2050–62. *ScienceDirect*, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32252-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32252-3).
- [3] Micha, Renata, et al. “Association Between Dietary Factors and Mortality From Heart Disease, Stroke, and Type 2 Diabetes in the United States.” *JAMA*, vol. 317, no. 9, Mar. 2017, p. 912. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1001/jama.2017.0947>.
- [4] Afshin, Ashkan, et al. “Health Effects of Dietary Risks in 195 Countries, 1990–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.” *The Lancet*, vol. 393, no. 10184, May 2019, pp. 1958–72. *ScienceDirect*, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30041-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30041-8).
- [5] Kirby, Midge, and Elaine Danner. “Nutritional Deficiencies in Children on Restricted Diets.” *Pediatric Clinics of North America*, vol. 56, no. 5, Oct. 2009, pp. 1085–103. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2009.07.003>.
- [6] Verbanac, Donatella, et al. “Nutrition – Facts and Myths.” *Acta Pharmaceutica*, vol. 69, no. 4, Dec. 2019, pp. 497–510. *sciendo.com*, <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0051>.
- [7] White, Philip J., and Martin R. Broadley. “Biofortification of Crops with Seven Mineral Elements Often Lacking in Human Diets – Iron, Zinc, Copper, Calcium, Magnesium, Selenium and Iodine.” *New Phytologist*, vol. 182, no. 1, Apr. 2009, pp. 49–84. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x>.
- [8] Badii, Akbar, et al. “Effect of Consuming Zinc-Fortified Bread on Serum Zinc and Iron Status of Zinc-Deficient Women: A Double Blind, Randomized Clinical Trial.” *International Journal of Preventive Medicine*, vol. 3, no. Suppl1, Mar. 2012, pp. S124–30. *PubMed Central*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399305/>.
- [9] Leung, Angela M., et al. “History of U.S. Iodine Fortification and Supplementation.” *Nutrients*, vol. 4, no. 11, Nov. 2012, pp. 1740–46. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.3390/nu4111740>.
- [10] Gharibzahedi, Seyed Mohammad Taghi, and Seid Mahdi Jafari. “The Importance of Minerals in Human Nutrition: Bioavailability, Food Fortification, Processing Effects and Nanoencapsulation.” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 62, Apr. 2017, pp. 119–32. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017>.
- [11] Jafari, S. M., and D. J. McClements. “Chapter One - Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability.” *Advances in Food and Nutrition Research*, edited by Fidel Toldrá, vol. 81, Academic Press, 2017, pp. 1–30. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.008>.

- [12] Fairweather-Tait, Susan, and Richard F. Hurrell. "Bioavailability of Minerals and Trace Elements: Members of EC Flair Concerted Action No. 10: Measurements of Micronutrient Absorption and Status*." *Nutrition Research Reviews*, vol. 9, no. 1, Jan. 1996, pp. 295–324. *Cambridge University Press*, <https://doi.org/10.1079/NRR19960016>.
- [13] "The Discovery of the Double Helix, 1951-1953." *Francis Crick - Profiles in Science*, 12 Mar. 2019, <https://profiles.nlm.nih.gov/spotlight/sc/feature/doublehelix>.
- [14] Sinden, R.R., Pearson, C.E., Potaman, V.N., Ussery, D.W., 1998. DNA: Structure and function, in: Verma, R.S.B.T.-A. in G.B. (Ed.), *Genes and Genomes*. JAI, pp. 1-141. [https://doi.org/10.1016/S1067-5701\(98\)80019-3](https://doi.org/10.1016/S1067-5701(98)80019-3).
- [15] Morales, Violette, et al. "Chromatin Structure and Dynamics: Functional Implications." *Biochimie*, vol. 83, no. 11, Nov. 2001, pp. 1029–39. *ScienceDirect*, [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01347-5](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01347-5).
- [16] Bibikova, Marina, et al. "High Density DNA Methylation Array with Single CpG Site Resolution." *Genomics*, vol. 98, no. 4, Oct. 2011, pp. 288–95. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007>.
- [17] Esteller, Manel. "CpG Island Hypermethylation and Tumor Suppressor Genes: A Booming Present, a Brighter Future." *Oncogene*, vol. 21, no. 35, Aug. 2002, pp. 5427–40. *www.nature.com*, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600>.
- [18] Huang, Biao et al. "Epigenetics: the language of the cell?." *Epigenomics* vol. 6,1 (2014): 73-88. doi:10.2217/epi.13.72
- [19] Bishop, K.S.; Ferguson, L.R. The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. *Nutrients* 2015, 7, 922-947. <https://doi.org/10.3390/nu7020922>.
- [20] Sang-Woon Choi, Simonetta Friso, Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health, *Advances in Nutrition*, Volume 1, Issue 1, November 2010, Pages 8–16, <https://doi.org/10.3945/an.110.1004>
- [21] Mentch, Samantha J., and Jason W. Locasale. "One Carbon Metabolism and Epigenetics: Understanding the Specificity." *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1363, no. 1, Jan. 2016, pp. 91–98. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.1111/nyas.12956>.
- [22] Handy, Diane E., et al. "Epigenetic Modifications." *Circulation*, vol. 123, no. 19, May 2011, pp. 2145–56. *ahajournals.org(Atypon)*, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>.
- [23] Li, En, and Yi Zhang. "DNA Methylation in Mammals." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 6, no. 5, May 2014, p. a019133. *cshperspectives.cshlp.org*, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>.
- [24] Holliday, R., and J. E. Pugh. "DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development." *Science (New York, N.Y.)*, vol. 187, no. 4173, Jan. 1975, pp. 226–32.

