



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 PŘÍRODNÍCH A SYNTETICKÝCH LIGANDŮ G4
NA TRANSAKTIVACI P53**

INFLUENCE OF NATURAL AND SYNTHETIC G4-LIGANDS TO P53 TRANSAKTIVATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristýna Perná

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1718/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kristýna Perná**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv přírodních a syntetických ligandů G4 na transaktivaci p53

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je zjistit vliv vybraných látek na transaktivaci proteinem p53 k dosažení budou realizovány tyto kroky:

Literární rešerše k danému tématu

Izolace a transformace plasmidů s expresí proteinu p53

Testování interakce vybraných látek s G–kvadruplexy in vitro (například pomocí gelové retardační analýzy a fluorescenční anizotropie)

Testování transaktivace proteinem p53 v kvasinkovém expresním systému (luciferázový reportérový test)

5. Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Kristýna Perná
studentka

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

V promotorech lidských genů se vyskytují sekundární struktury DNA, jako jsou například G-kvadruplexy. Dysfunkce těchto kvadruplexových struktur byly pozorovány u několika případů nádorových onemocnění, a proto jsou tyto struktury předmětem výzkumu pro návrh nových protinádorových léčiv. Protein p53 je důležitým regulačním proteinem v procesu řízení buněčného cyklu a opravy DNA. Mutace v genu kódující tento protein se objevují u více než 50 % případů onkologických onemocnění. V této práci byl zkoumán vliv přírodních ligandů, vázající se na G-kvadruplexy, na vazbu a aktivitu proteinu p53.

V teoretické části diplomové práce byla popsána struktura a vazebné vlastnosti proteinu p53, struktura a role G-kvadruplexů a byly popsány vybrané G4-ligandy vyskytující se v potravinách – kurkumin, kvercetin, berberin a kyselina ellagová. Cílem experimentální části této práce bylo zjistit vliv těchto látek na transkripční aktivitu proteinu p53 *in vivo* na základě jejich interakce s G-kvadruplexy pomocí kvasinkových izogenních systémů. Interakce mezi vybranými G-kvadruplexovými strukturami a ligandy byla nejprve ověřena *in vitro* pomocí ThT testu a cirkulárního dichroismu.

KLÍČOVÁ SLOVA

protein p53, G-kvadruplex, G4-ligandy, kvasinkový izogenní systém

ABSTRACT

Secondary DNA structures, such as G-quadruplexes, occur in the promoters of human genes. Dysfunctions of these quadruplex structures have been observed in several cases of cancer, and therefore these structures are the subject of research for the design of new anticancer drugs. The p53 protein is an important regulatory protein in the process of cell cycle control and DNA repair. Mutations in the gene encoding this protein occur in more than 50 % of cancer cases. In this thesis, the influence of natural ligands binding to G-quadruplexes on the binding and activity of the p53 protein was investigated.

The theoretical part of the thesis describes the structure and binding properties of p53 protein, the structure and role of G-quadruplexes and describes selected G4-ligands occurring in food - curcumin, quercetin, berberine and ellagic acid. The aim of the experimental part of this thesis was to determine the effect of these substances on the transactivation activity of the p53 protein *in vivo* based on their interaction with G-quadruplexes using yeast isogenic systems. The interaction between selected G-quadruplex structures and ligands was first verified *in vitro* using the ThT assay and circular dichroism.

KEY WORDS

p53 protein, G-quadruplex, G4-ligands, yeast isogenic system

PERNÁ, Kristýna. *Vliv přírodních a syntetických ligandů G4 na transaktivaci p53*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139029>. 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 svému vedoucímu doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Velké díky patří také mé konzultantce Ing. Otílii Porubiakové za úsilí, čas a trpělivost, kterou mi věnovala při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR, kde byla vykonávána experimentální část této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu, bez které by tato práce nevznikla.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Protein p53	8
2.1.1 Struktura proteinu p53.....	8
2.1.2 Funkce proteinu p53.....	9
2.2 Sekundární struktury DNA.....	10
2.2.1 Vazebná aktivita proteinu p53 k DNA a jejím sekundárním strukturám.....	10
2.2.2 Křížová struktura.....	11
2.2.3 Triplexová DNA.....	11
2.2.4 T-smyčka.....	11
2.2.5 G-kvadruplexy.....	12
2.3 G4-ligandy.....	15
2.3.1 Syntetické G4-ligandy.....	17
2.3.2 Přírodní G4-ligandy.....	18
2.4 Modelové systémy pro testování vlivu G4-ligandů	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Materiál a přístroje	24
3.1.1 Chemikálie	24
3.1.2 Biologický materiál	24
3.1.3 Ostatní materiály	25
3.1.4 Roztoky a jejich příprava	25
3.1.5 Média použitá ke kultivaci kvasinkových kultur	25
3.1.6 Laboratorní přístroje a zařízení	25
3.2 Metody	26
3.2.1 ThT kompetiční test – ověření interakce ligandů a G4-sekvence <i>in vitro</i>	26
3.2.2 Cirkulární dichroismus – ověření interakce ligandů a G4-sekvence <i>in vitro</i>	27
3.2.3 Izolace plazmidové DNA	27
3.2.4 Transformace buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pomocí lithium acetátové metody	28
3.2.5 Luciferázový reportérový test	30
3.2.6 Test viability buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	32

4.1 Testování interakce G4-ligandů <i>in vitro</i>	32
4.1.1 ThT kompetiční test	32
4.1.2 Cirkulární dichroismus	34
4.2 Příprava plazmidové DNA a transformace kvasinek	37
4.3 Analýza transaktivace proteinu p53 <i>in vivo</i>	39
4.4 Testy viability kvasinkových buněk.....	42
4.5 Analýza transaktivace proteinu p53 po ošetření buněk G4-ligandy <i>in vivo</i>	43
5 ZÁVĚR.....	49
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	51
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66
8 PŘÍLOHY.....	67

1 ÚVOD

Buňky lidského těla jsou neustále vystavovány řadě genotoxických útoků způsobujících poškození DNA. Chybná oprava DNA pak může mít za následek různé mutace nebo chromozomální aberace, které mohou ovlivnit nebo modifikovat funkce nádorových supresorových proteinů nebo onkogenů, a způsobit tak rozvoj nádorového onemocnění. Jedním z nejstudovanějších centrálních nádorových supresorů je například protein p53 [1].

V posledních letech došlo k obrovskému pokroku v oblasti objasnění biochemických a biologických vlastností proteinu p53 [2]. Protein p53 zastává klíčovou regulační roli v buněčných odpovědích na stres a jeho mutace a poruchy exprese patří mezi nejčastější příčiny nádorových onemocnění [3]. Jeho interakce s DNA je pro správnou regulaci klíčová a je schopen se vázat na různé DNA struktury, včetně G-kvadruplexů (G4) [4–6]. Proto by se odpovědi na léčbu nádorových onemocnění mohly najít právě ve spojení mezi G4, vyskytujícími se v promotorech genů a přispívajícími k regulaci buněčných dějů, a proteinem p53 [6].

V dnešní době jsou v různých fázích preklinického a klinického testování léčiva, která se vážou na G4 a dokáží je stabilizovat. Mohou být použita k inhibici prodloužení telomer, genové transkripce či translace u onkogenů. Stabilizování G4 struktur vede k apoptóze nádorových buněk [7].

Již více než 40 let slouží přírodní produkty v boji proti nádorovým onemocněním a hledání nových léků v oblasti přírodních látek je jedním z prioritních cílů protinádorové terapie. Děje se tak kvůli rychlému rozvoji rezistence vůči chemoterapeutickým lékům, vysoké toxicitě chemoterapeutických látek i jejich nežádoucím vedlejším účinkům. Hlavním zdrojem těchto úspěšných sloučenin jsou mikroby a rostliny, hlavně jejich sekundární metabolity [8]. Přírodní látky jsou biologicky aktivní a jsou známé pro své různé protinádorové, antioxidační i antibiotické účinky. Mezi přírodní sloučeniny, kterým se věnuje pozornost pro možné protinádorové účinky a spojitost s G4, patří například kurkumin, berberin, kvercetin nebo kyselina ellagová [9].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Protein p53

Protein p53 se řadí mezi nádorové supresorové proteiny, který zastává nenahraditelnou roli v procesech opravy DNA [1]. Poprvé byl popsán v roce 1979 jako protein, který se váže na velký T-antigen opičího viru SV40 [10, 11]. Je aktivován v reakci na nesčetné množství stresových signálů, například při poškození buněk. V závislosti na typu tkáně a rozsahu buněčného poškození spouští řadu procesů, které vedou buď k opravě/přežití buněk nebo naopak k programované buněčné smrti – apoptóze [11]. Spolu s proteinem p21 jsou považovány za klíčové regulátory buněčného cyklu a buněčné senescence [12].

Nádorová onemocnění patří mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí na světě a více než 50 % případů nádorových onemocnění je způsobeno mutovaným proteinem p53 [13]. Právě díky této zásadní funkci při udržování genetické stability získal přezdívku „strážce genomu“ [14].

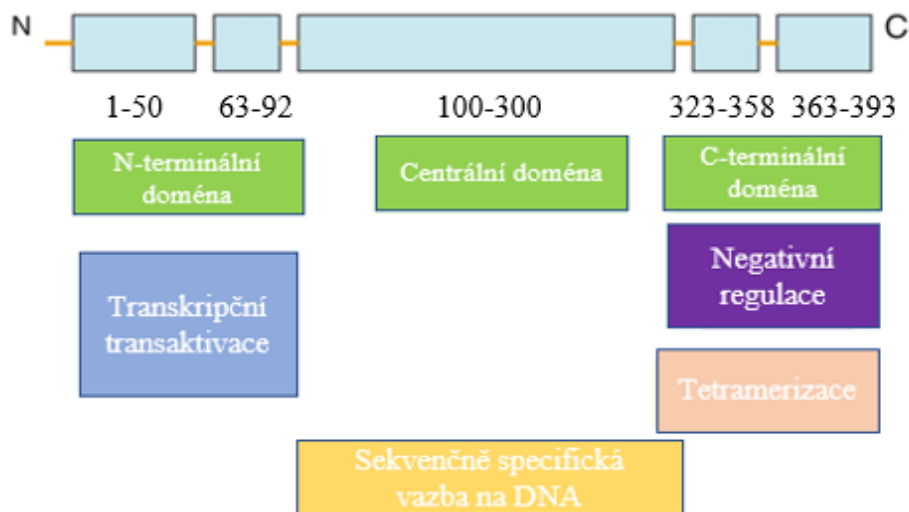
2.1.1 Struktura proteinu p53

Lidský gen *TP53*, kódující protein p53, obsahuje 11 exonů a 10 intronů a je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17. Je to fosfoprotein o molekulové hmotnosti 53 kDa [3]. Spolu s proteiny p63 a p73 patří do rodiny p53 [11]. Skládá se z 393 aminokyselin a sedmi funkčních domén, přičemž každá z nich zajišťuje jinou funkci [3]. Obecně lze říct, že struktura proteinu p53 sestává z N-terminální domény, zodpovědné za transkripční transaktivaci, centrální domény, která je zodpovědná za specifickou vazbu na DNA, a C-terminální domény [15].

N-terminální doménu tvoří dvě homologní transaktivační domény, které jsou nezbytné k indukci odlišné podskupiny cílových genů p53 [13, 14]. Transaktivační domény zprostředkovávají transkripční aktivitu, mohou regulovat transkripci některých společných genů, ale také mohou působit nezávisle na sobě. Na N-konci se také nachází vazebné místo pro ubikvitin ligázu a MDM2 [16], přičemž proces regulace zahrnuje vazbu proteinu MDM2 na transaktivační doménu p53, po které následuje ubikvitinace a zpětnovazebná regulace [13]. Strukturálním homologem MDM2 je regulační protein MDM4, který nezpůsobuje degradaci proteinu, ale zřejmě ovlivňuje transaktivační potenciál proteinu [17]. Za transaktivační doménou následuje doména bohatá na prolin, která se podílí na potlačení růstu a buněčné smrti zprostředkovanou p53 [16]. Dále protein p53 sestává z domény vázající DNA a C-terminální domény složené z domény oligomerizační a negativní regulační domény [13, 14]. Oligomerizační doména je zodpovědná za tetramerizaci, která je nezbytná pro aktivitu p53 [18], regulační doména se podílí na negativní regulaci centrální vazebné domény DNA [19]. P53 podléhá několika posttranslačním modifikacím, jako je například acetylace, fosforylace (např. SER 15) nebo ubikvitinace [13]. Schématickou strukturu proteinu znázorňuje Obrázek 1.

Lidský gen *TP53* může kódovat 12 různých izoform, které se tvoří prostřednictvím alternativní iniciace translace, využitím alternativního promotoru a alternativního sestřihu [11, 13]. Jako první byla objevena izoforma p53 α , která má plnou délku 393 aminokyselin [14, 20]. Gen *TP53* kóduje dalších 11 izoform (například p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α atd.), které se liší od kompletního p53 ve svých N- nebo C-terminálních oblastech, většina si udržuje centrální

doménu vázající DNA [16]. Jsou exprimovány v normálních lidských tkáních, abnormálně jsou exprimovány v široké škále typů onkologických onemocnění [20].



Obrázek 1: Schématické znázornění domén proteinu p53. Skládá se ze tří základních domén s odlišnou funkcí. Polypeptidový řetězec je orientovaný od N-terminálního konce k C- konci, číselné hodnoty znázorňují aminokyselinové zbytky [15].

Mnoho mutací genu *TP53* může mít onkogenní účinek [13, 21]. Asi 5 % mutací *TP53* bylo detekováno v regulačních doménách, zatímco většina mutací (95 %) byla u nádorů detekována v centrální oblasti, která je zodpovědná za sekvenčně specifickou vazbu k DNA – nejčastěji se jedná o mutace u aminokyselinových zbytků 102–292. Na rozdíl od jiných nádorových supresorových genů je více než 85 % mutací *TP53* způsobeno substitucí jedné aminokyseliny [13]. K inaktivaci proteinu p53 u nádorového onemocnění nemusí dojít pouze přímou mutací nebo delecí, ale také narušením kterékoli z drah, které regulují protein p53 [11].

Protein p53 je produktem genu *TP53*, nejčastěji mutovaného (inaktivovaného) genu u lidských nádorů, kdy za deaktivaci jsou odpovědné dva hlavní mechanismy. Je to mutace genu *TP53* a negativní regulace „wild-type“ (wt) proteinového produktu po interakci s regulačními proteiny, jako jsou MDM2 nebo MDM4 [16, 22].

2.1.2 Funkce proteinu p53

Protein p53 se uplatňuje při opravě DNA, metabolismu, myogenezi, ontogenezi, stárnutí buněk a reguluje buněčný cyklus (a to hlavně jeho zástavu ve fázi G1). Tím brání množení poškozených buněk, které by mohlo vést ke vzniku onkologického onemocnění [23, 24]. Protein p53 je transkripční faktor, který se váže na specifická místa v DNA a indukuje expresi genů zapojených do výše zmíněných procesů, včetně navození apoptózy buněk [16].

Jednou z rolí proteinu p53 je monitorovat buněčný stres a podle potřeby indukovat apoptózu [3]. Progrese zdravého buněčného cyklu je řízena cyklin-dependentními kinázami (CDK), CDK – cyklinovými komplexy a signalizací p53 a p21 [1, 25, 26]. Proces buněčného cyklu je při poškození DNA přerušen na specifických hranicích – kontrolních bodech buněčného cyklu [26]. To se uskutečňuje v buňkách, kde stresory generují vážné a neodvratné poškození, kde protein p53 může iniciovat apoptózu, a tím eliminovat poškozené buňky [3].

Poškození DNA podporuje fosforylaci proteinu p53 a blokuje degradaci zprostředkovanou MDM2 [25]. Mezi produkty apoptotických genů, které jsou indukovány p53, patří například *BAX*, *Fas/CD95* nebo *PIG3* a jsou velmi úzce spojeny s funkcí p53. Jako první p53-regulovaný proapoptický člen rodiny Bcl-2 byl identifikován gen *BAX*, v němž byly jednoznačně identifikovány prvky odpovědi pro protein p53 [3]. Kontrolní bod G1/S v důsledku své závislosti na p53 často bývá ztracen v nádorových buňkách, což vysvětluje vysokou úroveň jejich genomové nestability [26].

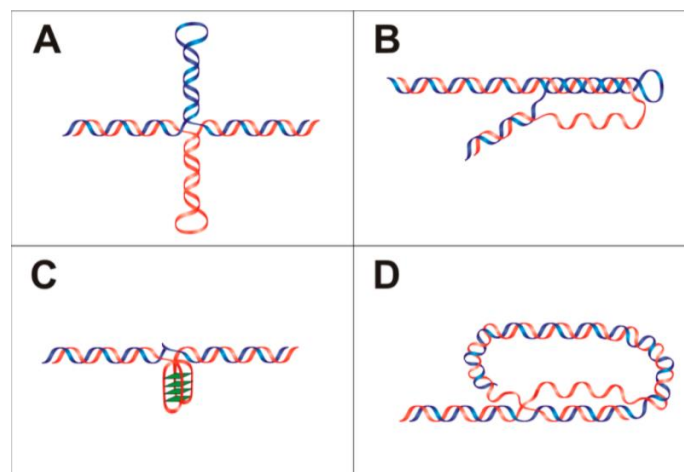
2.2 Sekundární struktury DNA

Struktura DNA je známa od roku 1953, kdy byla popsána Watsonem a Crickem jako pravotočivá dvoušroubovice, tzv. B-DNA [27]. DNA se ale může vyskytovat i v několika dalších alternativních konformacích lišících se od klasické kanonické struktury DNA, které jsou založené na konkrétních sekvenčních motivech a interakcích s různými proteiny. Původně byly tyto inter- a intramolekulární sekundární struktury charakterizovány *in vitro* pomocí biofyzikálních technik (např. cirkulární dichroismus – CD) [28, 29]. Tyto lokální struktury DNA jsou však běžnou součástí genomů u všech organismů a uplatňují se při regulaci různých biologických funkcí [30, 31].

2.2.1 Vazebná aktivita proteinu p53 k DNA a jejím sekundárním strukturám

Vazba proteinu p53 na DNA je základním předpokladem pro jeho transkripčně-regulační aktivitu [23]. P53 působí jako transkripční faktor pro více než 60 svých cílových genů, např. *TSP-1*, *CDKN1A* nebo *BAX* [32, 33]. Jeho funkci zajišťuje především jeho interakce s DNA nebo jinými proteiny – dalšími transkripčními faktory, např. p21 nebo gen *E2F7*. Je součástí rozsáhlé transkripční sítě, která koordinuje reakce na intracelulární i extracelulární napětí a poškození [14, 33]. K regulaci genové exprese využívá transkripční faktor p53 přímou vazbu na DNA RE (RE – responzivní element – “prvek odpovědi“), který je tvořen dvěma degenerovanými dekamerními sekvencemi, které odděluje variabilní mezerník [22].

Ve srovnání s dalšími transkripčními faktory, protein p53 necílí pouze na jednu konkrétní konsenzuální sekvenci DNA, ale je schopen vázat různé DNA sekvence a sekundární struktury [23, 28]. Mnoho z těchto lokálních DNA struktur bylo evolučně uchováno a jejich existence je zásadní v regulaci důležitých biologických procesů [23, 28, 34, 35]. Mezi tyto „alternativní“ struktury DNA patří křížové struktury, T-smyčka, levotočivá DNA (Z-DNA), triplexy nebo G4 [23]. Vybrané sekundární struktury DNA znázorňuje Obrázek 2. Podle mnoha bioinformatických analýz není umístění těchto struktur v genomu náhodné [23]. Vyskytují se například v replikačních počátcích (křížové struktury), oblastech promotorů [23] (křížové struktury/triplexy/G4), intronech (triplexy) nebo telomerách (G4) [23, 36–39].



Obrázek 2: Vybrané lokální struktury DNA: A. Křížová struktura se smyčkami, B. Triplexová DNA, C. G-kvadruplex, D. T-smyčka [30].

2.2.2 Křížová struktura

Negativní nadšroubovicové vinutí může vyvolat vznik čtyřramenné křížové sekundární struktury, tzv. kruciformy, která se podobá Hollidayově přechodu [28, 31]. Její strukturu znázorňuje Obrázek 2A. Vytvoření křížové struktury souvisí se sekvencí DNA a přítomností invertovaných repetice v sekvenci DNA [30, 40]. Křížové struktury se vyskytují v blízkosti replikačních počátků, v oblasti zlomů a promotorů [28, 41, 42]. Kruciformy jsou schopny ovlivňovat nadšroubovicové vinutí DNA, umístění nukleozomů *in vivo* a v neposlední řadě tvorbu i stabilizaci dalších sekundárních struktur DNA [30, 43].

2.2.3 Triplexová DNA

Nekanonická DNA je charakteristická přítomností Hoogsteenových vazeb mezi vodíkovými můstky, které mezi sebou párují nekomplementární báze nebo i báze komplementární, ale v jiných polohách než jsou vazby kanonické [44]. Triplexová DNA představuje nekanonickou DNA, která se skládá ze 3 řetězců DNA, kdy se uplatňuje jak Watson-Crickovo, tak Hoogsteenovo párování bází [30, 45]. Hoogsteenovy vodíkové vazby u jednovláknové DNA se tvoří ve velkém žlábkou dvouvláknové B-DNA bohaté na puriny [28, 46]. Schematicky strukturu popisuje Obrázek 2B. Pokud je třetí vlákno antiparalelní k duplexu DNA, pak se tyto triplexy tvoří při fyziologickém pH a jsou stabilizovány negativním nadšroubovicovým vinutím [28, 46]. Sekvence tvořící triplexy jsou běžné u genomu eukaryot, vzácnější u prokaryot [28, 47]. U savců jsou triplexové motivy navíc častěji v intronech řady esenciálních genů, včetně těch podílejících se na vývoji a buněčné signalizaci [28, 48]. Předpokládá se, že triplexy mohou indukovat genomovou nestabilitu tak, že způsobují dvouvláknové zlomy, které mohou vést k různým translokacím [28, 49].

2.2.4 T-smyčka

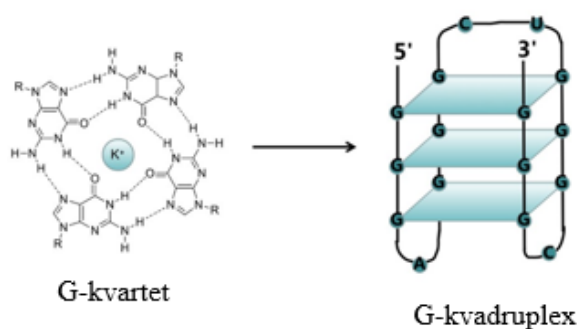
Konce lineární chromozomální DNA jsou tvořeny specifickými ochrannými strukturami – telomerami [23, 50]. Telomery sestávají z telomerické DNA a proteinů vázajících telomery. Telomerní repetice jsou bohaté na guanin a mohou tvořit alternativní sekundární strukturu, jmenovitě právě G4 [51]. Jejich hlavním úkolem je chránit konce chromozomů před degradací,

rekombinací, fúzí a před rozpoznávacími mechanismy, které by označily konce za poškozenou DNA. Dále umožňují přístup enzymu telomeráze, která zajišťuje připojování telomerických repetit. Tento proces zajišťuje udržovatelnost délek telomer [52]. Struktura telomer je zachována téměř u všech eukaryotních organismů, kdy u telomer savců se vyskytuje tzv. T-smyčky (Obrázek 2D) [23, 50, 52]. Pro vytvoření T-smyčky je vyžadována přítomnost proteinu TRF2, telomerní spojení tvořené z 3' jednořetězcového přesahu a repetit TTAGGG ohraničujících dvouřetězcovou telomerní část [30, 53]. Telomerní smyčky jsou pravděpodobně mechanismem pro ochranu konců lineárních chromozomů před degradací [30].

2.2.5 G-kvadruplexy

Současný výzkum zdůrazňuje vliv a význam G-kvadruplexů u vazby a aktivity transkripčních faktorů, jako je protein p53 [23]. Dysfunkce G4 struktur byly pozorovány u neurodegenerativních onemocnění a nádorového onemocnění prsu a jsou tak potenciálními cíli pro terapie cílené na DNA, zejména při návrhu protinádorových léků [54].

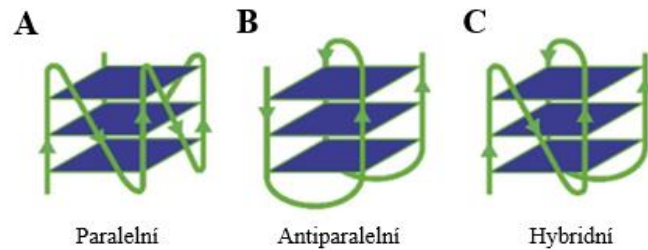
G4 jsou čtyřvláknové, sekundární struktury DNA, které se tvoří v oblastech bohatých na guanin. Základními motivy G4 jsou dva nebo více G-kvartetů, které se vytváří prostřednictvím vlastní asociace čtyř guaninů za vzniku skládaných tetradových struktur spojených jednovláknovou DNA smyčkou [51, 55, 56]. Jsou udržovány Hoogsteenovými vodíkovými vazbami a jejich tvorba je podporována přítomností monovalentních kovových kationtů, především K^+ a Na^+ , jak znázorňuje Obrázek 3 [57]. Jsou evolučně konzervované a stabilní za fyziologických podmínek. G-kvadruplexy se vyskytují v genomu přibližně jednou za 10 kb a podílejí se na několika základních buněčných procesech, jako je genová transkripce, replikace DNA, translace, genomová nestabilita, epigenetická regulace nebo prodlužování a udržování telomer [54, 58].



Obrázek 3: G4 struktura. Čtyři guaniny vytvářejí G-kvartet prostřednictvím Hoogsteenových vodíkových vazeb. Dva, tři nebo více G-kvartetů se skládá za vzniku G-kvadruplexového motivu. Monovalentní kationty (Na^+ nebo K^+) v centrálním kanálu G-kvartetu stabilizují jeho strukturu. Řetězec DNA je orientovaný od 5' k 3' konci [55].

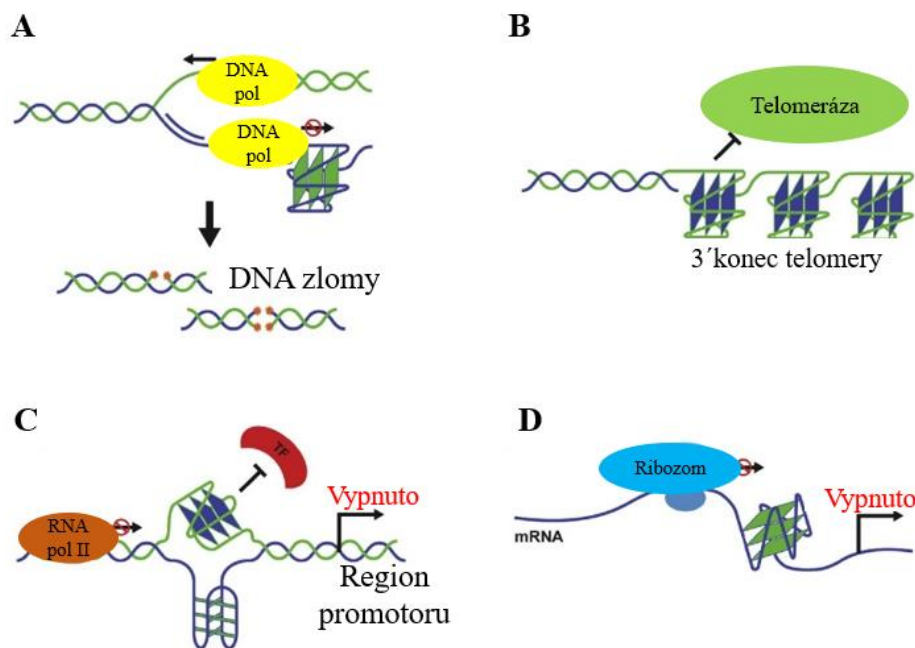
G4 struktury se mohou vytvářet jako intramolekulární, v rámci jednoho řetězce DNA, nebo jako intermolekulární, mezi více řetězci DNA [55, 59]. Dle orientace řetězců nukleových kyselin během skládání se dělí do různých konformací – paralelních, antiparalelních a hybridních (Obrázek 4), v závislosti na délce své smyčky a složení sekvence [60, 61]. Lze

říct, že stabilita a konfigurace G-kvadruplexů souvisí s délkou a složením sekvence tvořící daný G4, s počtem řetězců DNA a v poslední řadě s typem vazebných kationtů [55].



Obrázek 4: Možné konformace G-kvadruplexů: A. Paralelní, B. Antiparalelní, C. Hybridní typ [62].

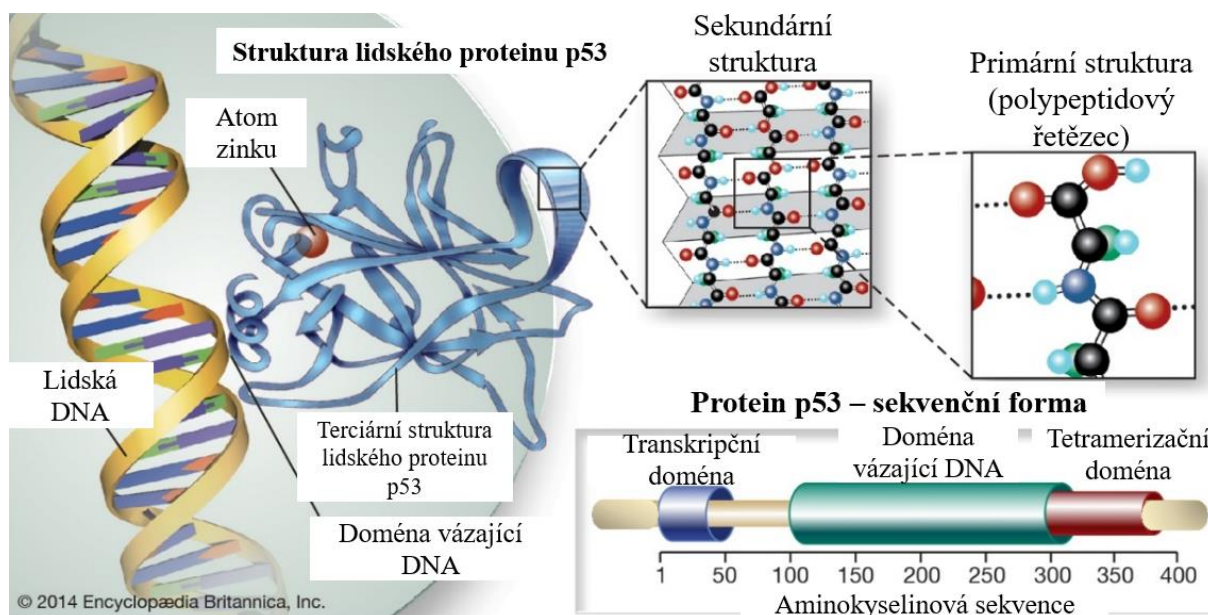
Zpočátku se G-kvadruplexům věnovala pozornost hlavně pro jejich spojení s telomerami a telomerázou, kde se mohou G4 struktury vytvářet v telomerických repeticích bohatých na guanin [51]. Nedávný výzkum prokázal význam G4 v různých buněčných procesech a jejich regulační funkci, včetně interakcí s transkripčními faktory [23]. U savců je genomová distribuce G4 specifická pro specifické genomové oblasti jako jsou telomery, genové promotory, vazebná místa transkripčních faktorů a místa s dvouvláknovými zlomy DNA, jak je znázorňuje Obrázek 5 [54, 63–65].



Obrázek 5: A. Pokud helicáza není přítomna, G4 způsobí zastavení DNA polymerázy, a to může vést k jednovláknovým/dvouvláknovým zlomům DNA. B. Na 3' konci chromozomů G4 interferují s telomerázou a ovlivňují tak prodlužování a udržování telomer. C. Promotor obsahující G4 interferuje s transkripčním faktorem a aktivitou RNA polymerázy. To může změnit genovou expresi na transkripční úrovni, z komplementárního řetězce se mohou tvořit další nekanonické struktury nukleové kyseliny, např. i-motivy. D. Tvorba G4 v mRNA může inhibovat rozpoznávání ribozomů, měnit sestřih nebo lokalizaci mRNA a tím regulovat genovou expresi [62].

Bylo ukázáno, že 42,7 % promotorů lidských genů obsahuje jeden nebo více G4 motivů [22, 58]. Nejlépe studovaný G4 v oblasti promotoru byl objeven v nukleázovém hypersenzitivním prvku III₁ (NHE III₁) protoonkogenu *c-myc*. NHE III₁ se nachází směrem k 5' konci DNA od promotoru 1, a je zodpovědný za většinu regulace transkripce genu [5, 55, 66, 67]. Bylo prokázáno, že sekvence bohaté na guanin v této oblasti tvoří paralelní G4 [55, 68]. Poté byl potvrzen výskyt G-kvadruplexů i v dalších promotorových oblastech, jako jsou např. protoonkogeny *VEGF*, *bcl-2* nebo *HIF-1A*. Tvorba G-kvadruplexů v těchto promotorových oblastech brání interakcím mezi DNA a jejími transkripčními faktory, které regulují transkripci [55].

Regulační dráhy zprostředkované G4 mají na buňky různé biologické aktivační i inhibiční účinky uplatňující se při replikaci DNA, transkripci a translaci RNA [51]. Příkladem lze uvést regulaci opět u onkogenu *c-myc* u elementu NHE III₁, kde se předpokládá, že G4 motivy hrají dvojí roli [51, 69, 70]. G4 fungují jako vazebná místa pro proteinové faktory, jako je například protein CNBP nebo NM23-H2 [51, 71, 72]. Vazba těchto proteinů umožní přístup dalších transkripčních faktorů, které mohou aktivovat transkripci. Tento proces souvisí se strukturálními změnami v transkripčních oblastech. Vazba proteinu je často spojena s rozvíjením G4, protože mnohdy samotné proteiny mohou rozvinout struktury G4 nebo mohou tvořit sítě se shodnou funkcí. Naproti tomu nadměrná tvorba G4 může inhibovat aktivitu *c-myc*, kdy sekundární struktury působí jako překážky, které zabraňují vazbě transkripčních faktorů s výslednou inaktivací genu [51, 69, 70]. Tento mechanismus byl popsán ve studii z roku 2009, kde prostřednictvím stabilizace G4 docházelo k inhibici exprese *c-myc* nukleolinem [51, 69]. Preferenční vazba proteinu p53 na jednovláknovou DNA byla jednoznačně prokázána a v návaznosti na to byla popsána i afinita p53 na lokální struktury DNA přítomné jako non-B DNA, tedy „nedvouvláknová“ DNA [23, 73]. Topologie DNA značně přispívá k regulaci afinity a specifity proteinu p53 k DNA. Obecně je možné říct, že se protein p53, jako transkripční faktor, váže na různé struktury DNA stabilizované topologickým stresem, jako jsou například i sekvence tvořící G4 [22]. C-terminální doména proteinu p53 je nezbytná pro jeho účinnou a strukturně selektivní vazbu na DNA. Proto se předpokládá, že je důležitější pro vazbu G4 na DNA v porovnání s centrální doménou proteinu p53 [23].

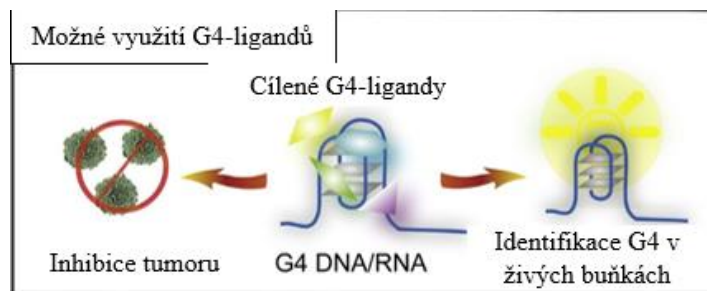


Obrázek 6: Vazba proteinu p53 k lidské DNA. Protein p53 je zde vyobrazen ve své sekvenční formě s čísly aminokyselinových zbytků. Dále je vidět jeho primární, sekundární a terciární struktura. Atom zinku pochází z centrální domény proteinu p53 [74].

Vazbu proteinu p53 na lidskou DNA znázorňuje Obrázek 6. Vazba p53 na DNA ovlivňuje transkripci z regulačních oblastí bohatých na guanin. Mutantní proteiny p53 dokáží modifikovat úroveň transkripce díky interakcím s intronickými a intergenovými sekvencemi, které mají predispozice k tvorbě non-B DNA struktur. Byly provedeny studie, které ukázaly schopnost p53 rozpoznávat G4 DNA *in vivo* [23]. Protein p53 dokáže stabilizovat G4, nicméně tato interakce může být stejně tak zprostředkována interakcí s dalšími G4-rozpoznávajícími transkripční faktory, jako je ETS1 nebo SP1 [75–77]. U promotoru *c-myc* byla u jeho G4 sekvence prokázána interakce s proteinem p53, tato interakce inhibovala transkripci *in vitro* a u lidských buněčných linií [23, 78]. Cílení na jedinečnou G4 strukturu bylo proto navrženo jako slibný nástroj pro léčbu různých onemocnění, včetně některých onkologických onemocnění [54, 62].

2.3 G4-ligandy

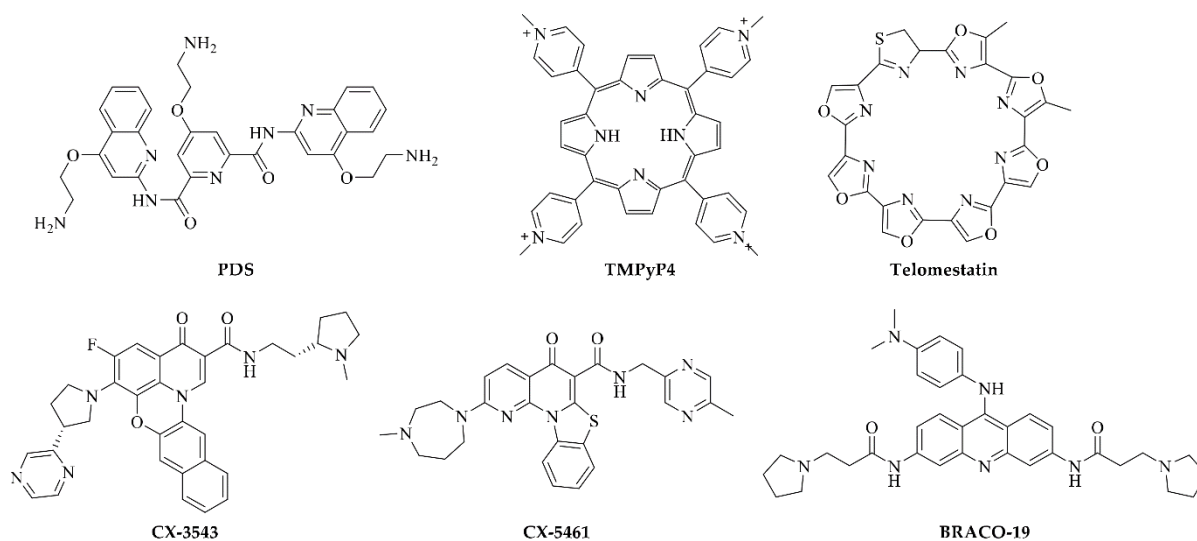
Využití regulačních funkcí G4, pomocí chemických a biologických nástrojů, by mohlo být úspěšnou cestou k regulaci důležitých buněčných procesů [51, 57]. Za slibnou strategii pro vývoj nových protinádorových i antivirových léčiv je považována identifikace malých organických molekul schopných selektivně se vázat a stabilizovat G4, tzv. G4-ligandů [57, 79]. Vysoký konformační polymorfismus G4 zvyšuje počet možných způsobů vazby G4-ligandů, což je hlavní výzvou pro současnou výzkumnou činnost [51, 57]. Navzdory komplikacím spojených s léčbou, jedna z nejznámějších aktivních sloučenin zacílená na G4, tzv. quarfloxin, dosáhla na klinické úrovni velkého úspěchu a inspirovala tak k výzkumu nových G4-ligandů [51, 80]. Využití G4-ligandů graficky znázorňuje Obrázek 7.



Obrázek 7: Potenciální využití G4-ligandů, kdy je možné cílit na konkrétní G4 sekvence a inhibovat tak vznik nádorů. Také tak mohou být identifikovány G4 v živých buňkách [51].

G4-ligandy mohou být přesně zacíleny na různé G4 v různých částech DNA sekvencí a specificky regulovat konkrétní buněčné děje. Mohou být mířeny například na G4 v telomerických repeticích s dopadem na inhibici telomerázy, v genových promotorech s dopadem na regulaci transkripce nebo se objevují v sekvencích RNA s dopadem na genovou expresi [51].

Tvorba, proliferace i migrace nádorů má komplikované regulační mechanismy, během kterých jsou hlavními kritickými faktory poruchy regulace genové exprese. Bylo prokázáno, že G4 jsou zapojeny do inhibice aktivity telomerázy a mohou tak způsobit zkrácení telomer [51, 81]. U nádorových buněk, s nežádoucí nadměrnou expresí telomerázy, byla protinádorová strategie indikována stabilizací telomerních G4 pomocí G4-ligandů. Stabilizované telomerické G4 motivy učiní telomerické konce nevhodné pro vazbu telomerázy, což vede k její inhibici [51]. Blokované struktury G4 uvolňují komplex proteinů, tzv. shelterinů z oblasti telomer, což vede k absenci ochrany telomer před degračními mechanismy [51, 82, 83]. Všechny tyto účinky podporují dysfunkci telomer v nádorových buňkách a mohou vést k jejich apoptóze. Tato cesta se stala slibným směrem pro vývoj protinádorové terapie a byla vyvinuta řada G4-ligandů – příkladem lze uvést telomestatin, TMPyP4, Phen-DC, PDS nebo BRACO-19, jejich chemické vzorce viz Obrázek 8 [51]. Dalším potvrzeným ligandem je N-methyl mesoporphyrin IX, který prokazatelně stabilizuje G4. Dokáže tak zesílit interakci proteinu p53 s tímto G4 vytvářeným v lidských telomerických repeticích [23, 78].



Obrázek 8: Chemické vzorce vybraných G4-ligandů [55].

Kromě inhibice telomerázy a regulace tvorby G4 související s dysfunkcí telomer je cílení na G4 motivy v genových promotorech dalším regulačním mechanismem zprostředkovaným G4. G4 motivy v promotorových oblastech jsou úzce spojeny s transkripcí. Jejich tvorba zde mnohdy znamená zvýšení její hladiny, a to odpovídá některým případům aktivace onkogenu. G4 v oblastech promotoru onkogenu jsou dalším důležitým cílem pro protinádorová léčiva, protože regulace tvorby G4 prostřednictvím G4-ligandů by mohla mít dopad na genovou transkripci a translaci v nádorových buňkách. Bylo navrženo několik účinných G4-ligandů jako jsou například deriváty isaindigotonu [51].

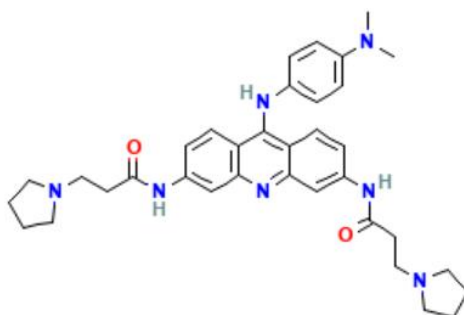
Velká část G4-ligandů má společné definované strukturní rysy, jako je rozšířené aromatické jádro, které upřednostňuje π - π interakce na terminálních G-kvartetech, a jeden/více flexibilních postranních řetězců [62]. Obecně některé navržené ligandy obsahují hlavní strukturu s planárním aromatickým jádrem jako je anthracen, fenanthrolin nebo naftalen [51]. Většina G4-ligandů nese jeden nebo více kladných nábojů, které mohou být důležité pro elektrostatické interakce se záporně nabitou páteří DNA/RNA, někdy i za cenu selektivity [62].

Velké množství G4-ligandů však působí na více G4. Mají sice větší sklon vázat se ke konkrétním cílům, avšak stále se částečně vážou i na jiné než cílené G4. Dosáhnout úplné selektivity je obtížné kvůli již zmíněné konformační podobnosti mezi různými G4 a kvůli složitosti buněk. Kromě toho mají malé molekuly omezená místa interakce a vymezení jednotlivých G4 cílů zůstává náročné ve složitých buněčných prostředích. Bylo vyvinuto mnoho přístupů založených např. na derivatizaci, screeningu nebo nově i na využití nanočástic, které relativně účinně generují selektivní G4-ligandy [51].

2.3.1 Syntetické G4-ligandy

G4-ligandy jsou malé molekuly, které se mohou vázat na G4 s vysokou afinitou. Byly syntetizovány sloučeniny schopné vázat a stabilizovat tyto struktury za fyziologických podmínek a byl prokázán jejich potenciál interferovat s telomerickými sekvencemi nebo měnit transkripci onkogenu [55, 62].

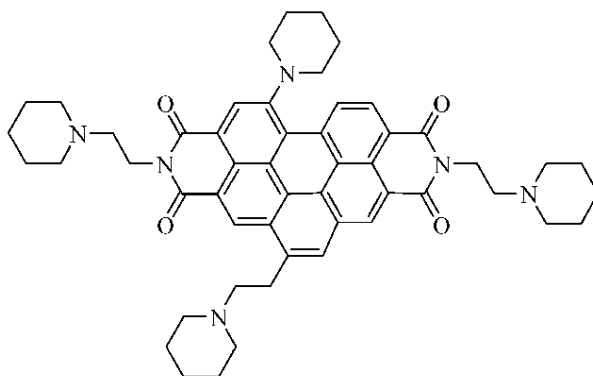
Za zmínku stojí akridinový derivát BRACO-19 (N,N'-(9-{[4-(dimethylamino)phenyl]amino}acridin-3,6-diyl)bis(3-pyrrolidin-1-ylpropanamid)), který je účinným a vysoce specifickým G4-ligandem syntetizovaným poprvé v roce 2006 [57]. Strukturní vzorec sloučeniny BRACO-19 znázorňuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Struktura BRACO-19 [84].

Nedávno byla prokázána schopnost BRACO-19 inhibovat aktivitu telomerázy, kdy u buněk lidského glioblastomu docházelo ke spuštění reakce na poškození DNA u telomer uvolněním telomerních G4 struktur a vystavením chromozomálních konců dráze pro poškození DNA. Rozvolňování G4 bylo následováno degradací struktury T-smyčky, což mělo za následek zastavení buněčného cyklu zprostředkovaného proteinem p53 a p21, krátkodobou apoptózou a senescencí [12, 62].

Příkladem selektivního G4-ligandu, který prokázal velmi slibné výsledky u preklinických testů, je Emicoron (benzo [ghi] perylen-diimid), chemickou strukturu znázorňuje Obrázek 10. Váže a stabilizuje G4 struktury u telomer a způsobí tak jejich poškození, dále má za následek inhibici buněčné proliferace u nádorových buněk, ovšem aniž by ovlivnil životaschopnost buněk zdravých. Cílí na G4 struktury rozptýlené v genomu a jeví se tak jako slibné víceúčelové činidlo. Emicoronové sloučeniny se využívají při léčbě nádorů, které neexprimují protein p53 nebo exprimují jeho neaktivní formu [26, 85, 86].



Obrázek 10: Struktura Emicoronu [85].

Emicoron představuje dobrý příklad protinádorového léčiva schopného současně ovlivňovat více cílů účastnících se několika odlišných signálních drah, a tím zjednodušuje způsob léčby a zlepšuje selektivitu vůči nádorovým buňkám [85].

2.3.2 Přírodní G4-ligandy

Příroda je zásobárnou různorodých chemických sloučenin, které jsou potenciálními kandidáty na léčiva. Tyto přirozeně se vyskytující malé molekuly jsou méně toxické oproti syntetickým molekulám a mají lepší biologickou dostupnost. Bylo mezi nimi identifikováno i několik G4-ligandů se schopností stabilizovat G4 struktury [87]. Například isocholinové alkaloidy, přítomné v rostlinách z čeledi *Fumariaceae*, *Papaveraceae* nebo *Ranunculaceae*, vykazují různé příspěvky ke stabilizaci G4 [88]. Studovány byly kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy, konkrétně sanguinarin nebo chelerythrin, které jsou předmětem zájmu v oblasti výzkumu díky své biologické aktivitě [88–90]. Bylo zjištěno, že sanguinarin (hořký a jedovatý alkaloid) a chelerythrin jsou dobrými stabilizátory jak antiparalelních, tak paralelních struktur, jako jsou ty, které jsou přítomné v segmentu lidských telomer. Experiment provedla skupina Jarošová et. al. v roce 2018, kdy byla zkoumána interakce mezi lidskou telomerickou DNA (HT22), modifikovanou strukturou promotorového segmentu c-kitu (ckit21T21) a celkem šesti benzo[c]fenantridinovými alkaloidy pomocí

různých spektroskopických technik – např. fluorescenční titrace, nukleární magnetická rezonance (NMR) a kompetitivní dialýza [88].

Telomestatin je typickým příkladem přírodní makrocyclické sloučeniny izolované z aktinomycety *Streptomyces annulatus* 3533-SV4 v roce 2001 a označené za silný inhibitor telomerázy. Tento polyamin interaguje s G4, zvyšuje stabilizaci telomerické G4 DNA a inhibuje tak polymerázovou reakci [51, 91].