- [25] Riggs, A. D. "X Inactivation, Differentiation, and DNA Methylation." *Cytogenetics and Cell Genetics*, vol. 14, no. 1, 1975, pp. 9–25. *PubMed*, <https://doi.org/10.1159/000130315>.
- [26] Kim, Kyong-chol, et al. "DNA Methylation, an Epigenetic Mechanism Connecting Folate to Healthy Embryonic Development and Aging." *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 20, no. 12, Dec. 2009, pp. 917–26. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.008>.
- [27] Medina-Franco, José L., et al. "Chapter 13 - DNA Methyltransferase Inhibitors for Cancer Therapy." *Epigenetic Technological Applications*, edited by Y. George Zheng, Academic Press, 2015, pp. 265–90. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801080-8.00013-2>.
- [28] Rhee, Ina, et al. "DNMT1 and DNMT3b Cooperate to Silence Genes in Human Cancer Cells." *Nature*, vol. 416, no. 6880, Apr. 2002, pp. 552–56. *www.nature.com*, <https://doi.org/10.1038/416552a>.
- [29] Björnsson, Einar S., et al. "Incidence, Presentation, and Outcomes in Patients With Drug-Induced Liver Injury in the General Population of Iceland." *Gastroenterology*, vol. 144, no. 7, June 2013, pp. 1419-1425.e3. *www.gastrojournal.org*, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.006>.
- [30] Aliberti, Angela, and Frank A. Barile. "Chapter 42 - Epigenetic Biomarkers in Toxicology." *Biomarkers in Toxicology*, edited by Ramesh C. Gupta, Academic Press, 2014, pp. 717–28. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00042-7>.
- [31] Bannister, Andrew J., and Tony Kouzarides. "Regulation of Chromatin by Histone Modifications." *Cell Research*, vol. 21, no. 3, Mar. 2011, pp. 381–95. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- [32] Gujral, Palak, et al. "Histone Acetylation and the Role of Histone Deacetylases in Normal Cyclic Endometrium." *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 18, no. 1, Aug. 2020, p. 84. *BioMed Central*, <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00637-5>.
- [33] Phan, Anh Tuân. "Human Telomeric G-Quadruplex: Structures of DNA and RNA Sequences." *The FEBS Journal*, vol. 277, no. 5, Mar. 2010, pp. 1107–17. *PubMed*, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07464.x>.
- [34] Balasubramanian, Shankar, et al. "Targeting G-Quadruplexes in Gene Promoters: A Novel Anticancer Strategy?" *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 10, no. 4, Apr. 2011, pp. 261–75. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/nrd3428>.
- [35] Ribeyre, Cyril, et al. "The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences in Vivo." *PLoS Genetics*, vol. 5, no. 5, May 2009, p. e1000475. *PubMed*, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000475>.
- [36] Bugaut, Anthony, and Shankar Balasubramanian. "5'-UTR RNA G-Quadruplexes: Translation Regulation and Targeting." *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 11, June 2012, pp. 4727–41. *PubMed*, <https://doi.org/10.1093/nar/gks068>.

- [37] Reinhold, William C., et al. "Exon Array Analyses across the NCI-60 Reveal Potential Regulation of TOP1 by Transcription Pausing at Guanosine Quartets in the First Intron." *Cancer Research*, vol. 70, no. 6, Mar. 2010, pp. 2191–203. PubMed, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3528>.
- [38] Mergny, Jean-Louis, and Laurent Lacroix. "UV Melting of G-Quadruplexes." *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, vol. 37, no. 1, June 2009. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1701s37>.
- [39] Mergny, Jean-Louis, et al. "Thermal Difference Spectra: A Specific Signature for Nucleic Acid Structures." *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 16, Sept. 2005, p. e138. PubMed, <https://doi.org/10.1093/nar/gni134>.
- [40] Renaud de la Faverie, Amandine, et al. "Thioflavin T as a Fluorescence Light-up Probe for G4 Formation." *Nucleic Acids Research*, vol. 42, no. 8, Apr. 2014, p. e65. PubMed, <https://doi.org/10.1093/nar/gku111>.
- [41] Hudson, Sean A., et al. "The Thioflavin T Fluorescence Assay for Amyloid Fibril Detection Can Be Biased by the Presence of Exogenous Compounds: Exogenous Compounds Can Bias Thioflavin T Assays." *FEBS Journal*, vol. 276, no. 20, Oct. 2009, pp. 5960–72. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x>.
- [42] "Circular Dichroism." *Chemistry LibreTexts*, 2 Oct. 2013, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Circular_Dichroism](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Circular_Dichroism).
- [43] Ida, Jeunice, et al. "G-Quadruplexes as An Alternative Recognition Element in Disease-Related Target Sensing." *Molecules*, vol. 24, no. 6, Jan. 2019, p. 1079. www.mdpi.com, <https://doi.org/10.3390/molecules24061079>.
- [44] Halder, Rashi, et al. "Bisquinolinium Compounds Induce Quadruplex-Specific Transcriptome Changes in HeLa S3 Cell Lines." *BMC Research Notes*, vol. 5, Mar. 2012, p. 138. PubMed Central, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-138>.
- [45] Mikami-Terao, Yoko, et al. "Antitumor Activity of G-Quadruplex-Interactive Agent TMPyP4 in K562 Leukemic Cells." *Cancer Letters*, vol. 261, no. 2, Mar. 2008, pp. 226–34. PubMed, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.11.017>.
- [46] Halder, Rashi, et al. "Guanine Quadruplex DNA Structure Restricts Methylation of CpG Dinucleotides Genome-Wide." *Molecular BioSystems*, vol. 6, no. 12, Dec. 2010, pp. 2439–47. PubMed, <https://doi.org/10.1039/c0mb00009d>.
- [47] Jara-Espejo, Manuel, and Sérgio Roberto Line. "DNA G-Quadruplex Stability, Position and Chromatin Accessibility Are Associated with CpG Island Methylation." *The FEBS Journal*, vol. 287, no. 3, Feb. 2020, pp. 483–95. PubMed, <https://doi.org/10.1111/febs.15065>.