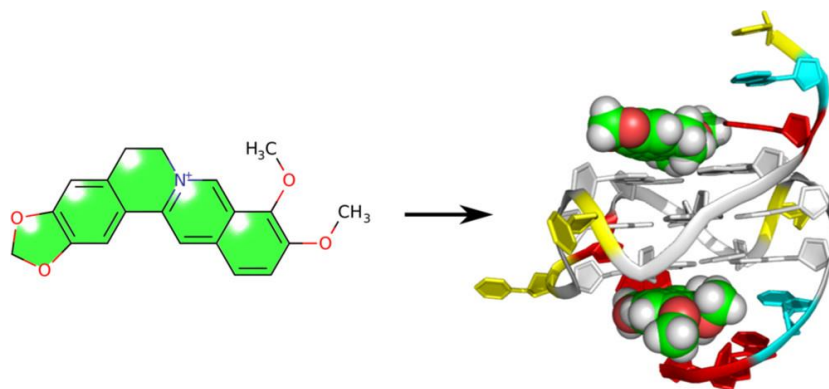
Již několik let se svět obrací k používání bylinných přípravků a přírodních produktů k získávání účinných biologických složek proti onkologickým onemocněním. Tento trend je způsoben hlavně vážnými vedlejšími účinky konvenční léčby [13]. Od roku 1981 do roku 2010 bylo vyhodnoceno, že přibližně 80 % protinádorových léků se izolovalo nebo napodobovalo přírodní produkty, zatímco pouze 20 % bylo syntetizováno v laboratořích [13, 92]. Interakce přírodních alkaloidů s G4 strukturami je podrobně studována [87]. V této práci byly otestovány níže zmíněné látky, u kterých byla prokázána jejich aktivita vůči G4, a které se běžně vyskytují v potravinách nebo doplňcích stravy. Bude se jednat o berberin, kurkumin, kyselinu ellagovou a kvercetin.

2.3.2.1 Berberin

Berberin je rostlinný benzylochinolinový sekundární metabolit, alkaloid složený ze čtyř aromatických kruhů. Spolu s koptisinem a jatrorrhizinem patří do skupiny kvartérních protoberberinových alkaloidů, které jsou produkovány rostlinami z čeledi *Papaveraceae*, *Berberidaceae* nebo *Fumariaceae* [93]. Berberin nevykazuje žádnou toxicitu, ale naopak má mnoho biologických vlastností – antibakteriální, antimikrobiální a potlačuje růst široké škály nádorů [94–96]. Toho je využíváno v tradiční čínské medicíně už více než 2 000 let. Dnes se berberin běžně užívá jako doplněk stravy v podobě extraktu z kořene Dřišťálu indického (*Berberis aristata*) nebo jako potravinářské barvivo [94].

Nejúčinnější, i když méně zkoumanou, je jeho protinádorová aktivita [97]. Nukleové kyseliny jsou považovány za buněčné cíle berberinu při projevení jeho protinádorové aktivity, a proto bylo v tomto směru provedeno mnoho studií [92, 93, 98–100]. Ty potvrdily vysokou afinitu berberinu ke G4, kdy byla studována interakce berberinu s G4 v experimentálních podmínkách u syntetické dvouvláknové DNA a přítomnost berberinu způsobila jasnou stabilizaci složené struktury [93, 97, 98].

Berberin patří k nejaktivněji studovaným G4-ligandům, má asymetrický skelet se čtyřmi spojenými aromatickými kruhy a methylenedioxy skupinou na jednom konci. Obsahuje konkávní a konvexní stranu, přičemž konvexní strana nese centrální kvartérní dusík, který zavádí (+1) kladný náboj většinou umístěný na této straně molekuly [87]. Bylo prokázáno, že se berberin váže na lidské telomerické a promotorové G-kvadruplexy lidských onkogenů, včetně *MYC*. Jeho vazbu do promotorové oblasti onkogenu *MYC* ukazuje Obrázek 11. Berberin interaguje i s několika proteiny včetně telomerázy, DNA topoizomerázy, NF- κ B (jaderný faktor kappa B) a p53 [94]. Dokáže vyvolat hypomethylaci u promotoru *TP53*, která vede k apoptóze v buňkách lidského mnohočetného myelomu U266 [101, 102].



Obrázek 11: Vazba G4-ligandu berberinu na DNA, konkrétně do promotorové oblasti onkogenu *MYC* [87].

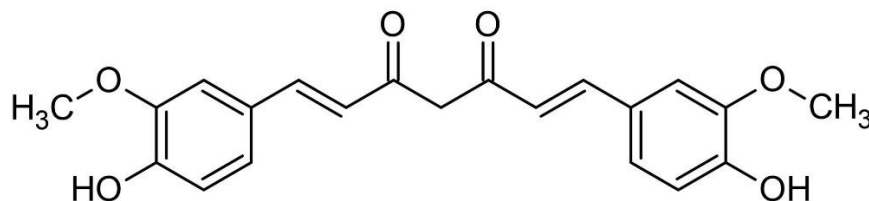
Řada analogů berberinu, s aromatickými skupinami inkorporovanými v poloze 13, je při vyvíjení protinádorové aktivity zpomalující vývoj nádorů účinnější než samotný berberin – např. 13-pyridinealkyl berberin [97]. Substituované berberiny prokazatelně selektivně indukují a stabilizují tvorbu intramolekulárních paralelních G4 [94]. Činí z nich tak slibné protinádorové činidlo u nádorů s *wtp53* [97].

2.3.2.2 Kurkumin

Kurkuminoidy jsou přírodní fenoly zodpovědné za žlutou barvu kurkumy. Řadíme mezi ně i kurkumin (diferuloylmethan), což je přirozeně se vyskytující molekula v kořeni a oddenku kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*). Existuje v několika tautomerních formách, včetně 1,3-diketo formy a dvou ekvivalentních enolových forem [103]. Strukturální vzorec viz Obrázek 12.

Tento sekundární rostlinný metabolit má mnoho léčebných účinků – protizánětlivé, antioxidační, antibakteriální a indukuje apoptózu v nádorových buňkách [104]. Po staletí je široce využíváno jako koření, barvivo a v tradiční indické medicíně k léčbě různých onemocnění, jako je revmatismus, poruchy jater nebo i kašel [105].

Jeho nízká cena a schopnost modulovat aktivitu více cílů z něj činí vhodné činidlo k prevenci různých onemocnění a pro léčbu onkologických onemocnění [13, 103]. Kurkumin je však nerozpustný ve vodě a vykazuje nízkou biologickou dostupnost, což je překážkou pro jeho uplatnění při léčbě onkologických onemocnění. Řešení by se mohlo skrývat ve využití nanočástic, enkapsulace nebo použití polyethylenglykolu [103, 104, 106].



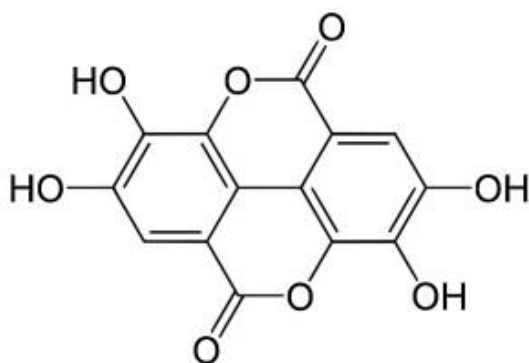
Obrázek 12: Strukturální vzorec kurkuminu [13].

Kurkumin působí jako specifický ligand pro G4 regulující aktivitu telomerázy, čímž reguluje apoptózu buněk [107]. Jedna z výzkumných skupin analyzovala interakci přírodních polyfenolů – kurkuminu a kyseliny ellagové, s G4 *KRAS* genu, kdy kurkumin tuto G4 strukturu stabilizoval [103]. Podobně se sledovaly vazebné účinky kurkuminu a jeho analogů s biologicky relevantní sekvencí v oblasti lidského promotoru *c-myc* tvořící G4 strukturu pomocí různých

spektroskopických technik [108]. Byly studovány různé analogy kurkuminu, například methoxy-benzylidenový derivát kurkuminu, a sledovány interakce s G4 [105]. Pomocí CD bylo prokázáno, že lidská telomerická sekvence AG₃ (T₂AG₃)₃ interaguje s tímto analogem a došlo ke stabilizaci G4 přítomného v sekvenci [104, 105]. Analog se v porovnání se samotným kurkuminem váže na G4 s dvojnásobně sníženou afinitou [104].

2.3.2.3 Kyselina ellagová

Kyselina ellagová (dilakton kyseliny hexa-hydroxydifenové) patří mezi přírodní polyfenoly vyskytující se například v čaji [102, 103]. Strukturální vzorec viz Obrázek 13. Tento přírodní antioxidant se nachází ale i v řadě druhů ovoce – příkladem jsou maliny, jahody, ostružiny nebo granátové jablko. Byla také nalezena v několika druzích medu, vlašských a pekanových ořešcích [109]. Antiproliferativní vlastnosti kyseliny ellagové mohou být způsobeny její schopností přímo inhibovat vazbu DNA na určité karcinogeny, včetně nitrosaminů a polycyklických aromatických uhlovodíků. Stejně jako u jiných polyfenolových antioxidantů se chemoprotektivní účinek kyseliny ellagové projevuje snížením oxidačního stresu [103].



Obrázek 13: Strukturální vzorec kyseliny ellagové [103].

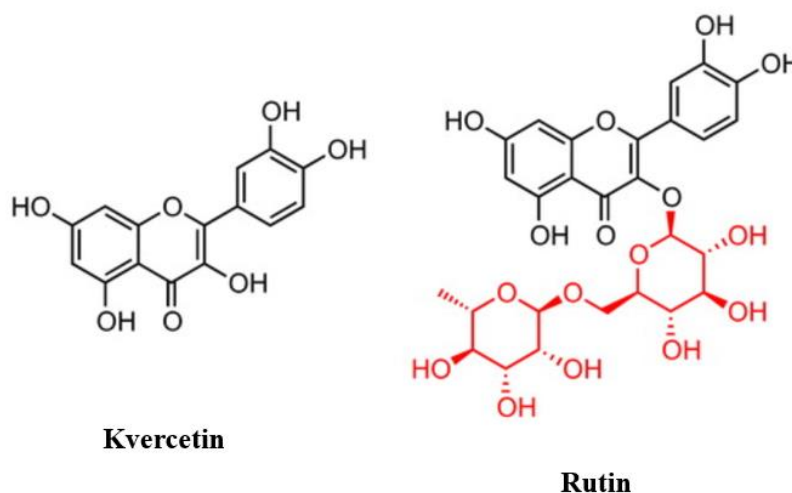
Studie, kde byla zkoumána stabilizační aktivita G4 u onkogenu *KRAS* a kurkuminu a kyseliny ellagové *in vitro*, potvrzují jejich vazbu na G-kvadruplexy [102]. Absorbční a fluorescenční spektroskopická studie naznačila, že kyselina ellagová a kurkumin mohou stabilizovat strukturu G4 onkogenu *KRAS*. Tato skutečnost byla potvrzena zvýšenou teplotou tání struktury kvadruplexu. Kyselina ellagová váže G4 s vyšší afinitou ve srovnání s keto i enol formami kurkuminu [103]. Kurkumin vykazoval vyšší specifitu ve vazbě s G4 ve srovnání s duplexní DNA. Kyselina ellagová prokázala dvě vazebná místa v G4 DNA, jedno z nich s menší afinitou [103].

2.3.2.4 Kvercetin

Jednou z hlavních skupin přirozeně se vyskytujících molekul jsou flavonoidy, které jsou snadno dostupné v naší každodenní stravě a které jsou považovány za kandidáty na nové netoxické léky pro protinádorovou terapii. Jako příklad lze uvést luteolin, rutin nebo právě kvercetin, které získaly velkou pozornost pro své antiangiogenezní, antiproliferativní a antimetastatické účinky [110]. Kvercetin (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-on), jeden z nejhojněji se vyskytujících flavonoidů, obsahují například rajčata, jablka, kapusta nebo červené víno [111].

U kvercetinů bylo pomocí spektroskopických metod, fluorescence a NMR zjištěno, že může interagovat s G-kvadruplexy [112]. Již dříve jedna ze studií prokázala interakci kvercetinů s monomerními a dimerními G-kvadruplexy tvořenými krátkými telomerickými repeticemi [110]. Studie skupiny Tawani et al. v roce 2017 poskytla příznivé důkazy o interakci kvercetinů s G4 DNA *c-myc* genu a jeho stabilizaci po navázání [110]. Dá se říct, že odhalila potenciál flavonoidů kvercetinů stát se vhodným protinádorovým terapeutikem, který by mohl regulovat expresi *c-myc* genu [110].

Zajímavým ligandem je také rutin, který se skládá z kvercetinů a disacharidu rutinózy. Rutin i kvercetin byl testován proti telomerické G4 DNA obsahující repetici TTAGGG a oligonukleotid dsDNA pomocí ESI-MS (hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací). Experimenty ukázaly, že rutin i kvercetin vykazují srovnatelné hodnoty vazebné afinity ke G4 a že obě sloučeniny tvoří komplex ligand-cíl 1:1. Zatímco kvercetin váže také dsDNA, rutin selektivně interaguje s G4 [113]. Porovnání chemických vzorců těchto dvou sloučenin (kvercetinů a rutinů) znázorňuje Obrázek 14.



Obrázek 14: Struktura kvercetinů a rutinů [113].

2.4 Modelové systémy pro testování vlivu G4-ligandů

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je jednobuněčný organismus tradičně využívaný po staletí pro výrobu fermentovaných nápojů a potravin. V posledních letech však našla využití i jako tzv. „buněčná továrna“ pro funkční analýzu transkripčních faktorů [22, 114]. Patří mezi jeden z nejvíce využívaných modelových systémů pro studium velkého množství buněčných funkcí a pochodů *in vivo* [22, 115].

Kvasinky byly vybrány jako modelový organismus proto, že se jedná o robustní systém s evolučně zachovanými základními částmi transkripčního aparátu. Díky tomu zde může být ektopicky exprimováno mnoho transkripčních faktorů, včetně proteinů patřící do rodiny p53 [22, 115]. Bazální faktory (např. proteiny vázající TATA-Box a největší podjednotka RNA polymerázy II) a komplexy modifikující chromatin (např. histondeacetylázy) mezi kvasinkami a lidskými buňkami jsou dobře konzervovány [115, 116]. Nicméně pozorování dokazují, že ne

všechny typy savčích transkripčních domén účinně interagují s kvasinkovým transkripčním aparátem [115, 116].

V kvasinkách umožňují expresi lidských transkripčních faktorů konstitutivní, inducibilní a represibilní promotory [115, 117–119]. Klíčové pro studium proteinů rodiny p53 bylo využití inducibilního promotoru *GALI*, kdy může být ovlivněna rychlost jeho transkripce úpravou množství galaktózy v médiu [115, 120]. Současně lze bazální exprese transkripčních faktorů z promotoru *GALI* dosáhnout s použitím rafinózy jako zdroje uhlíku (budou se exprimovat i bez přítomnosti galaktózy) [115, 121]. Všestranným přístupem pro *in-vivo* mutagenězi u *Saccharomyces cerevisiae* je tzv. *Delitto perfetto* [115]. Jedná se o místně specifický *in vivo* systém mutageněze, který umožňuje účinně upravovat kvasinkové kmeny ve dvou krocích, kdy se spoléhá na homologní rekombinaci k řízení změn v cílové DNA oblasti [122]. Dochází tak k rychlému zacílení požadovaných RE proti směru od minimálního promotoru pro řízení exprese reportérového genu [115, 120, 123].

Kvasinkový expresní systém umožňuje snadnou editaci genomu a je tak možné rychle konstruovat kvalitativní nebo kvantitativní reportérové systémy s využitím izogenních kmenů. Ty se liší pouze na úrovni specifického p53-RE pro zkoumání sekvenční specifity transaktivace závislé na p53. Další výhodou je dostupnost regulovaných systémů pro ektopickou expresi p53, což umožňuje hodnocení transaktivace v širokém rozsahu exprese proteinu [124]. U kvasinek lze promotory navrhnout tak, aby obsahovaly příbuzné cílové RE DNA, a může tak být modulována rychlost exprese reportérových genů (Obrázek 15) [22, 115]. Lze navrhnout takové reportérové kmeny, u kterých je možné sledovat dopad umístění sekvence vhodné k tvorbě G4, na transaktivaci proteinu p53 [14].



Obrázek 15: Příklad konstruktů pro kvasinkový kmen s *LUC1* reportérem a vloženým specifickým RE DNA. V našem případě mluvíme o RE pro protein p53 pod inducibilním promotorem *GALI*. PCYC1 je označení pro minimální promotor [124].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Agar biotechnologický (SIGMA ALDRICH)

Agarosa (SERVA)

Základ pro kompletní kvasinkové médium YPD broth (SIGMA ALDRICH)

Základní médium s dusíkem bez obsahu aminokyselin – Yeast NitrogenBase (SIGMA ALDRICH)

Síran amonný (DUCHEFA BIOCHEMIE)

Rafinóza pentahydrát (VWR)

Galaktóza (ALFA AESAR)

100% DMSO (SIGMA ALDRICH)

Alamar Blue (THERMO FISHER)

Barvivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10 000x (BIOTIUM)

Nosičová DNA – Salmon sperm (THERMOFISHER)

Syntetické oligonukleotidy PUMA, PUMA-KSHV, PUMA-KSHV-mut1.5 (SIGMA ALDRICH)

Kurkumin (SIGMA ALDRICH)

Kyselina ellagová (APOLLO SCIENTIFIC)

Berberin chlorid (ALFA AESAR)

Kvercetin dihydrát (ALFA AESAR)

Thioflavin T (SIGMA ALDRICH)

3.1.2 Biologický materiál

Plazmidová DNA pRS-315 (Biofyzikální ústav akademie věd ČR) (Tabulka 1)

Plazmidová DNA pRS-p53 (laboratoř profesora Alberta Inga, CIBIO institut v Trentu, Itálie) (Tabulka 1)

Tabulka 1: Použitá plazmidová DNA s inzerty.

Plazmidová DNA	Inzert	Selekční marker
pRS-315	-	<i>LEU2</i> , promotor pro syntézu leucinu
pRS-p53	wtp53	<i>LEU2</i> , promotor pro syntézu leucinu

Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* (Biofyzikální ústav akademie věd ČR) (Tabulka 2)

Tabulka 2: Vybrané kmeny *Saccharomyces cerevisiae* s vloženými sekvencemi.

Kmen	Vložená sekvence
yLFM PUMA	CTGCAAGTCCTGACTTGTCC
yLFM PUMA-KSHV	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGGGCGGGGACGGGGGAGGGG
yLFM PUMA-KSHV-mut1.5	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGAGCGGTGGACGGTGGAGGAG

3.1.3 Ostatní materiály

Izolační kit E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini kit (OMEGA BIO-TEK)

Bright Glo Luciferase assay system kit (PROMEGA)

Sterilní párátko

3.1.4 Roztoky a jejich příprava

Zásobní roztok adeninu – 0,5% v 0,1M NaOH

Zásobní roztok histidinu – 1% ve sterilní H₂O

Zásobní roztok lysinu – 3% ve sterilní H₂O

Zásobní roztok uracilu – 1% v 0,1M NaOH

Zásobní roztok tryptofanu – 1% ve sterilní H₂O

TAE 50x 1 l – 242 g Tris p.a., 18,6 g EDTA, 57,1 ml kyselina octová, doplněná Milli-Q H₂O

Zásobní roztok TE 1x; pH 7,5

Zásobní roztok 50% PEG

Zásobní 0,1 M roztok LiAC; pH 7,5

PEG/LiAC/TE 3 ml – 300 µl TE; 300 µl LiAC; 2,4 ml PEG

LiAC/TE 20 ml – 2 ml LiAC, 2 ml 1xTE, 16 ml sterilní H₂O

PBS 1x

20% dextrosa

1 M Tris-HCl; pH 7,5

10 mM Tris-HCl; pH7,5

3 M KCl

3.1.5 Média použitá ke kultivaci kvasinkových kultur

Kompletní neselektivní tuhé YPDA médium

50 g/l YPD, 40 ml/l 0,5% adenin, 2% agar, sterilní voda

Kompletní neselektivní tekuté YPDA médium

50 g/l YPD, 40 ml/l 0,5% adenin, sterilní voda

Syntetické leucin selektivní médium (1A)

6,7 g/l YNB, 2% agar, 2% dextróza, 40 ml/l 0,5% adenin, 2 ml/l 1% histidin, 3 ml/l 3% lysin,

2 ml/l 1% uracil, 2 ml/l 1% tryptofan, 2,5 g/l síran amonný, sterilní voda

Syntetické selektivní médium (SR1A)

6,7 g/l YNB, 2% rafinóza, 40 ml/l 0,5% adenin, 2 ml/l 1% histidin, 3 ml/l 3% lysin, 2 ml/l 1%

uracil, 2 ml/l 1%tryptofan, 2,5 g/l síran amonný, sterilní voda

3.1.6 Laboratorní přístroje a zařízení

Spektrofotometr Nanodrop 2000 (THERMO SCIENTIFIC)

Autokláv Microjet Personal Microwave Autoclave (ENBIO)

Centrifuga 5804R (EPPENDORF)

Dokumentační systém pro focení gelů Amersham Imager 680 (GE HEALTHCARE)

Elektroforetická aparatura Mini Protean Tetra Cell System (BIO-RAD)

ELISA reader – Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BIO-TEK)

Inkubátor innova44 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC)

MiniSpin plus (EPPENDORF)

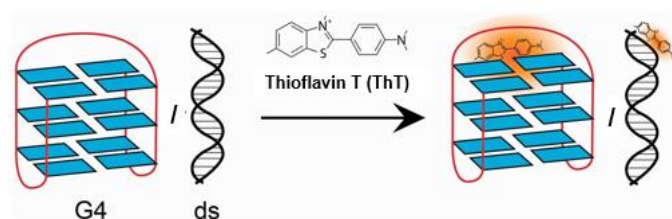
Sada mikropipet (VWR)
 Multikanálová pipeta (GILSON)
 Automatická pipeta (EPPENDORF)
 Termoblok Termomixer comfort (EPPENDORF)
 Třepačka Mini Shaker (VWR LIFE SCIENCE)
 Váha analytická (A&D INSTRUMENTS LTD)
 Váha stolní Scout Pro SPU 402 (OHAUS)
 Vortex 4 digital (IKA)
 Vortex MS3 digital (IKA)
 Zdroj napětí PowerPac 300 (BIO-RAD)
 Spektrofotometer (IMPLEN)
 Spektrofotometr SPECORD 210 PLUS (ANALYTIK JENA)
 CD spektrometr JASCO815 (JASCO INTERNATIONAL CO.)
 Flow-box – Bio II Advance Plus (TELSTAR)

3.2 Metody

3.2.1 ThT kompetiční test – ověření interakce ligandů a G4-sekvence *in vitro*

Thioflavin T (ThT) se využívá jako fluorescenční světelná sonda pro tvorbu G-kvadruplexů, kdy se stává fluorescenčním v přítomnosti G4 struktury [125]. Princip ThT testu znázorňuje Obrázek 16. Syntetické oligonukleotidy (PUMA, KSHV, KSHV-mut1.5) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich a zředěny vodou k dosažení finální koncentrace 100 μM . Poté byly oligonukleotidy zředěny ve 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 100 mM KCl pufru na koncentraci 2 μM . Vzorky byly zahřívány na 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut a poté pomalu ochlazeny na laboratorní teplotu. Thioflavin T byl zředěn vodou na konečnou koncentraci 1 μM .

Experimenty byly prováděny v triplicátech v černé 384-jamkové destičce při laboratorní teplotě. Vybrané oligonukleotidy a ThT byly smíchány v molárním poměru 1:0,5 v konečném objemu 20 μl a konečné koncentraci 1 μM pro DNA a 0,5 μM pro ThT (s přídavkem 1, 3, 6 a 12 μM vybraných ligandů – kurkumin, kvercetin, kyselina ellagová a berberin). Fluorescenční emise byly měřeny při 490 nm po excitaci při 425 nm.



Obrázek 16: Princip ThT testu. ThT se přidá ke struktuře DNA vytvořené předem v prostředí Tris-HCl a KCl pufru. ThT se specificky naváže na G4 za vzniku fluorescenčního signálu. Může se vázat i na jednovláknové nebo dvouvláknové oligonukleotidy, kdy je ale pozorováno výrazně nižší zvýšení fluorescence v porovnání s G4 [125].

3.2.2 Cirkulární dichroismus – ověření interakce ligandů a G4-sekvence *in vitro*

Cirkulární dichroismus (CD) je rozšířená biofyzikální technika pro studium struktur G4 a vazby ligandu založená na skutečnosti, že určité molekuly interagují odlišně s pravým a levým kruhově polarizovaným světlem. Byla vyvinuta kvalitativní pravidla, která spojují spektrální vlastnosti CD s konkrétními topologiemi G4, jmenovitě paralelní, antiparalelní nebo „hybridní“ [126, 127].

CD spektra byla zaznamenána na dichrografu Jasco 815 v mikrokyvetách o délce 1 cm při 20 °C. Syntetické oligonukleotidy (PUMA, KSHV, KSHV-mut1.5) byly naředěny v pufru obsahující Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) o koncentraci 6×10^{-5} M na nukleotid s výsledným objemem 220 μ l. Vzorky DNA byly připravovány zahřátím na 95 °C po dobu 5 minut a poté byly pomalu ochlazeny na laboratorní teplotu. Pro každý vzorek byla pořízena řada čtyř skenů v rozsahu vlnových délek 240–320 nm, s krokem 1 nm a rychlostí skenování 100 nm/min, která byla zprůměrována, vyhlazena a bylo odečteno pozadí. K dosažení požadovaných účinků byly v krocích přidány alikvoty všech čtyř ligandů v poměru 0,1; 1; 2; 3; 4 a 5 ku DNA (50 μ M zředěné v DMSO).

3.2.3 Izolace plazmidové DNA

Z připravených křížových roztěrů cílových kmenů byly odebrané kolonie a přeočkované do 5 ml tekutého LB média se stejným antibiotikem (ampicilin) v poměru 1:1 000. Vzorky byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C a 140 rpm. Poté byly buňky postupně centrifugovány při 10 000 x g po dobu 1 min a přeneseny do 2 ml zkumavek. Po odstranění supernatantu byla z peletů izolovaná plazmidová DNA pomocí E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kitu značky OMEGA BIO-TEK. K buněčným peletům bylo přidáno 250 μ l roztoku I, což je lyzační pufr s obsahem RNázy, suspenze byla řádně vortexována a vzorky byly přeneseny do nových zkumavek o objemu 1,5 ml. Bylo přidáno 250 μ l roztoku II a vzorky byly šetrně promíchány pomalým otáčením zkumavek a inkubovány asi 3 minuty při pokojové teplotě. Nakonec bylo přidáno 350 μ l roztoku III a vzorky byly opět promíchány pomalým otáčením zkumavek do tvorby bílé sraženiny. Lyzáty byly následně 10 minut centrifugovány při maximálních otáčkách centrifugy (14 000 x g). Kolony HiBind® DNA Mini Column byly vloženy do 2 ml sběrných zkumavek a celý objem supernatantů byl opatrně přenesený na kolonu tak, aby se pelet neuvolnil. Kolony byly centrifugovány po dobu 1 minuty na maximálních otáčkách. Lyzáty byly přefiltrovány kolonou a cílová plazmidová DNA zůstala navázána na silikagel v koloně. Obsah sběrných zkumavek byl odstraněn a na kolony bylo opatrně nanášeno 500 μ l HBC pufru s přidáním 100% izopropanolem a opět proběhla centrifugace na maximálních otáčkách. Po odstranění odpadního roztoku a bylo přidáno 700 μ l promývacího pufru s přidáním 100% etanolem. Vzorky poté byly znovu centrifugovány při maximálních otáčkách po dobu 1 minuty. Kolony byly vysušeny centrifugací při maximálních otáčkách a přemístěny do nových 1,5 ml zkumavek a bylo přidáno 50 μ l elučního pufru. Po 1 minutě inkubace byla provedena centrifugace při maximálních otáčkách a byla získána izolovaná plazmidová DNA. U vzorků byla stanovena koncentrace a čistota spektrofotometricky na přístroji NanoDrop.

3.2.3.1 Ověření čistoty DNA pomocí gelové elektroforézy

Pro ověření izolované plazmidové DNA byla využita gelová elektroforéza v agarozovém gelu. Připraven byl 1% agarozový gel – 1 g agarozy rozpuštěn ve 100 ml 1x TAE pufru, a roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě tak, aby nezačal vřít, dokud nebyl roztok čirý. Agarozový gel byl zchlazen pod tekoucí vodou za stálého míchání přibližně na teplotu 55 °C. Bylo přidáno interkalační činidlo GelRed v množství doporučeném výrobcem. Gel byl nalit do elektroforetické vany, byl přidán hřebínek a tuhnutí probíhalo po dobu přibližně 30 minut při laboratorní teplotě. Vzorky DNA byly naředěny pomocí sterilní vody na koncentraci 100 ng/μl ve výsledném objemu 6 μl. K nim byly přidány 3 μl nanášecího pufru „Loading Buffer 6x“. Takto připravené vzorky DNA byly nanášeny na gel pomocí mikropipety. Jako elektrolyt byl použit 1x TAE a na gel bylo použito napětí 90 V/15 minut a poté 110 V/30 minut. Po doběhnutí elektroforézy byl gel vizualizován pod UV-transluminátorem.

3.2.4 Transformace buněk *Saccharomyces cerevisiae* pomocí lithium acetátové metody

Pro sledování závislosti odezvy transkripční aktivity proteinu p53, na základě přítomnosti slabšího nebo silnějšího G4, byly vybrány následující kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* – PUMA, PUMA-KSHV a PUMA-KSHV-mut1.5. Všechny nesou označení yLFM, protože obsahují reportérový gen pro luciferázu *LUC1*, jak znázorňuje Obrázek 15. Kmen PUMA neobsahuje G4, ale RE DNA pro protein p53.

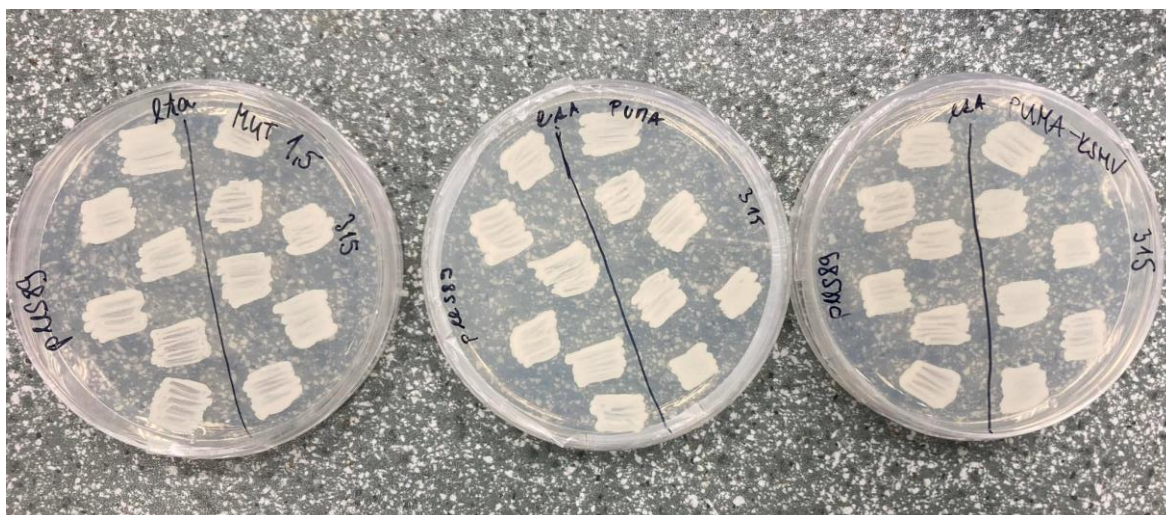
Pravděpodobnost formování G4 struktury byla vyhodnocena pomocí G4-Hunter skóre. Ke stanovení G4-Hunter skóre byl použit nástroj G4-Hunter pro predikci potenciálních G4 struktur. Čím vyšší má sekvence G4-Hunter skóre, tím je vyšší pravděpodobnost pro tvorbu G4. Nástroj G4-Hunter pomocí algoritmu přiřazuje guaninovým bázím kladnou hodnotu, cytosinovým zápornou. Báze jsou rozděleny do skupin sousedících bází a je vypočten aritmetický průměr [128]. Hodnoty G4-Hunter skóre pro vybrané kmeny uvádí Tabulka 3. Kmen PUMA G4 sekvenci neobsahuje, proto v tabulce pro tento kmen není uvedena hodnota G4-Hunter skóre.

Tabulka 3: Vybrané kmeny *Saccharomyces cerevisiae* s typem vložené sekvence a příslušným G4-Hunter skóre. Kmen PUMA kvadruplexovou sekvenci neobsahuje, proto v tabulce pro tento kmen není uvedena hodnota G4-Hunter skóre. Sekvence PUMA je vyznačena tučně.

Kmen	Vložená sekvence		G4-Hunter skóre
yLFM PUMA	CTGCAAGTCCTGACTTGTC	p53 RE	
yLFM PUMA-KSHV	CTGCAAGTCCTGACTTGTCGGGGCGGGGACGGGGGAGGG G	G4	3,182
yLFM PUMA-KSHV-mut1.5	CTGCAAGTCCTGACTTGTCGGAGCGGTGGACGGTGGAGGAG	G4	1,091

Sekvence kmenu PUMA-KSHV má vysoké G4-Hunter skóre, takže bude tvořit G4 s vysokou pravděpodobností. Naopak sekvence u kmenu PUMA-KSHV-mut1.5 je mutovaná a disponuje nízkým G4-Hunter skóre, takže G4 bude tvořit s menší pravděpodobností.

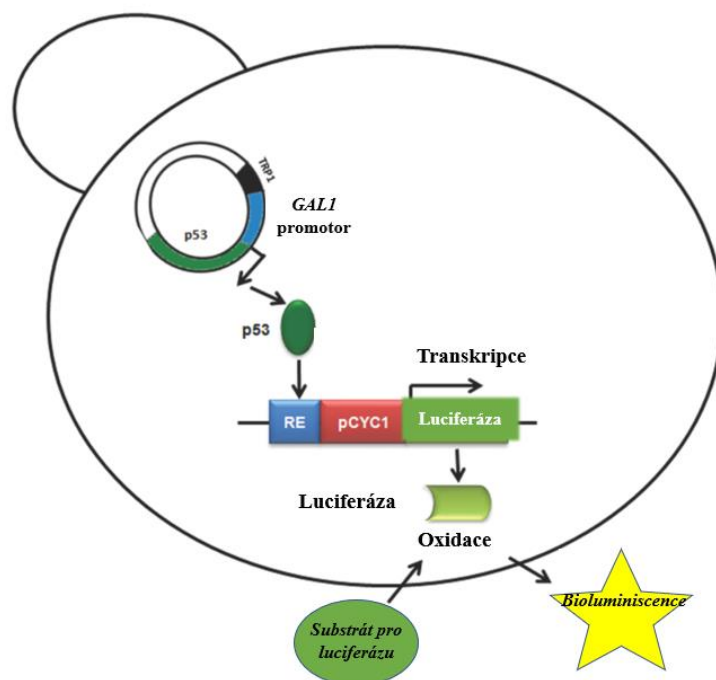
Do těchto kmenů byly transformovány plazmidy pRS-315 nebo pRS-p53, jejichž izolace je popsána v kapitole 3.2.3 Izolace plazmidové DNA.



Obrázek 18: Obdélníkové roztěry jednotlivých transformovaných kmenů *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.5 Luciferázový reportérový test

Pro luciferázový reportérový test byly použity obdélníkové roztěry z kapitoly 3.2.4 Transformace buněk *Saccharomyces cerevisiae* pomocí lithium acetátové metody. Do 96-jamkové destičky bylo napipetováno 200 μ l SR1A média. Sterilním párátkem byla odebrána vždy stejně velká část obdélníku z jednotlivých kmenů a řádně resuspendována v médiu v jamkách. Z každého typu transformantů bylo připraveno vždy 5 opakování. Do dalších 96-jamkových destiček bylo multikanálovou pipetou přeneseno vždy 60 μ l média s buňkami z prvního kroku a do výsledného objemu 120 μ l bylo přidáno médium s požadovaným přídavkem galaktózy – 0 %, 0,05 % a 0,5 %. U takto připravených destiček byla změřena optická densita při 600 nm v čase T₀ a luciferázová aktivita. Poté byly destičky obaleny parafilmem a inkubovány při 30 °C a 160 rpm po dobu 24 hodin. Po 6 a 24 hodinách byly suspenze buněk důkladně rozmixovány multikanálovou pipetou a byla opět změřena optická densita při 600 nm a luciferázová aktivita, a to odebráním 20 μ l kultury z 96-jamkové destičky multikanálovou pipetou a přenesením do 384-jamkové destičky, kdy dva řádky na 96-jamkové destičce odpovídaly jednomu řádku na 384-jamkové destičce. Do každé jamky bylo přidáno 20 μ l 2x koncentrovaného „Passive lysis buffer“ – lyzačního pufru. Destička byla inkubována na 300 rpm po dobu 15 min při pokojové teplotě. Těsně před analýzou bylo nutno přidat 20 μ l luciferázového substrátu „Bright Glo Luciferase assay systema“, k měření chemiluminiscence. Chemiluminiscence byla změřena na přístroji Synergy Hybrid Multi-Mode Microplate Reader. Princip testu znázorňuje Obrázek 19. Intenzita chemiluminiscenčního signálu je vyjádřena jako relativní intenzita chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s příslušným prázdným vektorem (pRS-315).



Obrázek 19: Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* obsahující plazmid pro expresi proteinu p53 pod inducibilním promotorem *GALI*. Protein bude exprimován pouze za přítomnosti galaktózy. Označení pCYC1 je pro minimální promotor. Po indukované expresi se protein váže na příslušné RE, kdy spustí transkripci genu pro enzym luciferázu, která přidaný luciferázový substrát oxiduje na oxyluciferin. Tato reakce je doprovázena emitovaným zářením, které lze detekovat jako chemiluminiscenci [129].

3.2.6 Test viability buněk *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.6.1 Příprava buněk

Pro testy viability buněk byly založeny kultury *Saccharomyces cerevisiae*, kmen PUMA, do tekutého YPDA média. Sterilním párátkem byly odebrány buňky z křížových roztěrů popsanych v kapitole 3.2.4 Transformace buněk *Saccharomyces cerevisiae* pomocí lithium acetátové metody (Obrázek 17) a přeneseny do 50 ml centrifugačních zkumavek s 8 ml tekutého YPDA média. Buňky byly inkubovány přes noc na 30 °C a 130 rpm do druhého dne.

3.2.6.2 Testování působení G4-ligandů

Do 96-jamkové destičky byla napipetována koncentrační řada příslušných ligandů a buněk, vždy v 3 opakováních, s výsledným objemem 200 μ l. Nejvyšší koncentrace byla zvolena 500,00 μ M a postupně ředěna tekutým YPDA médiem až na koncentraci 3,91 μ M. Dále bylo do destičky napipetováno ve 3 opakováních pouze tekuté YPDA médium a 1% DMSO. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l buněk o optické densitě 0,02 při 600 nm. Následně byla měřena optická densita při 600 nm po dobu 24 hodin, přičemž byla vyhodnocena růstová křivka.

Na základě testů viability, byla vybrána vhodná koncentrace ligandů – berberinu, kurkuminu, kyseliny ellagové a kvercetinu. Každý transformant byl ošetřen zvolenou koncentrací ligandu a byl použit stejný protokol pro luciferázový reportérový test. Bylo tak provedeno u každého transformanta a pro každý ligand zvlášť.

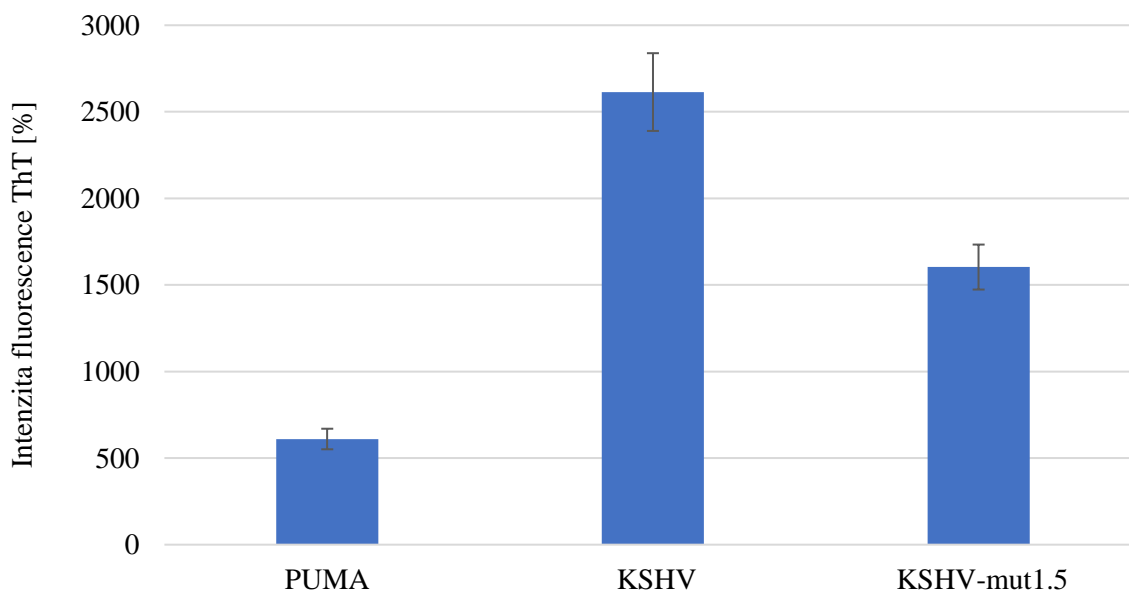
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Testování interakce G4-ligandů *in vitro*

4.1.1 ThT kompetiční test

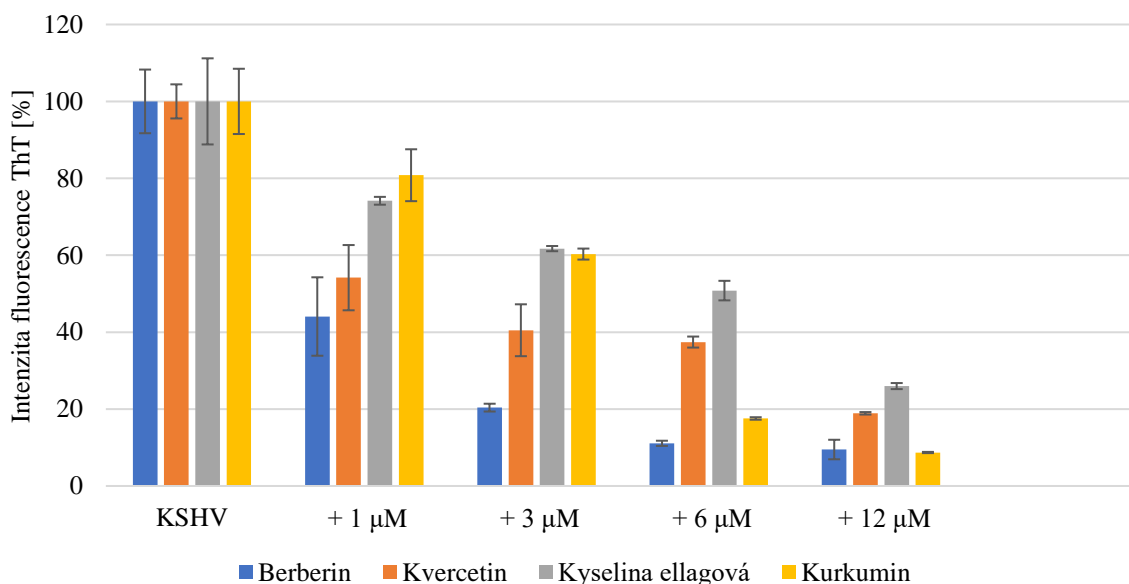
Interakce mezi přítomným G4 a G4-ligandy byla nejprve ověřena *in vitro* pomocí ThT kompetičního testu. Při testu se využívá sloučeniny thioflavinu T, což je benzothiazol, původně využívaný k detekci amyloidních fibril. Thioflavin T funguje jako fluorescenční sonda, kdy se po navázání ThT na G4 strukturu detekuje zvýšení fluorescenčního signálu detekovaného při 490 nm [125].

Byly testovány syntetické oligonukleotidy PUMA, KSHV a KSHV-mut1.5. Oligonukleotid PUMA neobsahuje G4 sekvenci, po přidání ThT tedy nedošlo k navázání, a proto je fluorescenční signál měřený při 490 nm ze všech tří oligonukleotidů nejnižší. Oligonukleotid KSHV obsahuje G4 sekvenci, z toho důvodu byl jeho signál nejvyšší, mutovaná G4 sekvence KSHV-mut1.5 vykazuje oproti KSHV signál nižší. Průměrné hodnoty pro oligonukleotidy s přidaným ThT znázorňuje Graf 1.



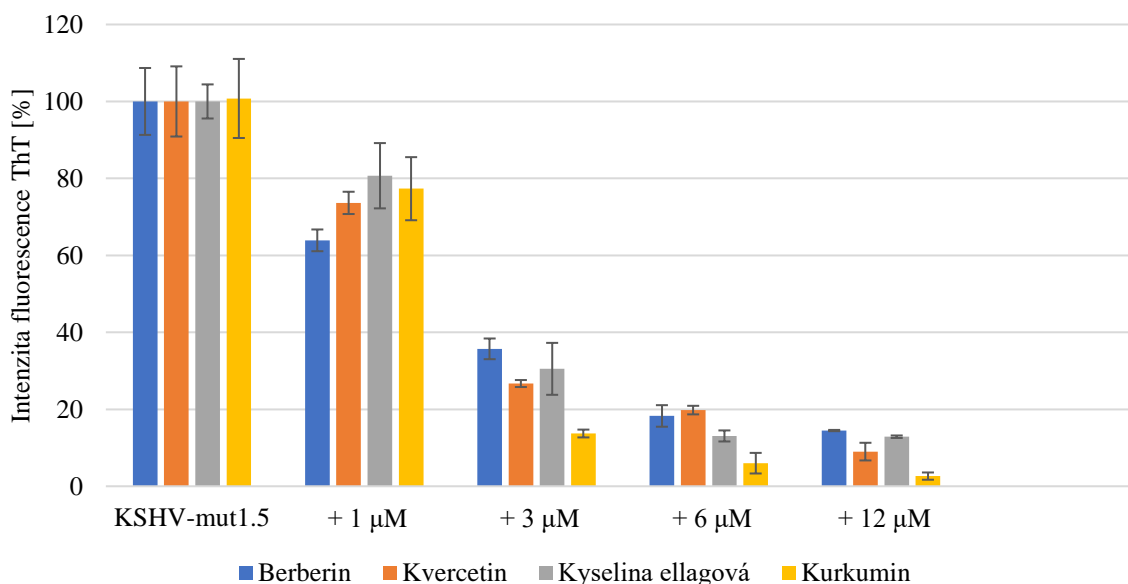
Graf 1: ThT kompetiční test pro syntetické oligonukleotidy PUMA, KSHV a KSHV-mut1.5. Fluorescenční emise byla sbírána při 490 nm po excitaci při 425 nm. Na histogramu jsou zaznačené směrodatné odchylky ze 3 opakování.

K těmto syntetickým oligonukleotidům byly přidávány čtyři ligandy (berberin, kvercetin, kyselina ellagová a kurkumin) v různých koncentracích – 1, 3, 6 a 12 μM . G4-ligand nahrazuje ve vazbě na G4 thioflavin T, což se projeví snížením fluorescenčního signálu. Z výsledků (Graf 2 a Graf 3) je patrné, že se zvyšující se koncentrací ligandů fluorescenční signál klesal – ligand nahradil ThT ve vazbě na G4. Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny v procentech, přičemž signál samotných syntetických oligonukleotidů s ThT vyjadřuje 100 %. U ligandů byla odpočítána autofluorescence jednotlivých ligandů. Výsledky pro kmen PUMA uvádí Příloha 1.



Graf 2: ThT kompetiční test pro syntetický oligonukleotid KSHV a G4-ligandy berberin, kvercetin, kyselinu ellagovou a kurkumin. Ligandy byly přidávány vždy v 1, 3, 6 a 12 μM koncentracích, provedeno vždy ve třech opakováních. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech, kdy oligonukleotid s ThT vyjadřuje 100 %. U ligandů byla odpočítána autofluorescence jednotlivých ligandů. Na histogramu jsou zaznačené směrodatné odchylky ze 3 opakování.

U oligonukleotidu KSHV (Graf 2), obsahující G4 sekvenci, je vidět pokles fluorescenčního signálu po přidávání zvyšující se koncentrace všech čtyř G4-ligandů v porovnání se samotným oligonukleotidem s ThT (100 %). Se zvyšující se koncentrací přidaného ligandu se vždy signál při 490 nm snižoval. Například přidávkem již 1 μM berberinu došlo ke snížení fluorescence ze 100 % na 44 %, přidávkem 1 μM kurkuminu pouze na zhruba 80 %. Srovnatelné poklesy signálu vykazují přidávky 12 μM berberinu a kurkuminu. U ligandu berberinu došlo k úplnému vyvázání ThT již při 6 μM koncentraci, přičemž pro ostatní ligandy byla koncentrace vyšší. Všechny ligandy způsobují pokles ThT fluorescence, takže se váží na G4 motiv, přičemž berberin vykazoval nejlepší vazebné vlastnosti.



Graf 3: ThT kompetiční test pro syntetický oligonukleotid KSHV-mut1.5 a G4-ligandy berberin, kvercetin, kyselinu ellagovou a kurkumin. Ligandy byly přidávány vždy v 1, 3, 6 a 12 μM koncentracích, provedeno vždy ve třech opakováních. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech, kdy oligonukleotid s ThT vyjadřuje 100 %. U ligandů byla odpočítána autofluorescence jednotlivých ligandů. Na histogramu jsou zaznačené směrodatné odchylky ze 3 opakování.