- [48] Mao, Shi-Qing, et al. “DNA G-Quadruplex Structures Mould the DNA Methylome.” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 25, no. 10, Oct. 2018, pp. 951–57. PubMed Central, <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0131-8>.
- [49] Mukherjee, Ananda Kishore, et al. “Non-Duplex G-Quadruplex Structures Emerge as Mediators of Epigenetic Modifications.” *Trends in Genetics*, vol. 35, no. 2, Feb. 2019, pp. 129–44. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.11.001>.
- [50] 2.1, 2.2 *Struktura a tvar nukleových kyselin – Genetika na ČZU polopatě*. <http://genetika.8u.cz/2021/03/01/2-1-2-2-struktura-a-tvar-nukleovych-kyselin/>. Accessed 14 May 2022.
- [51] *Alamar Blue Cell Viability Assay*. <https://www.gbiosciences.com/Alamar-Blue-Cell-Viability-Assay>. Accessed 14 May 2022.
- [52] Nucleic Acids Symposium Series, Volume 1, Issue 1, Pages 259–260, <https://doi.org/10.1093/nass/1.1.259>
- [53] Hardin, Charles C., et al. “Thermodynamic and Kinetic Characterization of the Dissociation and Assembly of Quadruplex Nucleic Acids.” *Biopolymers*, vol. 56, no. 3, 2000, pp. 147–94. DOI.org (Crossref), [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000/2001\)56:3<147::AID-BIP10011>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000/2001)56:3<147::AID-BIP10011>3.0.CO;2-N).
- [54] Bhattacharyya, Debmalya, et al. “Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability.” *Frontiers in Chemistry*, vol. 4, 2016. *Frontiers*, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2016.00038>.
- [55] Jeziorska, Danuta M., et al. “DNA Methylation of Intragenic CpG Islands Depends on Their Transcriptional Activity during Differentiation and Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 36, Sept. 2017. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1073/pnas.1703087114>.
- [56] Asensio, Juan Luis, et al. “Solution Conformation of a Parallel DNA Triple Helix with 5' and 3' Triplex–Duplex Junctions.” *Structure*, vol. 7, no. 1, Jan. 1999, pp. 1–11. *www.cell.com*, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80004-5).
- [57] Phan, Anh Tuân, and Jean-Louis Mergny. “Human Telomeric DNA: G-Quadruplex, i-Motif and Watson–Crick Double Helix.” *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 21, Nov. 2002, pp. 4618–25. *PubMed Central*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC135813/>.
- [58] *H1299 - an Overview | ScienceDirect Topics*. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/h1299>. Accessed 16 May 2022.
- [59] *MCF-7 - an Overview | ScienceDirect Topics*. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/mcf-7>. Accessed 16 May 2022.
- [60] Obi, Ikenna, et al. “Stabilization of G-Quadruplex DNA Structures in *Schizosaccharomyces Pombe* Causes Single-Strand DNA Lesions and Impedes DNA Replication.” *Nucleic Acids Research*, vol. 48, no. 19, Nov. 2020, pp. 10998–1015. *PubMed*, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa820>.

[61] Yiannakopoulou, Eugenia C. “Targeting DNA Methylation with Green Tea Catechins.” *Pharmacology*, vol. 95, no. 3–4, 2015, pp. 111–16. www.karger.com, <https://doi.org/10.1159/000375503>.

[62] Vitamin polymorphisms and behavior: Evidence of associations with neurodevelopment, depression, schizophrenia, bipolar disorder and cognitive decline - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-one-carbon-metabolism-pathways-where-vitamins-B6-B12-and-folic_fig1_265128704.

[63] Santos, N. C., et al. “Biochemical, Biophysical and Haemorheological Effects of Dimethylsulphoxide on Human Erythrocyte Calcium Loading.” *Cell Calcium*, vol. 31, no. 4, Apr. 2002, pp. 183–88. *PubMed*, <https://doi.org/10.1054/ceca.2002.0271>.

[64] Qi, Weidong, et al. “Cytotoxic Effects of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) on Cochlear Organotypic Cultures.” *Hearing Research*, vol. 236, no. 1–2, Feb. 2008, pp. 52–60. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.1016/j.heares.2007.12.002>.

6 SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
PBS	fosfátový pufr
g	gram
ml	mikrolitr
ml	mililitr
rpm	otáčky za minutu
μl/l	mikrogram na litr
nm	nanometr
mg	miligram
μl	mikrolitr
μM	mikromol na litr
m ²	metr čtvereční
LD50	letální dávka pro 50% populace
UV	ultrafialové spektrum světla
CD	spektroskopie cirkulárního dichroismu
ThT	Thioflavin T
hTEL	telomerická sekvence
G4	G-kvadruplex
SAM	S-adenosyl methionin
SAH	S-adenosyl homocystein
CpG	cytosin-fosfát-guanin
5mC	5metyl cytosin
DNMT	metyltransferáza
BHMT	betain homocystein metyltransferáza
THF	kyselina tetrahydrofolová (tetrahydrofolát)
FAD	flavin adenin dinukleotid
B6	vitamín B6

B12 vitamín B12

HDAC histon deacetyláza

CoA Koenzym A

Acetyl-CoA Acetylkoenzym A

ADP Adenosindifosfát