Podobně tomu bylo i u oligonukleotidu KSHV-mut1.5 (Graf 3), obsahující mutovanou G4 sekvenci, kde došlo k poklesu fluorescenčního signálu po přidání všech čtyř G4-ligandů v porovnání se samotným oligonukleotidem s ThT (100 %). Se zvyšující se koncentrací ligandů se fluorescenční signál měřený při 490 nm snižoval. U oligonukleotidu KSHV-mut1.5 došlo k poklesu signálu přidavkem 1 μM berberinu ze 100 % na 63 %. U vyšších přidavků však nejvyšší pokles signálu nevykazoval berberin, ale kurkumin – přidavkem 3 μM kurkuminu došlo ke snížení fluorescence ze 100 % na 13 %, přidavkem 12 μM kurkuminu až na 2 %. U kurkuminu došlo k úplnému vyvázání ThT již při 3 μM koncentraci, přičemž pro ostatní ligandy byla koncentrace vyšší. Kurkumin zde vykazoval nejlepší vazebné vlastnosti. Všechny ligandy způsobily pokles ThT fluorescence, tudíž se navázaly na G4 motiv.

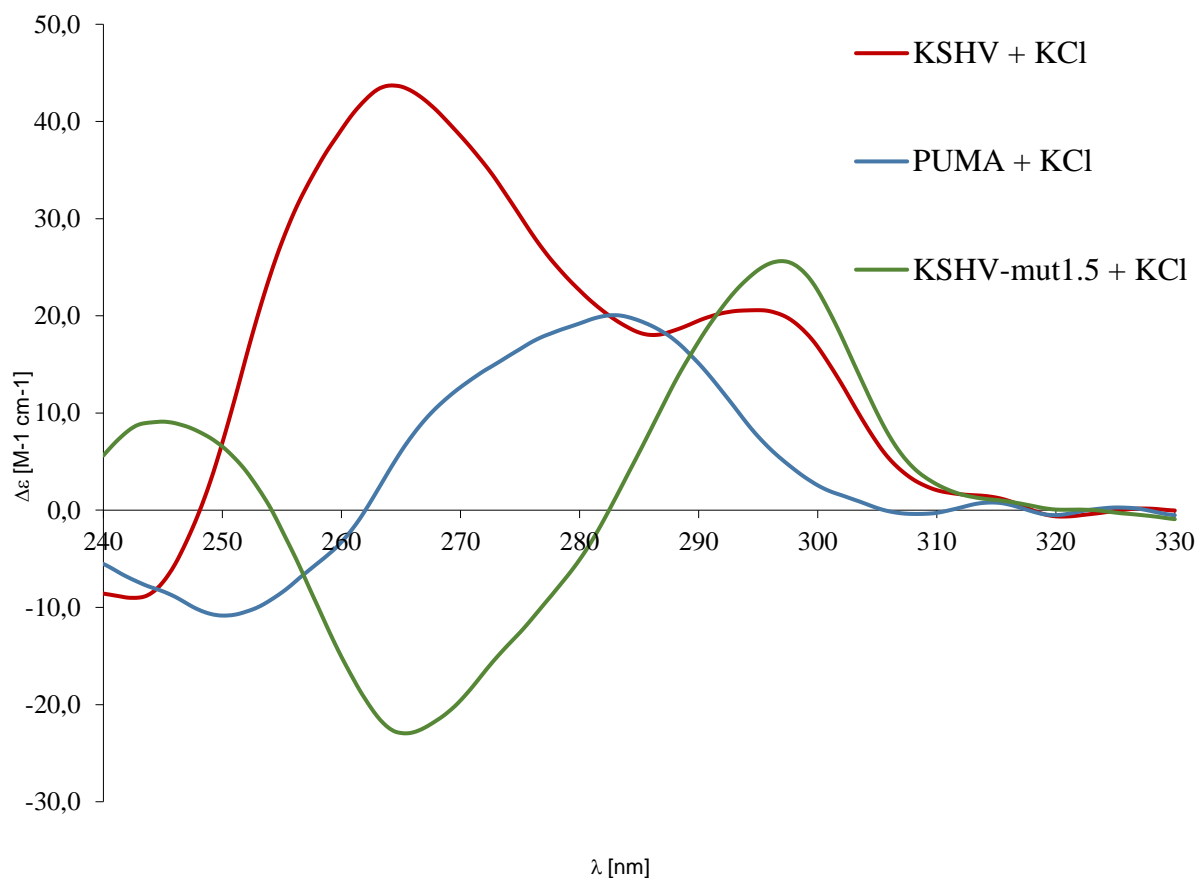
Všechny ligandy nahradily thioflavin T ve vazbě na vybrané sekvence, jak u oligonukleotidu KSHV, tak u KSHV-mut1.5 a vytvořily vazbu s přítomným G4. Z výsledků můžeme říct, že pro oligonukleotid KSHV byl nejúčinnějším G4-ligandem berberin, protože byl detekován nejvýraznější pokles fluorescenčního signálu u jednotlivých přidavků (Graf 2). Pro oligonukleotid KSHV-mut1.5 se ukázal jako nejúčinnější G4-ligand kurkumin (Graf 3).

4.1.2 Cirkulární dichroismus

Afinita G4-ligandů k přítomným G4 strukturám byla ověřena pomocí ThT kompetičního testu. Pomocí CD bylo možné určit konformaci příslušných G4 motivů – paralelní, antiparalelní nebo hybridní. Určení struktury oligonukleotidů sbalených do paralelních a antiparalelních G4 struktur pomocí CD spektroskopie popisuje například práce Vorlíčkové et al. [130].

Syntetické oligonukleotidy byly naředěny v pufru obsahující Tris-HCl a zahřáty na 95 °C, poté ochlazeny a analyzovány. Výsledky formovaných G4 pro syntetické oligonukleotidy

PUMA, KSHV a KSHV-mut1.5 uvádí Graf 4. K oligonukleotidům byl v tomto případě přidán ještě KCl, kdy došlo ke stabilizování struktury.

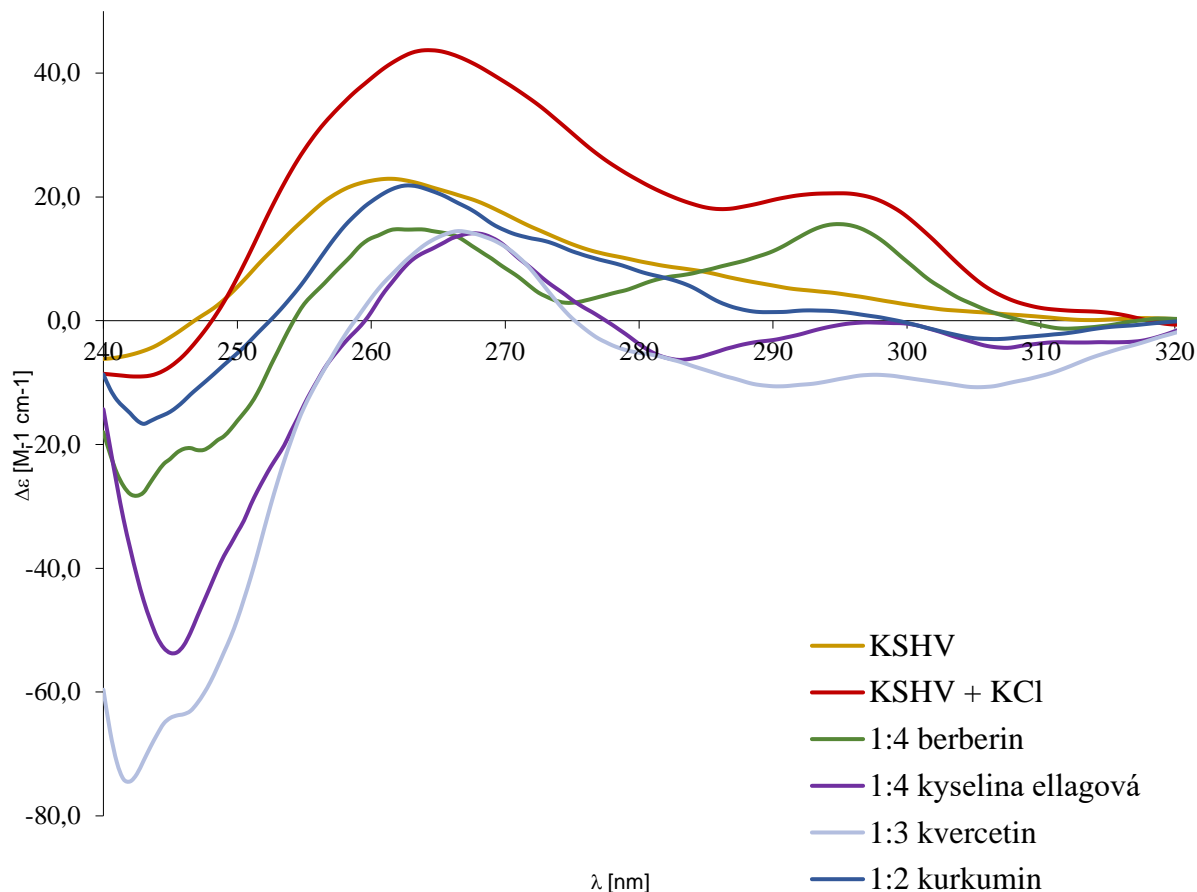


Graf 4: CD spektroskopie G4 u oligonukleotidů PUMA, KSHV a KSHV-mut1.5 a jejich stabilizace pomocí KCl.

G4 zaujímá u oligonukleotidu KSHV hybridní konformaci. Je vidět paralelní pík při 265 nm a antiparalelní pík při 295 nm. Naproti tomu G4 oligonukleotidu KSHV-mut1.5 zaujímá antiparalelní konformaci, charakteristický viditelným negativním píkem při 265 nm a pozitivním píkem při 295 nm [131]. U oligonukleotidu PUMA se žádný pík v oblasti 265 nm ani 295 nm neukázal, protože neobsahuje G4 sekvenci.

K syntetickým oligonukleotidům KSHV a KSHV-mut1.5 byly postupně přidávány ligandy v různých koncentracích, jak je uvedeno v kapitole 3.2.2 Cirkulární dichroismus – ověření interakce ligandů a G4-sequence *in vitro*. Výsledky pro oligonukleotid PUMA uvedeny nejsou, protože zde není přítomna G4 struktura.

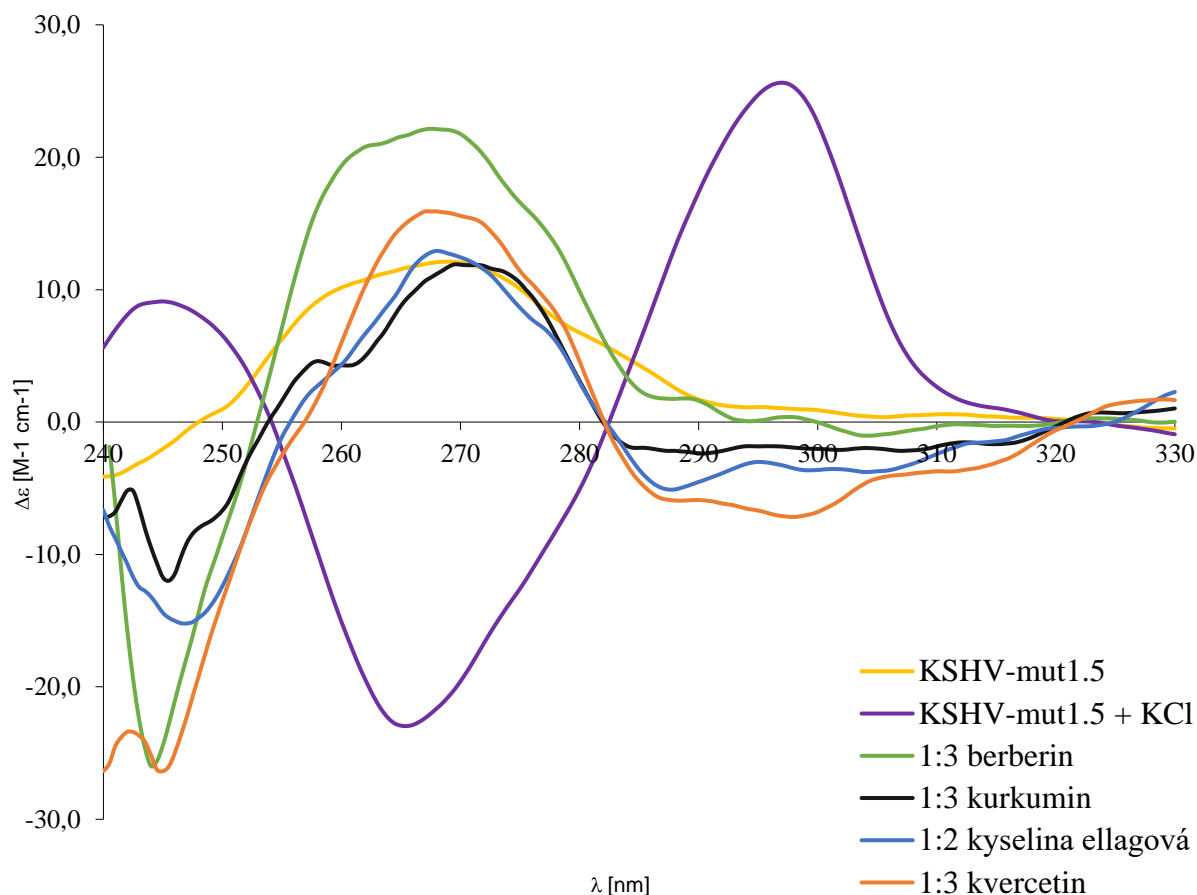
Výsledky CD spektroskopie pro oligonukleotid KSHV s přidávanými ligandy znázorňuje Graf 5. V grafu jsou znázorněny přídavky ligandů v molárním poměru k DNA – 1:4 berberinu, 1:2 kurkuminu, 1:3 kvercetin a 1:4 kyselině ellagové, a KCl.



Graf 5: CD spektra G4 u oligonukleotidu KSHV, KSHV s přidaným KCl a KSHV s přidavky ligandů v molárním poměru k DNA – 1:4 berberinu, 1:2 kurkuminu, 1:3 kvercetinu a 1:4 kyselině ellagové.

Samotný oligonukleotid KSHV v Tris-HCl pufru nevykazuje zřetelný pík charakteristický pro G4. Po přidání KCl došlo k formaci hybridní G4 konformace sekundární struktury s charakteristickými píky při 265 a 295 nm. Přidáním ligandů k sekvenci KSHV bez přidavku KCl docházelo k posunu píků do oblasti charakteristických píků pro hybridní konformaci G4. Nejlepším G4-ligandem se dle grafu jevil berberin (s přidavkem 1:4 molárního poměru), který podporoval stabilizaci G4 struktury v sekvenci KSHV. Tohle zjištění podporuje výsledky ThT kompetičního testu pro oligonukleotid KSHV (Graf 2).

Výsledky CD spektroskopie pro oligonukleotid KSHV-mut1.5 s přidáními ligandy znázorňuje Graf 6. V grafu jsou znázorněny přidavky ligandů v molárním poměru k DNA – 1:3 berberinu, 1:3 kurkuminu, 1:3 kvercetinu a 1:2 kyselině ellagové, a KCl. Samotný oligonukleotid KSHV-mut1.5 v Tris-HCl pufru nevykazuje zřetelný pík charakteristický pro G4.



Graf 6: CD spektra G4 u oligonukleotidu KSHV-mut1.5, KSHV-mut1.5 s přidaným KCl a KSHV-mut1.5 s přidavky ligandů v molárním poměru k DNA – 1:3 berberinu, 1:3 kurkuminu, 1:3 kvercetin a 1:2 kyselině ellagové.

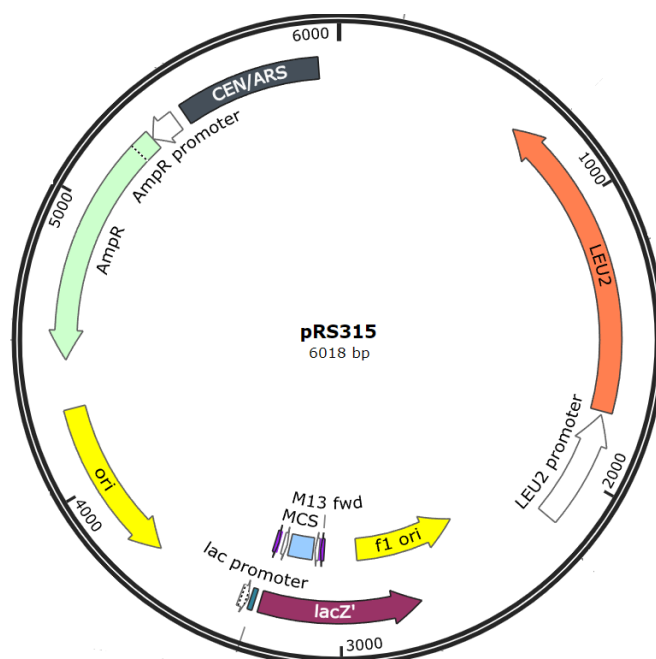
Sekvence KSHV-mut1.5 v přítomnosti KCl vykazuje antiparalelní konformaci G4 struktury. Přídavek G4-ligandů k sekvenci KSHV-mut1.5 bez přítomnosti KCl vedl ke změně konformace G4 struktury, zatímco bez těchto ligandů je vidět typický pík pro antiparalelní konformaci s maximem 295 nm. Po přidání G4-ligandů tento pík mizí a objevuje se maximum okolo 265 nm typické pro paralelní G4 strukturu. Nejvýraznější pík se ukázal u berberinu (s přidavkem 1:3 molárního poměru), všechny G4-ligandy měly na konformaci G4 podobný vliv.

4.2 Příprava plazmidové DNA a transformace kvasinek

Vliv zkoumaných ligandů na transaktivaci proteinu p53 byl zkoumán u kvasinkových expresních systémů. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* protein p53 přirozeně neexprimuje, a proto byla pro tento účel cíleně modifikována. Příprava a namnožení plazmidové DNA s cílovým genem nebyla součástí této práce, nicméně alespoň stručný popis je pro pochopení dalších kroků důležitý.

Pro selekci úspěšně transformovaných buněk byl použit plazmid pRS-315. Tento plazmid má velikost 6 018 bp a zastupuje prázdný vektor s promotorem pro syntézu selekčního markeru – leucinu (Obrázek 20). Dalším plazmidem využitým při transformaci byl pRS-p53, který byl použit za cílem exprese proteinu p53 pod inducibilním galaktózovým promotorem *GALI*.

V plazmidu je obsažen promotor pro syntézu leucinu. Bylo úspěšně docíleno transformace, kdy selekce probíhala na 1A (leucin selektivních) miskách, kdy médium obsahovalo všechny potřebné živiny, kromě aminokyseliny leucin.



Obrázek 20: Komerčně dostupný plazmid pRS-315 s promotorem pro syntézu leucinu jako selekčního markeru. Velikost plazmidu je 6 018 bp a byl využit k selekci transformovaných kvasinkových buněk [132].

Před transformací plazmidů do kvasinkového expresního systému bylo nutné potřebné plazmidy s obsahem cílových genů k plánované expresi namnožit. K tomu byly využity komerčně dostupné kmeny bakterií *Escherichia coli* (STBL3).

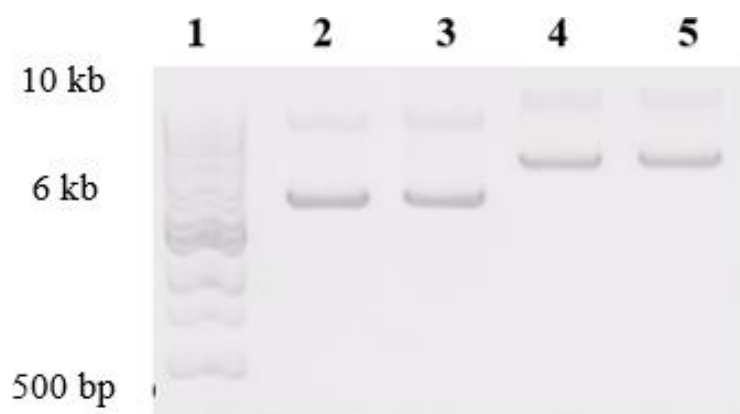
Byly připraveny kompetentní buňky STBL3 a proběhla transformace pomocí teplotního šoku. Transformované plazmidy obsahovaly místo rezistence pro antibiotikum ampicilin, pomocí kterého bylo možné úspěšně selektovat transformované kolonie.

Po transformaci byla plazmidová DNA izolovaná pomocí komerčního kitu. Koncentraci a čistotu izolované plazmidové DNA uvádí Tabulka 4. Dle výsledků je zřejmé, že plazmidy byly izolovány o dostatečné čistotě a koncentraci a byly tak vhodné pro transformaci do kvasinkových expresních systémů.

Tabulka 4: Koncentrace a čistota plazmidové DNA naměřená na přístroji NanoDrop.

Plazmid	Koncentrace [ng/μl]	Čistota 260/280
pRS-315	152	1,88
pRS-p53	203	1,83

Pro ověření správnosti a čistoty izolované DNA byla provedena agarozová elektroforéza (Obrázek 21).



Obrázek 21: Ověření kvality plazmidové DNA agarózovou gelovou elektroforézou. Start 1 – žebříček (500 bp – 10 kb); 2 a 3 – pRS-315; 4 a 5 – pRS-p53.

Takto připravená plazmidová DNA byla poté transformována do vybraných kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* auxotrofních pro leucin.

4.3 Analýza transaktivace proteinu p53 *in vivo*

Transkripční aktivita proteinu p53 byla testována pomocí luciferázového reportérového testu. Princip luciferázového testu spočívá ve schopnosti luciferinu emitovat záření po oxidaci na oxyluciferin. K tomu je zapotřebí enzym luciferáza, k jejíž produkci dochází pouze tehdy, když se protein p53 naváže na odpovídající RE DNA a tím umožní její biosyntézu (Obrázek 19). Množství emitovaného světla indikuje transkripční aktivitu proteinu p53 [133].

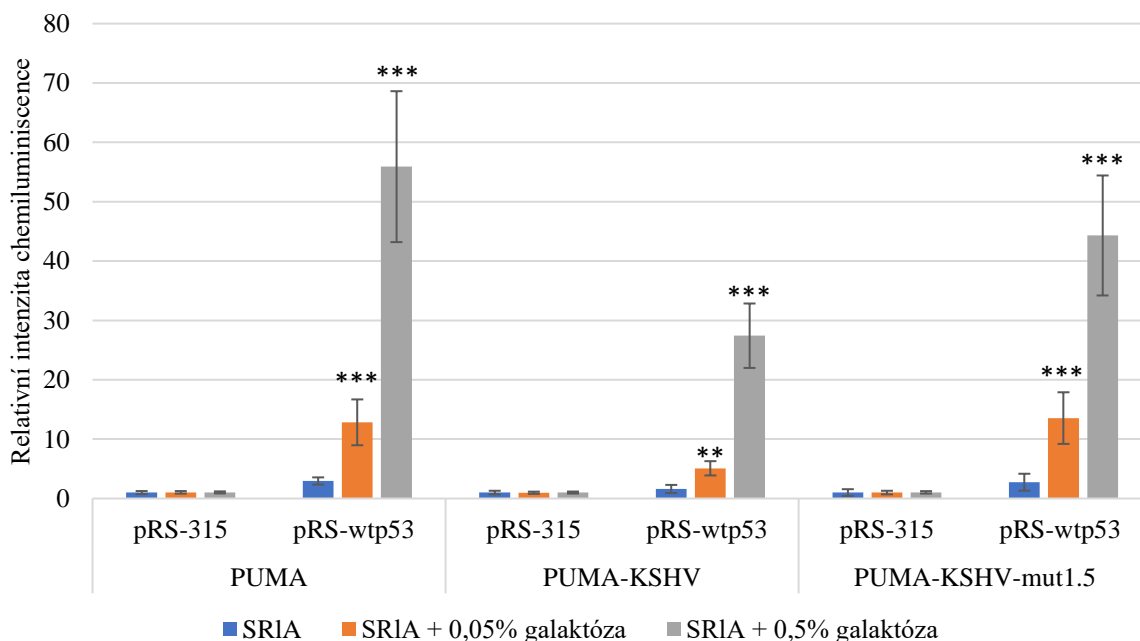
Pro analýzu byly vybrány vhodné kmeny *Saccharomyces cerevisiae* s vazebnými vlastnostmi pro protein p53 s inkorporovanými sekvencemi schopnými tvořit G4. Transformované byly celkem 3 kmeny (Tabulka 3) obsahující reportér *LUC1*, jak znázorňuje Obrázek 15. Kmen PUMA obsahuje RE DNA pro protein p53. Kmeny PUMA-KSHV a PUMA-KSHV-mut1.5 navíc u promotoru v blízkosti p53 RE obsahují inkorporovanou sekvenci schopnou tvořit G4, která ovlivňuje transkripci genu [14, 22].

Byla testována transkripční aktivita proteinu p53. Do vybraných kmenů *Saccharomyces cerevisiae* byly transformovány plazmidy pRS-315 nebo pRS-p53 pro expresi proteinu pod indukčivním galaktózovým promotorem. Transformanti s plazmidem pRS-315 neexprimují protein p53, tudíž vykazovaly velmi nízký chemiluminiscenční signál u luciferázového reportérového testu u všech tří typů médií – s rafinózou, s přidáním 0,05 % galaktózy i 0,5 % galaktózy. Je tomu tak proto, že pokud se protein p53 netvoří, nemůže se vázat na RE DNA u reportérového genu pro enzym luciferázu, a proto nemůže spustit transkripci genu pro luciferázu (Obrázek 19).

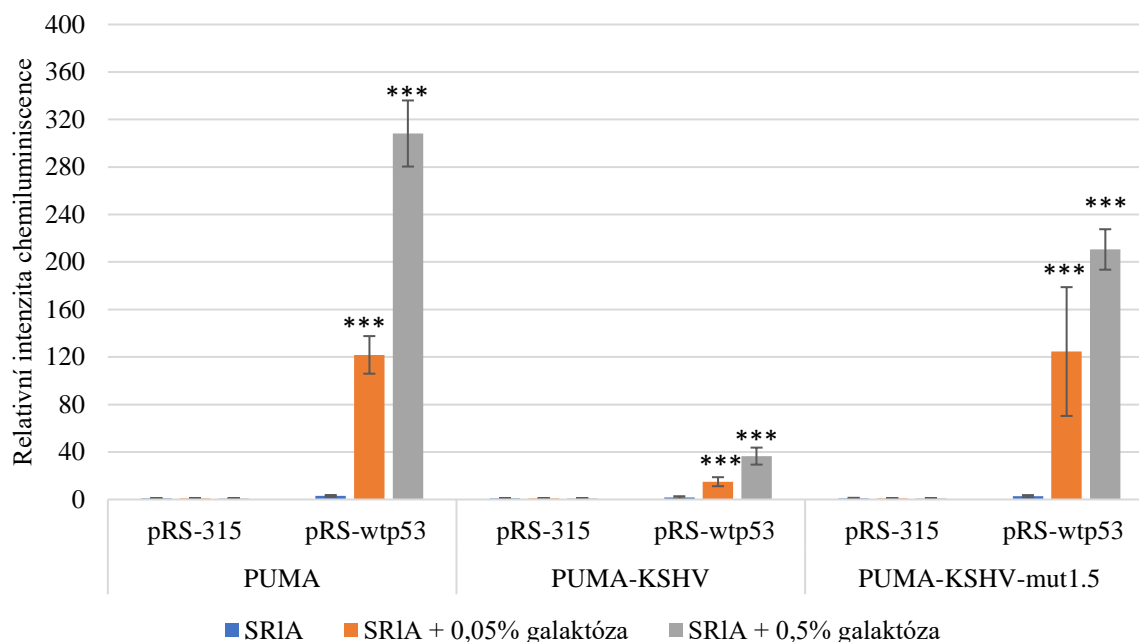
Naopak transformanti s obsahem pRS-p53 protein p53 exprimují, ale pouze za přítomnosti galaktózy. V médiu s přítomnou rafinózou protein není exprimován. Proto lze detekovat vysoký chemiluminiscenční signál u médií s přidáním galaktózy oproti transformantům s pRS-315 nebo u buněk v médiu s rafinózou. S rostoucí koncentrací galaktózy a s narůstajícím časem se signál u transformantů s obsahem pRS-p53 zvyšoval, zatímco u transformantů s pRS-315 byl konstantně nízký.

Výsledky luciferázového reportérového testu jsou u každého kmene uvedeny jako relativní intenzita chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání

s prázdným vektorem (pRS-315). To znamená, že detekovaný chemiluminiscenční signál je vždy vztažen k příslušnému prázdnému vektoru, tedy k buňkám obsahující plazmid pRS-315, kde protein exprimován není. Hodnoty v čase 0 zahrnuje Příloha 2. Výsledky získané po 6 a 24hodinové inkubaci znázorňuje Graf 7 a Graf 8. Statistická významnost je vztažena vždy k příslušnému prázdnému vektoru a znázorněna v grafech hvězdičkami (p hodnota $< 0,05$ *, p hodnota $< 0,01$ **, p hodnota $< 0,001$ ***). Pro každého transformanta bylo provedeno vždy 5 opakování pro každý typ médií, experiment byl pro potvrzení opakovatelnosti proveden třikrát.



Graf 7: Vyhodnocení transaktivační aktivity proteinu po 6hodinové inkubaci v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae*. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost je vztažena vždy k příslušnému prázdnému vektoru (pRS-315) a v grafu znázorněna hvězdičkami ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).



Graf 8: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 24hodinové inkubaci v různých kmenech *Saccharomyces cerevisiae*. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.

Statistické srovnání dat ukázalo, že transformanti s obsahem pRS-p53 kmene PUMA vykazují nejvyšší signál ze všech tří kmenů. Protein p53 se navázal na RE DNA u reportérového genu pro enzym luciferázu (*LUC1*) a docházelo k transkripci genu, což odpovídá vysokému chemiluminiscenčnímu signálu.

Kmen PUMA-KSHV s transformovaným plazmidem pRS-p53 obsahuje G4 sekvenci, která negativně ovlivňuje vazbu proteinu p53 na odpovídající RE DNA a brání tak transkripci genu pro enzym luciferázu [14]. Proto byl detekován nižší chemiluminiscenční signál oproti kmeni PUMA po 6 hodinách inkubace (Graf 7), po 24 hodinách (Graf 8) je vidět pokles markantně.

Kmen PUMA-KSHV-mut1.5 s transformovaným plazmidem pRS-p53 má G4 sekvenci mutovanou. V porovnání s kmenem PUMA-KSHV je signál vyšší. Došlo k navázání proteinu p53 na RE, ale zároveň signál nedosahuje stejných hodnot v porovnání se signálem pro kmen PUMA bez obsahu G4 struktury. Rozdíl v signálu můžeme vidět po 6hodinové inkubaci (Graf 7), po 24hodinové inkubaci (Graf 8) je rozdíl opět výrazný.

Bylo provedeno statistické srovnání dat pro transformanty pRS-p53 vzhledem ke kmeni PUMA, který dosahoval nejvyšších hodnot relativní intenzity chemiluminiscence. Po 6 hodinách inkubace byly rozdíly mezi kmeny PUMA a PUMA-KSHV-mut1.5 statisticky nevýznamné, významné byly mezi kmenem PUMA a PUMA-KSHV. Po 24 hodinách byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi kmenem PUMA a PUMA-KSHV i mezi kmenem PUMA a PUMA-KSHV-mut1.5 u média s nejvyšším přídatkem galaktózy.

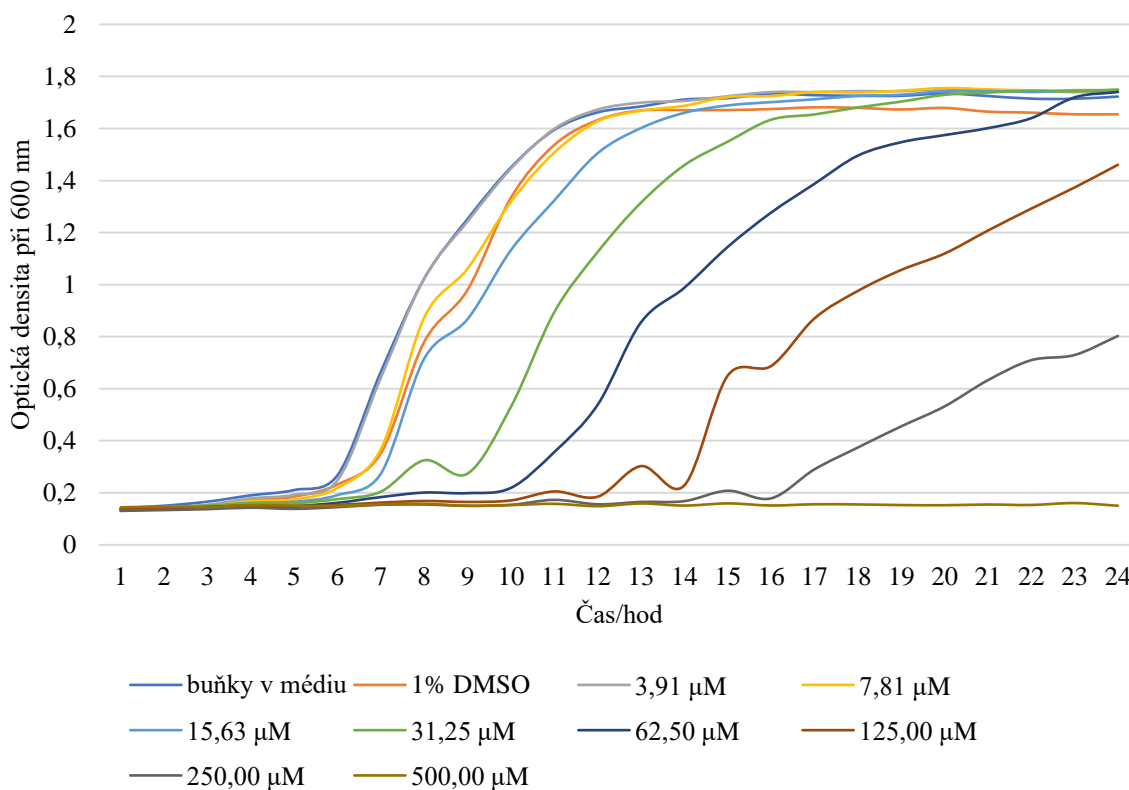
Výsledky ukázaly, že experimentální podmínky jsou opakovatelné, a že vybrané kmeny a zvolené přídatky galaktózy byly vhodné pro další analýzu vlivu G4-ligandů.

4.4 Testy viability kvasinkových buněk

Aby mohl být testován vliv G4-ligandů na transaktivaci proteinu p53 v kvasinkových buňkách pomocí luciferázového reportérového testu, bylo nutné nejprve určit vhodnou koncentraci těchto G4-ligandů, která nebude výrazně ovlivňovat životaschopnost kvasinkových buněk a zároveň bude mít vliv na G4 struktury. Za tímto účelem byly provedeny testy viability v přítomnosti zvyšující se koncentrace vybraných G4-ligandů.

Pro testování životaschopnosti buněk bylo využito měření optické density při 600 nm po dobu 24 hodin. Časový interval byl zvolen kvůli luciferázovému reportérovému testu, kdy se buňky inkubují 24 hodin. Nejvyšší testovanou koncentrací u všech ligandů byla 500 μM , nejnižší 3,91 μM . Pro každou koncentraci byla provedena 3 opakování. Zároveň byl testován i vliv 1% DMSO a to z důvodu, že všechny ligandy byly v DMSO rozpuštěny. Jako výchozí hodnota optické density buněk při 600 nm byla zvolena 0,02 [134].

Z výsledků byly vytvořeny růstové křivky kvasinkových buněk pro každý ligand, jako příklad je uvedena růstová křivka kvasinkových buněk po přidání různých koncentrací ligandu berberinu (Graf 9).



Graf 9: Růstová křivka kvasinkových buněk kmene PUMA pro ligand berberin. Byla měřena optická densita při 600 nm po dobu 24 hodin. Testované koncentrace berberinu byly od 500 μM po 3,91 μM . Byl testován i vliv 1% DMSO, a to z toho důvodu, že ligandy byly rozpuštěny v DMSO. Jako výchozí hodnota optické density buněk při 600 nm byla zvolena 0,02.

Pomocí růstových křivek byly určeny vhodné koncentrace ligandů pro následující experimenty, a to na základě sledování změn v profilu růstové křivky. Sledovala se toxicita

přidaných látek pro kvasinkové buňky na základě rozdílu oproti klasickému modelu růstové křivky mikroorganismů.

Zvolené koncentrace uvádí Tabulka 5. Z růstové křivky pro ligand berberin (Graf 9) byla vybrána koncentrace 62,50 μM , stejně tak pro ligand kurkumin. Graf růstové křivky pro ligand kurkumin znázorňuje Příloha 3, pro kvercetin Příloha 4 a pro kyselinu ellagovou Příloha 5. Kvasinkové buňky měly vyšší toleranci pro ligand kvercetin, kde byla jako vhodná určena koncentrace 125 μM . Kyselina ellagová se pro kvasinkové buňky ukázala jako nejtoxičtější ligand, kdy u této látky byla vybrána koncentrace pouze 31,25 μM .

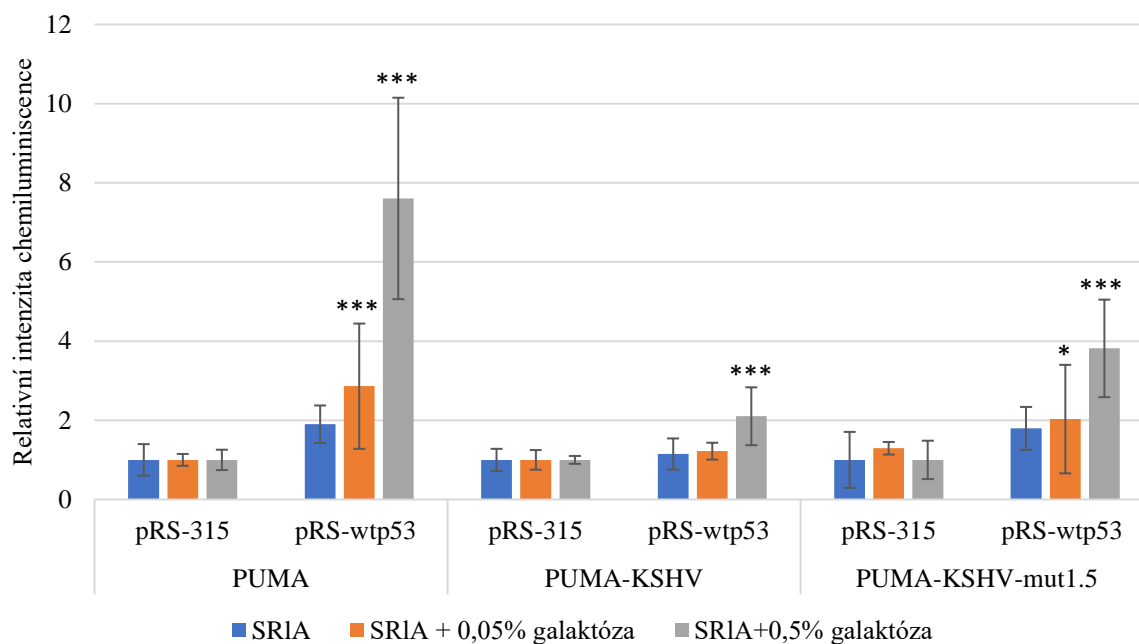
Tabulka 5: Zvolené koncentrace ligandů vybrané z příslušných růstových křivek.

Ligand	Zvolené koncentrace [μM]
Berberin	62,50
Kurkumin	62,50
Kvercetin	125,00
Kyselina ellagová	31,25

4.5 Analýza transaktivace proteinu p53 po ošetření buněk G4-ligandy *in vivo*

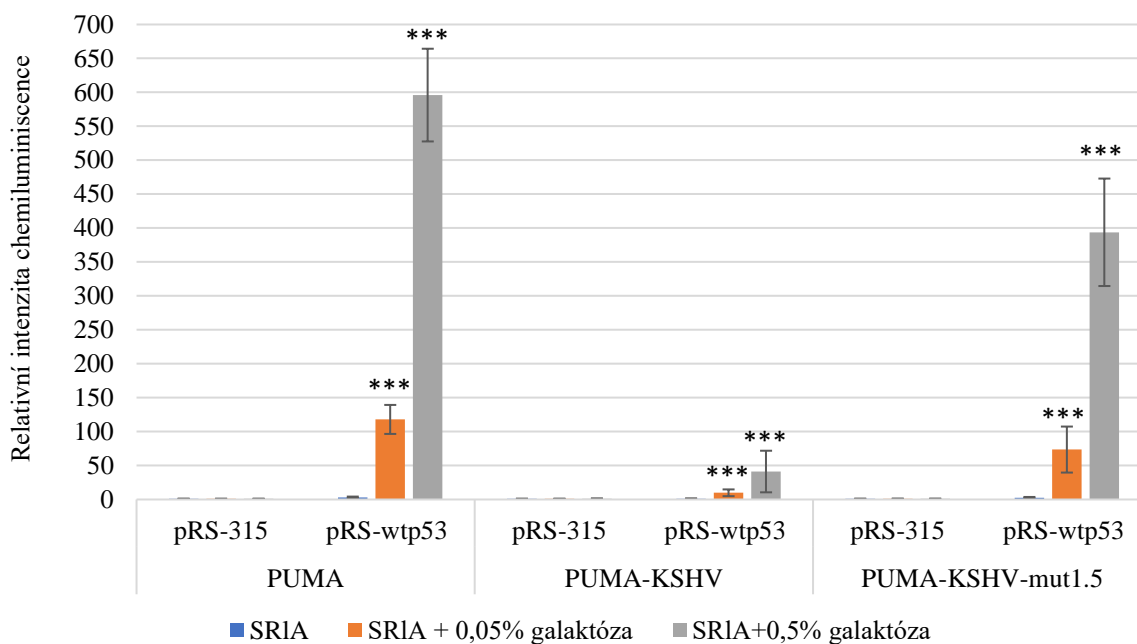
Pro sledování změn transaktivační aktivity proteinu p53 po přidání vybraných G4-ligandů byl zopakován luciferázový reportérový test, kdy bylo použito shodného postupu, kmenů *Saccharomyces cerevisiae* i přidavků galaktózy (0,05 a 0,5 %), jak je popsáno v kapitole 4.3 Analýza transaktivace proteinu p53 *in vivo*. Vhodné koncentrace G4-ligandů byly vybrány na základě testů viability popsanych v kapitole 4.4 Testy viability kvasinkových buněk. Do SRIA média byly jednotlivě přidány ligandy v koncentracích, jak je uvádí Tabulka 5. Test byl proveden pro každý ligand zvlášť, správnost naměřených výsledků byla ověřena opakováním experimentu. Výsledky z luciferázového reportérového testu jsou uvedeny jako relativní intenzita chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315). Statistická významnost je vztahena vždy k příslušnému prázdnému vektoru a znázorněna v grafech hvězdičkami (p hodnota < 0,05 *, p hodnota < 0,01 **, p hodnota < 0,001 ***). Pro každého transformanta bylo provedeno vždy 5 opakování u každého typu médií. Průměrné hodnoty na počátku analýzy uvádí Příloha 6, Příloha 7, Příloha 9 a Příloha 11.

Po přidavku 62,50 μM berberinu po 6 hodinách inkubace (Graf 10) je vidět rozdíl oproti luciferázovému reportérovému testu bez přidaných ligandů (Graf 7), kdy hodnoty relativní intenzity chemiluminiscence u přidaného berberinu jsou výrazně nižší. Je to způsobeno tím, že se buňky přizpůsobovaly novým podmínkám po přidání ligandu do média. Nicméně je již jasně vidět, že buňky kmene PUMA s transformovaným plazmidem pRS-p53 bez G4 sekvence mají výrazně vyšší hodnoty oproti transformantům PUMA-KSHV a PUMA-KSHV-mut1.5 s obsahem pRS-53, které G4 sekvenci obsahují.



Graf 10: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 6hodinové inkubaci v různých kmenech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 62,50 μ M berberinem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.

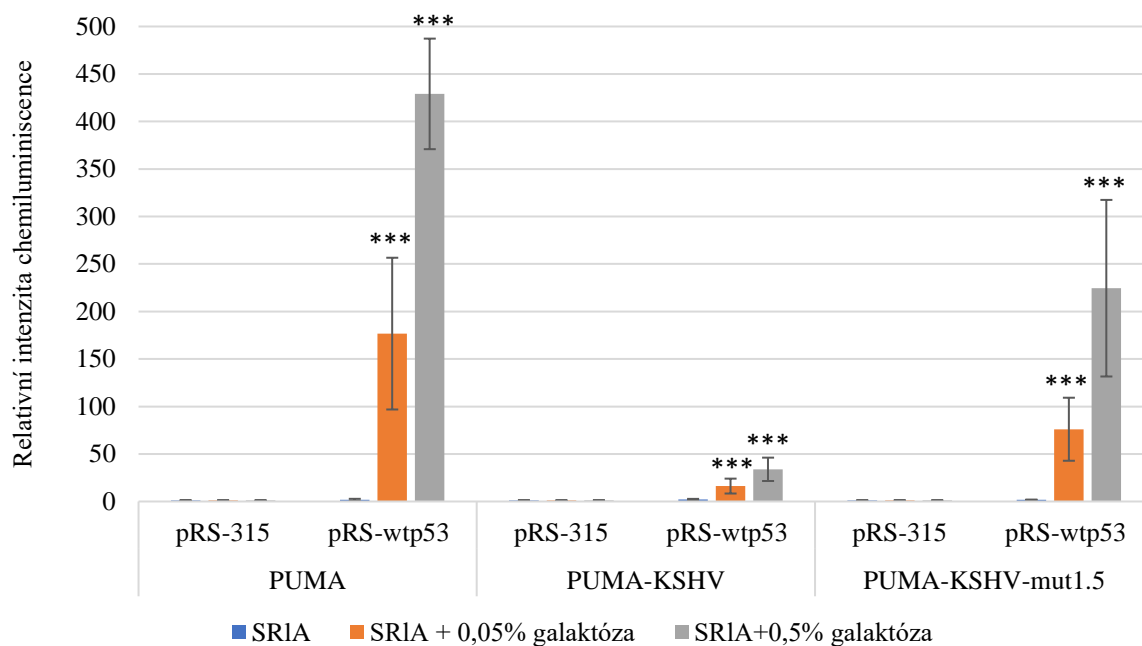
Po 24hodinové inkubaci (Graf 11) je však vidět, že hodnoty relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 pro transformanty pRS-p53 kmene PUMA jsou výrazně vyšší oproti buňkám neošetřených ligandy (Graf 8). U neošetřených buněk byla průměrná hodnota pro transformanty pRS-p53 kmene PUMA okolo 320, po přidavku berberinu okolo 600. Přidavek berberinu na kmen PUMA působil pozitivně, předmětem zájmu byly ale kmeny obsahující G4 sekvenci. U kmene PUMA-KSHV obsahující G4 sekvenci jsou hodnoty relativní intenzity chemiluminiscence výrazně nižší pro transformanty pRS-p53.



Graf 11: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 24hodinové inkubaci v různých kmenech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 62,50 μM berberinem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.

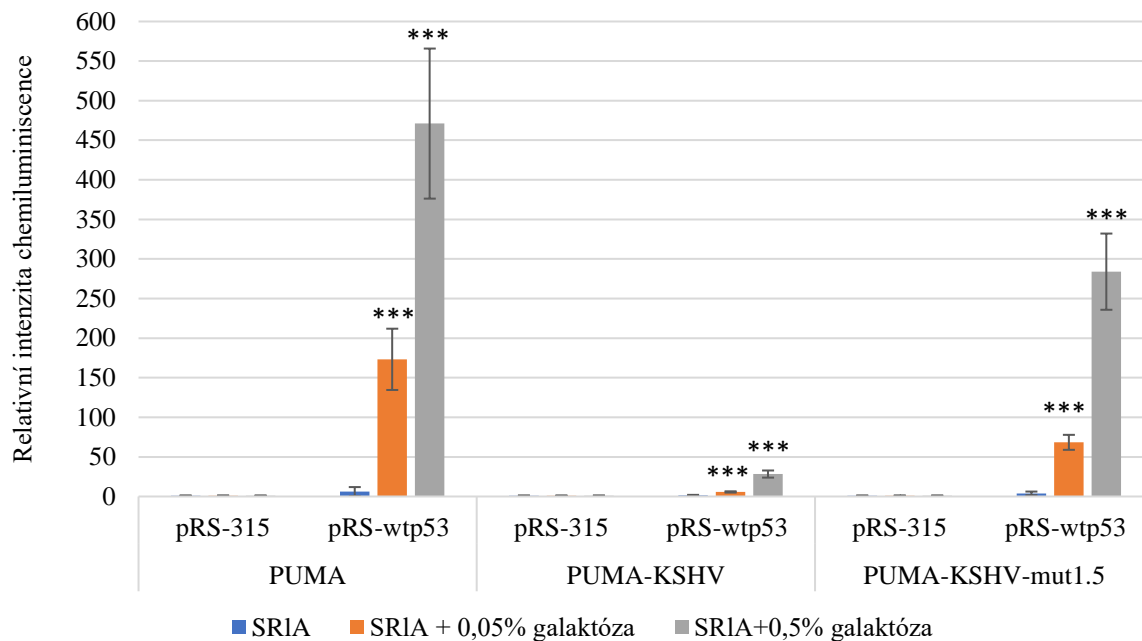
Po 6hodinové inkubaci po přidavku 31,25 μM kyseliny ellagové (Příloha 8), 62,50 μM kurkuminu (Příloha 10) a 125 μM kvercetinu (Příloha 12) byl vidět podobný průběh jako u předchozího ligandu. Buňky se opět přizpůsobovaly nově vytvořeným podmínkám, a proto byly naměřeny nižší hodnoty oproti neošetřeným buňkám (Graf 7). Proto nebylo možné objektivně vyhodnotit relativní intenzitu chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 a buňky byly dále inkubovány a transkripční aktivita byla vyhodnocována po 24 hodinách.

Po 24hodinové inkubaci buněk ošetřených 31,25 μM kyselinou ellagovou (Graf 12) jsou hodnoty pro transformanty pRS-p53 kmene PUMA a PUMA-KSHV-mut1.5 výrazně vyšší oproti buňkám bez přidavku ligandů, ale naopak nižší ve srovnání s ligandem berberinem. U kmene PUMA-KSHV obsahující G4 sekvenci jsou hodnoty relativní intenzity chemiluminiscence opět nižší pro transformanty pRS-p53.



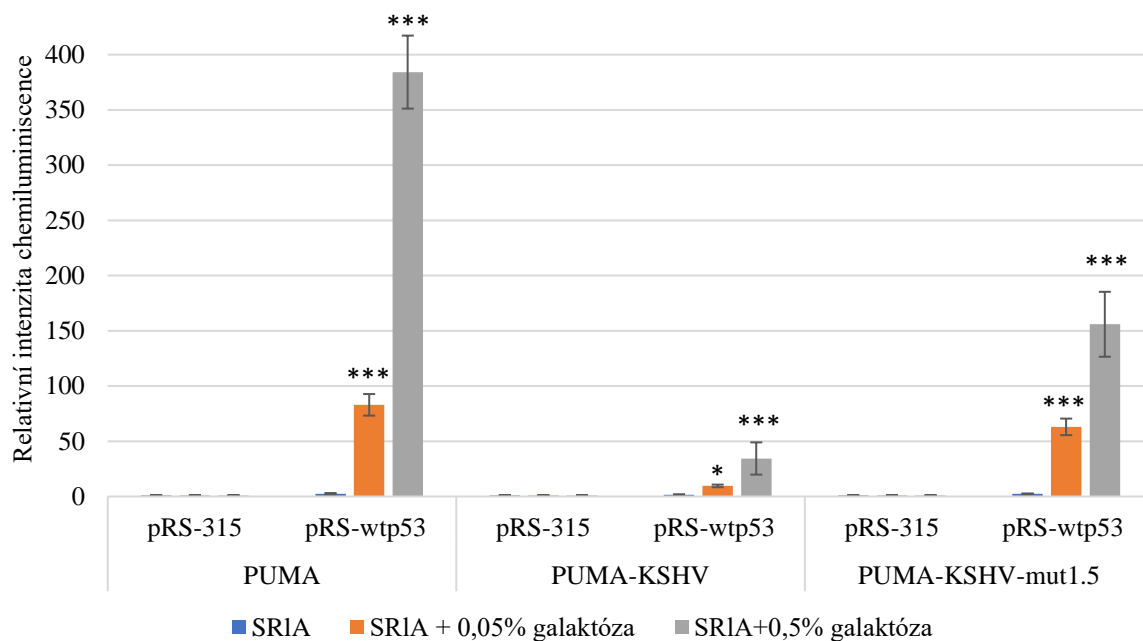
Graf 12: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 24hodinové inkubaci v různých kmenech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 31,25 μ M kyselinou ellagovou. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.

Po 24 hodinách inkubace buněk s přidáním 62,50 μ M kurkuminem (Graf 13) byly rozdíly mezi transformanty pRS-p53 všech tří kmenů výrazné, nejnižší hodnoty byly detekovány u kmene PUMA-KSHV. V porovnání s ligandem kyselinou ellagovou byly nejvyšší průměrně hodnoty nepatrně vyšší, ale nižší v porovnání s berberinem.



Graf 13: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 24hodinové inkubaci v různých kmenech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 62,50 μ M kurkuminem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.

Výsledky pro kvasinkové buňky s přidávkou 125 μ M kvercetinů v médiu po 24 hodinách inkubace znázorňuje Graf 14. Ligand pozitivně působil na kmen PUMA, u kmene PUMA-KSHV jsou hodnoty výrazně nižší, kmen PUMA-KSHV-mut1.5 dosahuje nižších hodnot v porovnání s kmenem PUMA.



Graf 14: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 24hodinové inkubaci v různých kmenech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 125 μ M kvercetinem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.

Po 24hodinové inkubaci kmen PUMA s obsahem pRS-p53 dosahoval nejvyšších hodnot relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 po přidavku 62,50 μ M berberinu. Tyto hodnoty byly nejvyšší ze všech kmenů i přidávaných ligandů. Druhé nejvyšší hodnoty bylo dosaženo po přidavku 62,50 μ M kurkuminu, poté po přidavku 31,25 μ M kyseliny ellagové. Nejnižší hodnoty byly pro kmen PUMA s obsahem pRS-p53 naměřeny u přidavku 125 μ M kvercetin. Stejně tomu tak bylo pro kmen PUMA-KSHV-mut1.5. U kmene PUMA-KSHV s obsahem pRS-p53 byly u všech ligandů naměřeny podobné hodnoty, markantně snížené oproti zbylým dvěma kmenům.

U transformantů pRS-p53 kmenů obsahující G4 sekvenci došlo po přidavku všech čtyř G4-ligandů k výraznější inhibici transkripcí proteinu p53 oproti kmeni PUMA ve srovnání s neošetřenými buňkami. Pro kmen PUMA-KSHV u neošetřených buněk je chemiluminiscenční signál zhruba poloviční oproti kmeni PUMA, u kmene PUMA-KSHV-mut1.5 jsou hodnoty vzhledem ke kmeni PUMA mírně snížené (Graf 7). Oproti tomu například po přidavku berberinu došlo u transformantu pRS-p53 kmene PUMA-KSHV k poklesu signálu na čtvrtinu, u kmene PUMA-KSHV-mut1.5 zhruba na polovinu (Graf 10). Struktura G4 byla pomocí berberinu stabilizována a bylo detekováno snížení relativní intenzity chemiluminiscenčního signálu po transkripci proteinem p53.

5 ZÁVĚR

V této práci byl testován vliv G4-ligandů na transaktivaci proteinu p53 metodami *in vivo*, afinita vybraných G4-ligandů ke G4 byla potvrzena technikami *in vitro*. Teoretická část práce shrnuje dosavadní poznatky o nejčastěji mutovaném supresorovém nádorovém proteinu p53. Byla popsána jeho struktura i vazebné vlastnosti k DNA. Dále byla shrnuta struktura sekundárních struktur DNA, nejdělněji pak G-kvadruplexů, které se vyskytují například v promotorech lidských genů a onkogenů. Cesta k novým protinádorovým terapeutikům by mohla vést právě přes spojení G4 struktur a proteinu p53, u kterého byla potvrzena jeho schopnost vázat G4 struktury. Hledají se proto G4-ligandy, které jsou schopné se na G4 navázat a stabilizovat je. Směr výzkumu se kvůli častým nežádoucím účinkům a rezistenci na konvenční chemoterapeutické léky upírá k přírodním sloučeninám.

V experimentální části byly vybrány G4-ligandy vyskytující se v potravinách a doplňcích stravy, konkrétně kurkumin, kvercetin, berberin a kyselina ellagová, u kterých byla v minulosti potvrzena jejich afinita ke G4 strukturám. Nejprve byla otestována jejich vazba ke G4 *in vitro* u vybraných syntetických oligonukleotidů. Byl využit ThT kompetiční test, kdy všechny ligandy nahradily thioflavin T ve vazbě na přítomnou G4 strukturu, což se projevilo snížením fluorescenčního signálu. Nejvýraznější pokles signálu v testu vykazoval berberin a kurkumin, tyto ligandy se dobře vázaly na přítomný G4. Konformace G-kvadruplexů byla určena pomocí CD spektroskopie. U syntetického oligonukleotidu KSHV se G4 formoval do hybridní konformace, všechny ligandy jasně stabilizovaly G4. U syntetického oligonukleotidu se G4 formoval do antiparalelní konformace, přídavek ligandů změnil konformaci G4 struktury na paralelní.

K testování vlivu těchto ligandů na transaktivaci proteinu p53 *in vivo* bylo využito izogenních systémů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Nejprve byl zjišťován vliv G4 sekvence na transaktivaci proteinu bez přítomnosti ligandů. Pro vyhodnocení výsledků transaktivačního potenciálu p53 byl využit luciferázový reportérový test. Výsledky byly vyhodnoceny jako relativní intenzita chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53, kdy detekovaný chemiluminiscenční signál byl vztažen k buňkám příslušného kmene obsahující plazmid pRS-315, kde protein nebyl exprimován. Nejvyšších hodnot dosahovaly buňky kmene PUMA transformované pRS-p53. Naopak nejnižší hodnoty vykazovaly buňky kmene PUMA-KSHV s obsahem pRS-p53, kdy kmen obsahuje G4 strukturu. Kmen PUMA-KSHV-mut1.5 s transformovaným pRS-p53 je mutován v jednom nukleotidu, a proto vykazoval vyšší signál než kmen PUMA-KSHV, ale stále nižší než kmen PUMA. G4 sekvence jasně ovlivnila vazbu proteinu p53 na příslušný RE DNA, což koresponduje s výsledky publikovanými v odborné literatuře [14, 22]. Statistické srovnání dat pro transformanty s pRS-p53 ukázalo, že po 24 hodinách inkubace byly statisticky významné rozdíly mezi kmenem PUMA a PUMA-KSHV i mezi kmenem PUMA a PUMA-KSHV-mut1.5 u média s nejvyšším přídávkem galaktózy.

Poté byly na základě testů viability vybrány vhodné koncentrace G4-ligandů pro ošetření buněk a byl zopakován luciferázový reportérový test. Obecně lze k výsledkům bez ligandů i s přidávanými G4-ligandy říct, že s rostoucí koncentrací galaktózy a s narůstajícím časem se signál u transformantů s obsahem pRS-p53 zvyšoval, naopak u transformantů s obsahem pRS-315 byl stále nízký. U transformantů s obsahem pRS-315 nedochází k expresi

proteinu p53, který by se navázal na RE DNA, tím pádem nemůže docházet k transkripci genu pro enzym luciferázu. Pro transformanty s obsahem pRS-p53 k expresi proteinu docházelo, p53 se mohl navázat na RE DNA, došlo k transkripci genu pro enzym a byl detekován vyšší chemiluminiscenční signál.

Po přidavku ligandů se po 6 hodinách inkubace kvasinkové buňky přizpůsobovaly nově vytvořeným podmínkám (přidavku ligandů a galaktózy do média), proto byly hodnoty relativní intenzity chemiluminiscence oproti neošetřeným buňkám výrazně nižší. Po 24 hodinách inkubace však hodnoty relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 dosahovaly mnohem vyšších hodnot po ošetření ligandy oproti neošetřeným buňkám.

U všech čtyř přírodních látek s vazbou na G4 struktury došlo u transformantů pRS-p53 kmene PUMA, neobsahující G4, ke zvýšení transaktivace proteinu p53 v porovnání se zbylými dvěma kmeny i neošetřenými buňkami. Mezi ligandy byly průměrné hodnoty různé. Nejvyšší hodnoty relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 vykazovaly transformanti ošetření 62,50 μM berberinem po 24hodinové inkubaci. Druhý nejvyšší signál byl zaznamenán u přidavku 62,50 μM kurkuminu, poté u 31,25 μM kyseliny ellagové, nejnižších výsledků bylo naměřeno u přidavku 125 μM kvercetinu. Přídavek G4-ligandů působil na buňky pozitivně. Nárůst transaktivace p53 by mohl být způsoben například vytvořenými podmínkami, které by mohly podporovat zvýšenou expresi proteinu p53 kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* jako reakci na stres. Dosavadní studie se mnohem více zaměřují na vliv berberinu, kurkuminu, kvercetinu i kyseliny ellagové na změnu exprese proteinu p53 u různých typů nádorových linií [135–140]. V této práci však bylo zaměřeno na kmeny s G4 sekvencí.

U kmene PUMA-KSHV s obsahem pRS-p53, tvořící G4 sekvenci, je zajímavé, že po 24hodinové inkubaci byla naměřena vždy podobná průměrná hodnota relativní intenzity chemiluminiscence u všech čtyř ligandů, stejně tak jako u neošetřených transformantů pRS-p53. G4 sekvence zřejmě stále negativně ovlivňuje vazbu proteinu p53 na odpovídající RE DNA, brání tak transkripci genu pro enzym luciferázu a je detekován výrazně nižší chemiluminiscenční signál oproti transformantům pRS-p53 zbylých dvou kmenů.

Kmen PUMA-KSHV-mut1.5 s transformovaným pRS-p53 obsahuje G4 sekvenci mutovanou, proto je v porovnání s kmenem PUMA-KSHV signál vyšší, kdy se protein p53 váže na responzivní element, ale zároveň nedosahuje stejně vysokých hodnot jako u kmene PUMA bez G4 struktury. Pořadí průměrných hodnot pro jednotlivé ligandy bylo stejné jako pro kmen PUMA.

Závěrem lze říct, že u všech čtyř ligandů byla *in vitro* prokázána jejich afinita ke G4. Pomocí ThT kompetičního testu byl pro oligonukleotid KSHV vyhodnocen jako ligand s nejvyšší afinitou ke G4 berberin, u kterého byla pomocí CD potvrzena i jeho schopnost *in vitro* stabilizovat přítomný hybridní G4. U oligonukleotidu KSHV-mut1.5 způsobil nejvýraznější změnu konformace G4 z antiparalelní na paralelní opět přidavek berberinu. Pomocí kvasinkových izogenních systémů byl prokázán vliv G4 sekvence na transaktivaci proteinu p53. Po přidání ligandů došlo k výraznější inhibici transaktivace proteinu p53 a ke snížení chemiluminiscenčního signálu. Jako vhodný pro další testování se ukázal ligand berberin a otázkou pro další výzkum zůstává, za jakých podmínek probíhá jeho interakce s G4 *in vivo*.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] WILLIAMS, Ashley B. a Björn SCHUMACHER. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2016, **6**(5), a026070. ISSN , 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a026070
- [2] MAY, Pierre a Evelyne MAY. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* [online]. 1999, **18**(53), 7621–7636. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1203285
- [3] BAI, Ling a Wei-guo ZHU. p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Molecules*. 2006;2:141–153. 367TCTP in ovarian cancer cell lines ©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry *Folia Histochem Cytobiol.* nedatováno.
- [4] 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
- [5] 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 of the United States of America* [online]. 2002, **99**(18), 11593–11598. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.182256799
- [6] PETR, Marek, Robert HELMA, Alena POLÁŠKOVÁ, Aneta KREJČÍ, Zuzana DVOŘÁKOVÁ, Iva KEJNOVSKÁ, Lucie NAVRÁTILOVÁ, Matej ADÁMIK, Michaela VORLÍČKOVÁ a Marie BRÁZDOVÁ. Wild-type p53 binds to MYC promoter G-quadruplex. *Bioscience Reports* [online]. 2016, **36**(5), e00397. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20160232
- [7] DÜCHLER, Markus. G-quadruplexes: targets and tools in anticancer drug design. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2012, **20**(5), 389–400. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.3109/1061186X.2012.669384
- [8] DEMAIN, Arnold L. a Preeti VAISHNAV. Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology* [online]. 2011, **4**(6), 687–699. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x
- [9] LAGUNAS-RANGEL, Francisco Alejandro a Rosa María BERMÚDEZ-CRUZ. Natural Compounds That Target DNA Repair Pathways and Their Therapeutic Potential to Counteract Cancer Cells. *Frontiers in Oncology* [online]. 2020, **10** [vid. 2022-03-14]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.598174>
- [10] LANE, D. P. a L. V. CRAWFORD. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* [online]. 1979, **278**(5701), 261–263. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/278261a0
- [11] KHOURY, Marie P. a Jean-Christophe BOURDON. The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, **2**(3), a000927. ISSN , 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000927

- [12] ZHOU, Guangtong, Xinrui LIU, Yunqian LI, Songbai XU, Chengyuan MA, Xinmin WU, Ye CHENG, Zhiyun YU, Gang ZHAO a Yong CHEN. Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget* [online]. 2016, **7**(12), 14925–14939. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.7483
- [13] TALIB, Wamidh H., Sonia A. AL-HADID, Mai B. Wild ALI, Intisar Hadi AL-YASARI a Mohammed R. Abd ALI. Role of curcumin in regulating p53 in breast cancer: an overview of the mechanism of action. *Breast Cancer (Dove Medical Press)* [online]. 2018, **10**, 207–217. ISSN 1179-1314. Dostupné z: doi:10.2147/BCTT.S167812
- [14] PORUBIAKOVÁ, Otília, 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
- [15] ARDEN, Nilou a M.J. BETENBAUGH. Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnology* [online]. 2006, **50**, 77–92. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-006-9008-5
- [16] DUFFY, Michael J., Naoise C. SYNNOTT, Shane O'GRADY a John CROWN. Targeting p53 for the treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2020 [vid. 2021-04-13]. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2020.07.005
- [17] MARINE, J.-C., S. FRANCOZ, M. MAETENS, G. WAHL, F. TOLEDO a G. LOZANO. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death & Differentiation* [online]. 2006, **13**(6), 927–934. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4401912
- [18] KAMARAJ, Balu a Annemie BOGAERTS. Structure and Function of p53-DNA Complexes with Inactivation and Rescue Mutations: A Molecular Dynamics Simulation Study. *PLoS ONE* [online]. 2015, **10**(8), e0134638. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0134638
- [19] WEINBERG, Richard L., Dmitry B. VEPRINTSEV, Mark BYCROFT a Alan R. FERSHT. Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2005, **348**(3), 589–596. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2005.03.014
- [20] KHOURY, Marie P. a Jean-Christophe BOURDON. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes & Cancer* [online]. 2011, **2**(4), 453–465. ISSN 1947-6019. Dostupné z: doi:10.1177/1947601911408893
- [21] TALIB, Wamidh H. a Lina T. AL KURY. Parthenolide inhibits tumor-promoting effects of nicotine in lung cancer by inducing P53 - dependent apoptosis and inhibiting VEGF expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* [online]. 2018, **107**, 1488–1495. ISSN 1950-6007. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2018.08.139
- [22] MONTI, Paola, Vaclav BRAZDA, Natália BOHÁLOVÁ, Otília PORUBIAKOVÁ, Paola MENICHINI, Andrea SPECIALE, Renata BOCCIARDI, Alberto INGA a

- Gilberto FRONZA. Evaluating the Influence of a G-Quadruplex Prone Sequence on the Transactivation Potential by Wild-Type and/or Mutant P53 Family Proteins through a Yeast-Based Functional Assay. *Genes* [online]. 2021, **12**(2). ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes12020277
- [23] BRÁZDA, Václav a Miroslav FOJTA. The Rich World of p53 DNA Binding Targets: The Role of DNA Structure. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(22). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20225605
- [24] LAKIN, Nicholas D. a Stephen P. JACKSON. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* [online]. 1999, **18**(53), 7644–7655. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1203015
- [25] KASTENHUBER, Edward R. a Scott W. LOWE. Putting p53 in Context. *Cell* [online]. 2017, **170**(6), 1062–1078. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.08.028
- [26] ZELL, Joanna, Francesco Rota SPERTI, Sébastien BRITTON a David MONCHAUD. DNA folds threaten genetic stability and can be leveraged for chemotherapy. *RSC Chemical Biology* [online]. 2021, **2**(1), 47–76. Dostupné z: doi:10.1039/D0CB00151A
- [27] WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. The Structure of Dna. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. 1953, **18**, 123–131. ISSN 0091-7451, 1943-4456. Dostupné z: doi:10.1101/SQB.1953.018.01.020
- [28] 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
- [29] KYPR, Jaroslav, Iva KEJNOVSKÁ, Daniel RENCIUk a Michaela VORLÍCKOVÁ. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(6), 1713–1725. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp026
- [30] BRÁZDA, Václav a Jan COUFAL. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(2), 375. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18020375
- [31] PALEČEK, E. Local Supercoil-Stabilized DNA Structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2008 [vid. 2022-03-05]. Dostupné z: doi:10.3109/10409239109081126
- [32] *Vůdčí gen P53-zpráva z konference » Časopis Klinická onkologie » Linkos.cz* [online]. [vid. 2022-02-22]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2003-10-15-5/vudci-gen-p53-zprava-z-konference/>
- [33] SULLIVAN, Kelly D., Matthew D. GALBRAITH, Zdenek ANDRYSIK a Joaquin M. ESPINOSA. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death & Differentiation* [online]. 2018, **25**(1), 133–143. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2017.174

- [34] TIMSIT, Youri. DNA self-assembly: from chirality to evolution. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, **14**(4), 8252–8270. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms14048252
- [35] 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
- [36] BRÁZDOVÁ, Marie, Vlastimil TICHÝ, Robert HELMA, Pavla BAŽANTOVÁ, Alena POLÁŠKOVÁ, Aneta KREJČÍ, Marek PETR, Lucie NAVRÁTILOVÁ, Olga TICHÁ, Karel NEJEDLÝ, Martin L. BENNINK, Vinod SUBRAMANIAM, Zuzana BÁBKOVÁ, Tomáš MARTÍNEK, Matej LEXA a Matej ADÁMIK. p53 Specifically Binds Triplex DNA In Vitro and in Cells. *PLoS ONE* [online]. 2016, **11**(12), e0167439. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0167439
- [37] BARTAS, Martin, Michaela ČUTOVÁ, Václav BRÁZDA, Patrik KAURA, Jiří ŠŤASTNÝ, Jan KOLOMAZNÍK, Jan COUFAL, Pratik GOSWAMI, Jiří ČERVENĚ a Petr PEČINKA. The Presence and Localization of G-Quadruplex Forming Sequences in the Domain of Bacteria. *Molecules* [online]. 2019, **24**(9), 1711. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24091711
- [38] HUPPERT, Julian L. a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(2), 406–413. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl1057
- [39] YAHYAOU, Wafaa, Mario CALLEJO, Gerald B PRICE a Maria ZANNIS-HADJOPOULOS. Deletion of the cruciform binding domain in CBP/14-3-3 displays reduced origin binding and initiation of DNA replication in budding yeast. *BMC Molecular Biology* [online]. 2007, **8**, 27. ISSN 1471-2199. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2199-8-27
- [40] MIKHEIKIN, Andrey L., Alexander Y. LUSHNIKOV a Yuri L. LYUBCHENKO. Effect of DNA Supercoiling on the Geometry of Holliday Junctions. *Biochemistry* [online]. 2006, **45**(43), 12998–13006. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi061002k
- [41] PEARSON, C. E., H. ZORBAS, G. B. PRICE a M. ZANNIS-HADJOPOULOS. Inverted repeats, stem-loops, and cruciforms: significance for initiation of DNA replication. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 1996, **63**(1), 1–22. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4644(199610)63:1%3C1::AID-JCB1%3E3.0.CO;2-3
- [42] VAN HOLDE, K. a J. ZLATANOVA. Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* [online]. 1994, **16**(1), 59–68. ISSN 0265-9247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.950160110
- [43] ARANDA, Agustín, José E. PÉREZ-ORTÍN, Craig J. BENHAM a Marcel.Í DEL OLMO. Analysis of the Structure of a Natural Alternating d(TA)_n Sequence in Yeast

- Chromatin. *Yeast* [online]. 1997, **13**(4), 313–326. ISSN 1097-0061. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19970330)13:4<313::AID-YEA93>3.0.CO;2-8
- [44] PETERSEN, Michael. Nucleic Acids Studied by NMR Spectroscopy. In: John C. LINDON, George E. TRANTER a David W. KOPPENAAL, ed. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)* [online]. Oxford: Academic Press, 2017 [vid. 2022-05-02], s. 463–472. ISBN 978-0-12-803224-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00003-0
- [45] FRANK-KAMENETSKII, Maxim D. a Sergei M. MIRKIN. Triplex Dna Structures. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1995, **64**(1), 65–95. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000433
- [46] JAIN, Aklank, Guliang WANG a Karen M. VASQUEZ. DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie* [online]. 2008, **90**(8), 1117–1130. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2008.02.011
- [47] MANOR, H., B. S. RAO a R. G. MARTIN. Abundance and degree of dispersion of genomic d(GA)n.d(TC)n sequences. *Journal of Molecular Evolution* [online]. 1988, **27**(2), 96–101. ISSN 0022-2844. Dostupné z: doi:10.1007/BF02138367
- [48] BACOLLA, Albino, Jack R. COLLINS, Bert GOLD, Nadia CHUZHANOVA, Ming YI, Robert M. STEPHENS, Stefan STEFANOV, Adam OLSH, John P. JAKUPCIAK, Michael DEAN, Richard A. LEMPICKI, David N. COOPER a Robert D. WELLS. Long homopurine*homopyrimidine sequences are characteristic of genes expressed in brain and the pseudoautosomal region. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(9), 2663–2675. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl354
- [49] WANG, Xuan a James E. HABER. Role of Saccharomyces single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS biology* [online]. 2004, **2**(1), E21. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0020021
- [50] GRIFFITH, Jack D, Laurey COMEAU, Soraya ROSENFELD, Rachel M STANSEL, Alessandro BIANCHI, Heidi MOSS a Titia 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
- [51] 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
- [52] GREIDER, Carol W. Telomeres Do D-Loop–T-Loop. *Cell* [online]. 1999, **97**(4), 419–422. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80750-3
- [53] 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
- [54] LI, Conghui, Honghong WANG, Zhinang YIN, Pingping FANG, Ruijing XIAO, Ying XIANG, Wen WANG, Qiuzi LI, Beili HUANG, Jian HUANG a Kaiwei LIANG. Ligand-induced native G-quadruplex stabilization impairs transcription initiation.

- Genome Research* [online]. 2021, **31**(9), 1546–1560. ISSN 1088-9051, 1549-5469. Dostupné z: doi:10.1101/gr.275431.121
- [55] SUN, Zhi-Yin, Xiao-Na WANG, Sui-Qi CHENG, Xiao-Xuan SU a Tian-Miao OU. Developing Novel G-Quadruplex Ligands: From Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid–Protein Interaction. *Molecules* [online]. 2019, **24**(3), 396. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24030396
- [56] 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**. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.46793
- [57] DI FONZO, Silvia, Jussara AMATO, Federica D'ARIA, Marco CATERINO, Francesco D'AMICO, Alessandro GESSINI, John W. BRADY, Attilio CESÀRO, Bruno PAGANO a Concetta GIANCOLA. Ligand binding to G-quadruplex DNA: new insights from ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Physical chemistry chemical physics: PCCP* [online]. 2020, **22**(15), 8128–8140. ISSN 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/d0cp01022g
- [58] LEJAULT, Pauline, Jose F. MORUNO-MANCHON, Sree M. VEMU, Pedram HONARPISHEH, Liang ZHU, Nayun KIM, Akihiko URAYAMA, David MONCHAUD, Louise D. MCCULLOUGH a Andrey S. TSVETKOV. Regulation of autophagy by DNA G-quadruplexes. *Autophagy* [online]. 2020, **16**(12), 2252–2259. ISSN 1554-8635. Dostupné z: doi:10.1080/15548627.2020.1769991
- [59] SIMONSSON, Tomas. G-Quadruplex DNA Structures Variations on a Theme [online]. 2001, **382**(4), 621–628. ISSN 1437-4315. Dostupné z: doi:10.1515/BC.2001.073
- [60] TIPPANA, Ramreddy, Weikun XIAO a Sua MYONG. G-quadruplex conformation and dynamics are determined by loop length and sequence. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, **42**(12), 8106–8114. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gku464
- [61] HAZEL, Pascale, Julian HUPPERT, Shankar BALASUBRAMANIAN a Stephen NEIDLE. Loop-Length-Dependent Folding of G-Quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2004, **126**(50), 16405–16415. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja045154j
- [62] 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 1471-4914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2020.05.002
- [63] ZHENG, Ke-wei, Jia-yu ZHANG, Yi-de HE, Jia-yuan GONG, Cui-jiao WEN, Juan-nan CHEN, Yu-hua HAO, Yong ZHAO a Zheng TAN. Detection of genomic G-quadruplexes in living cells using a small artificial protein. *Nucleic Acids Research* [online]. 2020, **48**(20), 11706–11720. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaa841
- [64] 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
- [65] 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
- [66] GONZÁLEZ, Verónica a Laurence H. HURLEY. The c-MYC NHE III1: Function and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2010, **50**(1), 111–129. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094649
- [67] 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
- [68] 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
- [69] 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
- [70] HÄNSEL-HERTSCH, Robert, Dario BERALDI, Stefanie V. LENSING, Giovanni MARSICO, Katherine ZYNER, Aled PARRY, Marco DI ANTONIO, Jeremy PIKE, Hiroshi KIMURA, Masashi NARITA, David TANNAHILL a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin. *Nature Genetics* [online]. 2016, **48**(10), 1267–1272. ISSN 1546-1718. Dostupné z: doi:10.1038/ng.3662
- [71] CHEN, Siqi, Lijuan SU, Jun QIU, Nannan XIAO, Jing LIN, Jia-heng TAN, Tian-miao OU, Lian-quan GU, Zhi-shu HUANG a Ding LI. Mechanistic studies for the role of cellular nucleic-acid-binding protein (CNBP) in regulation of c-myc transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2013, **1830**(10), 4769–4777. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.007
- [72] THAKUR, Ram Krishna, Praveen KUMAR, Kangkan HALDER, Anjali VERMA, Anirban KAR, Jean-Luc PARENT, Richa BASUNDRA, Akinchan KUMAR a Shantanu CHOWDHURY. Metastases suppressor NM23-H2 interaction with G-quadruplex DNA within c-MYC promoter nuclease hypersensitive element induces c-MYC expression. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(1), 172–183. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkn919
- [73] BAKALKIN, G., T. YAKOVLEVA, G. SELIVANOVA, K. P. MAGNUSSON, L. SZEKELY, E. KISELEVA, G. KLEIN, L. TERENIUS a K. G. WIMAN. p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

- [online]. 1994, **91**(1), 413–417. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.1.413
- [74] *TP53 / gene / Britannica* [online]. [vid. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/TP53>
- [75] SAMPATH, Janardhan, Daxi SUN, Vincent J. KIDD, Jose GRENET, Amisha GANDHI, Linda H. SHAPIRO, Qingjian WANG, Gerard P. ZAMBETTI a John D. SCHUETZ. Mutant p53 Cooperates with ETS and Selectively Up-regulates Human MDR1 Not MRP1 *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(42), 39359–39367. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M103429200
- [76] CHICAS, Agustin, Patricia MOLINA a Jill BARGONETTI. Mutant p53 Forms a Complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2000, **279**(2), 383–390. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2000.3965
- [77] 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
- [78] ADÁMIK, Matej, Iva KEJNOVSKÁ, Pavla BAŽANTOVÁ, Marek PETR, Daniel RENČIUK, Michaela VORLÍČKOVÁ a Marie BRÁZDOVÁ. p53 binds human telomeric G-quadruplex in vitro. *Biochimie* [online]. 2016, **128–129**, 83–91. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2016.07.004
- [79] 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 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky187
- [80] 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 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1304
- [81] 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
- [82] GOMEZ, Dennis, Marie-Françoise O'DONOHUE, Thomas WENNER, Céline DOUARRE, Jérôme MACADRÉ, Pascale KOEBEL, Marie-Josèphe GIRAUD-PANIS, Hervé KAPLAN, Alain KOLKES, Kazuo SHIN-YA a Jean-François RIOU. The G-quadruplex Ligand Telomestatin Inhibits POT1 Binding to Telomeric Sequences In vitro and Induces GFP-POT1 Dissociation from Telomeres in Human Cells. *Cancer Research*

- [online]. 2006, **66**(14), 6908–6912. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1581
- [83] TAHARA, H., K. SHIN-YA, H. SEIMIYA, H. YAMADA, T. TSURUO a T. IDE. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* [online]. 2006, **25**(13), 1955–1966. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1209217
- [84] PUBCHEM. *Braco-19* [online]. [vid. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9808666>
- [85] PORRU, Manuela, Pasquale ZIZZA, Marco FRANCESCHIN, Carlo LEONETTI a Annamaria BIROCCIO. EMICORON: A multi-targeting G4 ligand with a promising preclinical profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2017, **1861**(5, Part B), G-quadruplex, 1362–1370. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.010
- [86] PORRU, Manuela, Simona ARTUSO, Erica SALVATI, Armandodoriano BIANCO, Marco FRANCESCHIN, Maria Grazia DIODORO, Daniela PASSERI, Augusto ORLANDI, Francesco SAVORANI, Maurizio D'INCALCI, Annamaria BIROCCIO a Carlo LEONETTI. Targeting G-Quadruplex DNA Structures by EMICORON Has a Strong Antitumor Efficacy against Advanced Models of Human Colon Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2015, **14**(11), 2541–2551. ISSN 1538-8514. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0253
- [87] DICKERHOFF, Jonathan, Nicole BRUNDRIDGE, Scott A. MCLUCKEY a Danzhou YANG. Berberine Molecular Recognition of the Parallel MYC G-Quadruplex in Solution. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2021 [vid. 2021-10-28]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.1c01508
- [88] JAROSOVA, Petra, Petr PAROULEK, Michal RAJECKY, Veronika RAJECKA, Eva TABORSKA, Ramon ERITJA, Anna AVIÑÓ, Stefania MAZZINI, Raimundo GARGALLO a Petr TABORSKY. Naturally occurring quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids selectively stabilize G-quadruplexes. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2018, **20**(33), 21772–21782. ISSN 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/C8CP02681E
- [89] SLANINOVÁ, Iva, Zdenka SLUNSKÁ, Jiří ŠINKORA, Marcela VLKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Screening of Minor Benzo(c.)phenanthridine Alkaloids for Antiproliferative and Apoptotic Activities. *Pharmaceutical Biology* [online]. 2007, **45**(2), 131–139. ISSN 1388-0209. Dostupné z: doi:10.1080/13880200601113099
- [90] SIMEON, S., J. L. RIOS a A. VILLAR. Pharmacological activities of benzophenanthridine and phenanthrene alkaloids. *Die Pharmazie*. 1989, **44**(9), 593–597. ISSN 0031-7144.
- [91] PIROTA, Valentina, Michele STASI, Alessandra BENASSI a Filippo DORIA. Chapter Six - An overview of quadruplex ligands: Their common features and chemotype diversity. In: Stephen NEIDLE, ed. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* [online].

- B.m.: Academic Press, 2020 [vid. 2021-04-26], Quadruplex Nucleic Acids As Targets For Medicinal Chemistry, s. 163–196. Dostupné z: doi:10.1016/bs.armc.2020.04.008
- [92] NEWMAN, David J. a Gordon M. CRAGG. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* [online]. 2012, **75**(3), 311–335. ISSN 1520-6025. Dostupné z: doi:10.1021/np200906s
- [93] BHADRA, Kakali a Gopinatha Suresh KUMAR. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2011, **31**(6), 821–862. ISSN 1098-1128. Dostupné z: doi:10.1002/med.20202
- [94] TILLHON, Micol, Luis M. GUAMÁN ORTIZ, Paolo LOMBARDI a A. Ivana SCOVASSI. Berberine: New perspectives for old remedies. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2012, **84**(10), REDCAT. Redox regulation: Natural compounds as regulators of inflammation signaling, 1260–1267. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2012.07.018
- [95] MAHATA, Sutapa, Alok C. BHARTI, Shirish SHUKLA, Abhishek TYAGI, Syed A. HUSAIN a Bhudev C. DAS. Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Molecular Cancer* [online]. 2011, **10**(1), 39. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/1476-4598-10-39
- [96] KUO, Chi-Li, Chin-Wen CHI a Tsung-Yun LIU. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Letters* [online]. 2004, **203**(2), 127–137. ISSN 0304-3835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2003.09.002
- [97] CHATTERJEE, Sabyasachi, Sumana MALLICK, Franco BUZZETTI, Gaetano FIORILLO, Tanjia Monir SYEDA, Paolo LOMBARDI, Krishna Das SAHA a Gopinatha Suresh KUMAR. New 13-pyridinealkyl berberine analogues intercalate to DNA and induce apoptosis in HepG2 and MCF-7 cells through ROS mediated p53 dependent pathway: biophysical, biochemical and molecular modeling studies. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(110), 90632–90644. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA17214D
- [98] GARGALLO, R., A. AVIÑÓ, R. ERITJA, P. JAROSOVA, S. MAZZINI, L. SCAGLIONI a P. TABORSKY. Study of alkaloid berberine and its interaction with the human telomeric i-motif DNA structure. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2021, **248**, 119185. ISSN 1873-3557. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2020.119185
- [99] ARORA, Amit, Chandramouli BALASUBRAMANIAN, Niti KUMAR, Saurabh AGRAWAL, Rajendra P. OJHA a Souvik MAITI. Binding of berberine to human telomeric quadruplex – spectroscopic, calorimetric and molecular modeling studies. *The FEBS Journal* [online]. 2008, **275**(15), 3971–3983. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06541.x
- [100] FRANCESCHIN, Marco, Luigi ROSSETTI, Anna D’AMBROSIO, Stefano SCHIRRIPA, Armandodoriano BIANCO, Giancarlo ORTAGGI, Maria SAVINO, Christoph SCHULTES a Stephen NEIDLE. Natural and synthetic G-quadruplex

- interactive berberine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2006, **16**(6), 1707–1711. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.001
- [101] QING, Yanwei, Haiyan HU, Yuan LIU, Tao FENG, Wei MENG, Ling JIANG, Yongning SUN a Yang YAO. Berberine induces apoptosis in human multiple myeloma cell line U266 through hypomethylation of p53 promoter. *Cell Biology International* [online]. 2014, **38**(5), 563–570. ISSN 1095-8355. Dostupné z: doi:10.1002/cbin.10206
- [102] SENGUPTA, Antara, Akansha GANGULY a Shantanu CHOWDHURY. Promise of G-Quadruplex Structure Binding Ligands as Epigenetic Modifiers with Anti-Cancer Effects. *Molecules* [online]. 2019, **24**(3), 582. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24030582
- [103] PATTANAYAK, Rudradip, Pijush BASAK, Srikanta SEN a Maitree BHATTACHARYYA. Interaction of KRAS G-quadruplex with natural polyphenols: A spectroscopic analysis with molecular modeling. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 228–237. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.074
- [104] JHA, Niki S., Satyendra MISHRA, Ashalatha S. MAMIDI, Archita MISHRA, Shailendra K. JHA a Avadhesh SUROLIA. Targeting human telomeric G-quadruplex DNA with curcumin and its synthesized analogues under molecular crowding conditions. *RSC Advances* [online]. 2016, **6**(9), 7474–7487. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA17390F
- [105] MISHRA, Satyendra, Sejal PATEL a Chandni G. HALPANI. Recent Updates in Curcumin Pyrazole and Isoxazole Derivatives: Synthesis and Biological Application. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2019, **16**(2), e1800366. ISSN 1612-1880. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.201800366
- [106] ROY, Ananya, Oishika CHATTERJEE, Nilanjan BANERJEE, Tanaya ROYCHOWDHURY, Gopa DHAR, Gopeswar MUKHERJEE a Subhrangsu CHATTERJEE. Curcumin arrests G-quadruplex in the nuclear hyper-sensitive III1 element of c-MYC oncogene leading to apoptosis in metastatic breast cancer cells. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. 2021, **0**(0), 1–17. ISSN 0739-1102. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2021.1940284
- [107] ZHU, Peng, Manli YANG, Hao HE, Zhibin KUANG, Mu LIANG, Anxiao LIN, Song LIANG, Qiyun WEN, Zhiqin CHENG a Chaofeng SUN. Curcumin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by downregulating Notch signaling. *Molecular Medicine Reports* [online]. 2019, **20**(2), 1541–1550. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2019.10371
- [108] PANDYA, Nirali, Eshan KHAN, Neha JAIN, Lakshminarayana SATHAM, Rahul SINGH, Ravindra D. MAKDE, Amit MISHRA a Amit KUMAR. Curcumin analogs exhibit anti-cancer activity by selectively targeting G-quadruplex forming c-myc promoter sequence. *Biochimie* [online]. 2021, **180**, 205–221. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2020.11.006

- [109] PATTANAYAK, Rudradip, Pijush BASAK, Srikanta SEN a Maitree BHATTACHARYYA. An insight to the binding of ellagic acid with human serum albumin using spectroscopic and isothermal calorimetry studies. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 2017, **10**, 88–93. ISSN 2405-5808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2017.03.001
- [110] TAWANI, Arpita, Subodh Kumar MISHRA a Amit KUMAR. Structural insight for the recognition of G-quadruplex structure at human c-myc promoter sequence by flavonoid Quercetin. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 3600. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-03906-3
- [111] VINNARASI, S., R. RADHIKA, S. VIJAYAKUMAR a R. SHANKAR. Structural insights into the anti-cancer activity of quercetin on G-tetrad, mixed G-tetrad, and G-quadruplex DNA using quantum chemical and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. 2020, **38**(2), 317–339. ISSN 0739-1102. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2019.1574239
- [112] SUN, Hongxia, Yalin TANG, Junfeng XIANG, Guangzhi XU, Yazhou ZHANG, Hong ZHANG a Lianghua XU. Spectroscopic studies of the interaction between quercetin and G-quadruplex DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2006, **16**(13), 3586–3589. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2006.03.087
- [113] RIBAUDO, Giovanni, Erika OSELLADORE, Alberto ONGARO, Giuseppe ZAGOTTO, Maurizio MEMO a Alessandra GIANONCELLI. Enhanced G-quadruplex selectivity of flavonoid glycoside rutin over quercetin. *Natural Product Research* [online]. 2020, **0**(0), 1–5. ISSN 1478-6419. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2020.1859505
- [114] LACERDA, Maria Priscila, Eun Joong OH a Carrie ECKERT. The Model System *Saccharomyces cerevisiae* Versus Emerging Non-Model Yeasts for the Production of Biofuels. *Life* [online]. 2020, **10**(11), 299. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life10110299
- [115] SHARMA, Vasundhara, Paola MONTI, Gilberto FRONZA a Alberto INGA. Human transcription factors in yeast: the fruitful examples of P53 and NF- κ B. *FEMS Yeast Research* [online]. 2016, **16**(7), fow083. ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/fow083
- [116] KENNEDY, Brian K. Mammalian transcription factors in yeast: strangers in a familiar land. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2002, **3**(1), 41–49. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm704
- [117] 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*. 1994, **22**(25), 5767–5768. ISSN 0305-1048.
- [118] BELLÍ, Gemma, Eloi GARÍ, Lidia PIEDRAFITA, Martí ALDEA a Enrique HERRERO. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research* [online]. 1998, **26**(4), 942–947. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/26.4.942

- [119] 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
- [120] 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. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.22.24.8612-8625.2002
- [121] SHARMA, Vasundhara, Jennifer J. JORDAN, Yari CIRIBILLI, Michael A. RESNICK, Alessandra BISIO a Alberto INGA. Quantitative Analysis of NF- κ B Transactivation Specificity Using a Yeast-Based Functional Assay. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(7), e0130170. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0130170
- [122] KATZ, Samantha a Kuntal MUKHERJEE. In Vivo Site-Specific Mutagenesis and Gene Collage Using the Delitto Perfetto System in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2011, **745**, 173–91. ISSN 978-1-61779-128-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-129-1_11
- [123] 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
- [124] 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
- [125] 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
- [126] CARVALHO, Josué, João A. QUEIROZ a Carla CRUZ. Circular Dichroism of G-Quadruplex: a Laboratory Experiment for the Study of Topology and Ligand Binding. *Journal of Chemical Education* [online]. 2017, **94**(10), 1547–1551. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jchemed.7b00160
- [127] DEL VILLAR-GUERRA, Rafael, John O. TRENT a Jonathan B. CHAIRES. G-Quadruplex Secondary Structure Obtained from Circular Dichroism Spectroscopy. *Angewandte Chemie* [online]. 2018, **130**(24), 7289–7293. ISSN 1521-3757. Dostupné z: doi:10.1002/ange.201709184
- [128] BRÁZDA, Václav, Jan KOLOMAZNÍK, Jiří LÝSEK, Martin BARTAS, Miroslav FOJTA, Jiří ŠTASTNÝ a Jean-Louis MERGNY. G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction. *Bioinformatics* [online]. 2019, **35**(18), 3493–3495. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btz087
- [129] PEREIRA, Clara, Mariana LEO, Joana SOARES, Claudia BESSA a Lucilia SARAIVA. New Therapeutic Strategies for Cancer and Neurodegeneration Emerging

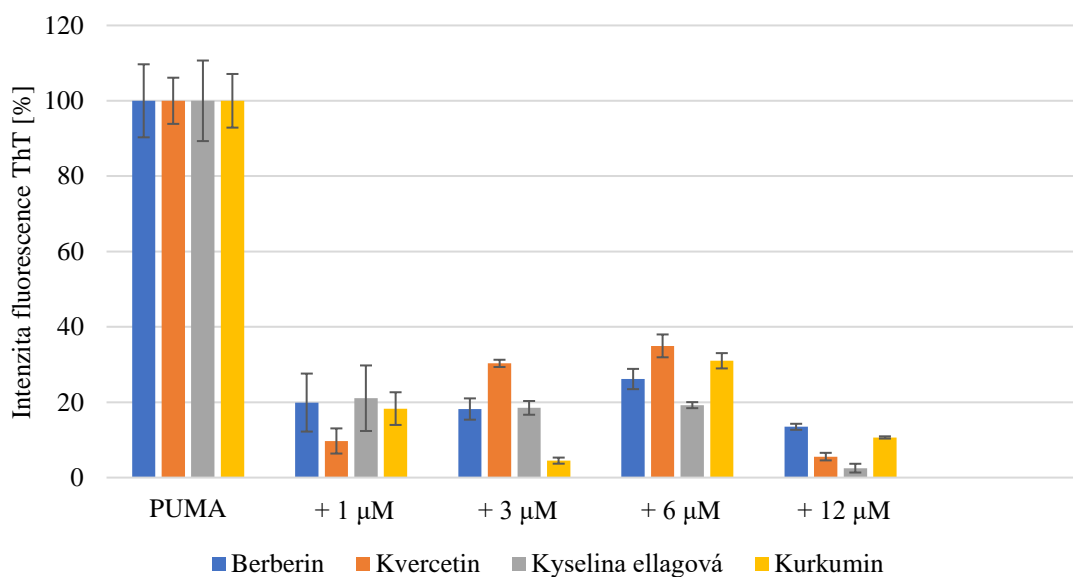
- from Yeast Cell-based Systems. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2012, **18**(27), 4223–4235. Dostupné z: doi:10.2174/138161212802430422
- [130] VORLÍČKOVÁ, Michaela, Iva KEJNOVSKÁ, Klára BEDNÁŘOVÁ, Daniel RENČIUK a Jaroslav KYPR. Circular Dichroism Spectroscopy of DNA: From Duplexes to Quadruplexes. *Chirality* [online]. 2012, **24**(9), 691–698. ISSN 1520-636X. Dostupné z: doi:10.1002/chir.22064
- [131] 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) [vid. 2022-05-04]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157156
- [132] pRS315 Sequence and Map. *SnapGene* [online]. [vid. 2022-03-15]. Dostupné z: https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pRS315
- [133] *Luciferase Assay System Protocol* [online]. [vid. 2022-03-06]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/luciferase-assay-system-protocol/>
- [134] EMANUEL, Efrat, Irina DUBROVIN, Ester HANYA, Gad A. PINHASI, Roman POGREB a Rivka CAHAN. Eradication of *Saccharomyces cerevisiae* by Pulsed Electric Field Treatments. *Microorganisms* [online]. 2020, **8**(11), 1684. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8111684
- [135] HESARI, AmirReza, Faezeh GHASEMI, Arrigo F. G. CICERO, Mohammad MOHAJERI, Omid REZAEI, Seyed Mohammad Gheibi HAYAT a Amirhossein SAHEBKAR. Berberine: A potential adjunct for the treatment of gastrointestinal cancers? *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2018, **119**(12), 9655–9663. ISSN 1097-4644. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.27392
- [136] SHISHODIA, Shishir. Molecular mechanisms of curcumin action: Gene expression. *BioFactors* [online]. 2013, **39**(1), 37–55. ISSN 1872-8081. Dostupné z: doi:10.1002/biof.1041
- [137] HE, Zhen-Yu, Chuan-Bing SHI, Hao WEN, Fang-Long LI, Bao-Lin WANG a Jie WANG. Upregulation of p53 Expression in Patients with Colorectal Cancer by Administration of Curcumin. *Cancer Investigation* [online]. 2011, **29**(3), 208–213. ISSN 0735-7907. Dostupné z: doi:10.3109/07357907.2010.550592
- [138] CHAN, Shu-Ting, Nae-Cherng YANG, Chin-Shiu HUANG, Jiunn-Wang LIAO a Shu-Lan YEH. Quercetin Enhances the Antitumor Activity of Trichostatin A through Upregulation of p53 Protein Expression In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* [online]. 2013, **8**(1), e54255. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0054255
- [139] TANIGAWA, Shunsuke, Makoto FUJII a De-Xing HOU. Stabilization of p53 Is Involved in Quercetin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HepG2 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2008, **72**(3), 797–804. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1271/bbb.70680

- [140] LI, Te-Mao, Guang-Wei CHEN, Chin-Cheng SU, Jaung-Gung LIN, Chin-Chung YEH, Kwork-Chu CHENG a Jing-Gung CHUNG. Ellagic Acid Induced p53/p21 Expression, G1 Arrest and Apoptosis in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Anticancer Research*. 2005, **25**(2A), 971–979. ISSN 0250-7005, 1791-7530.

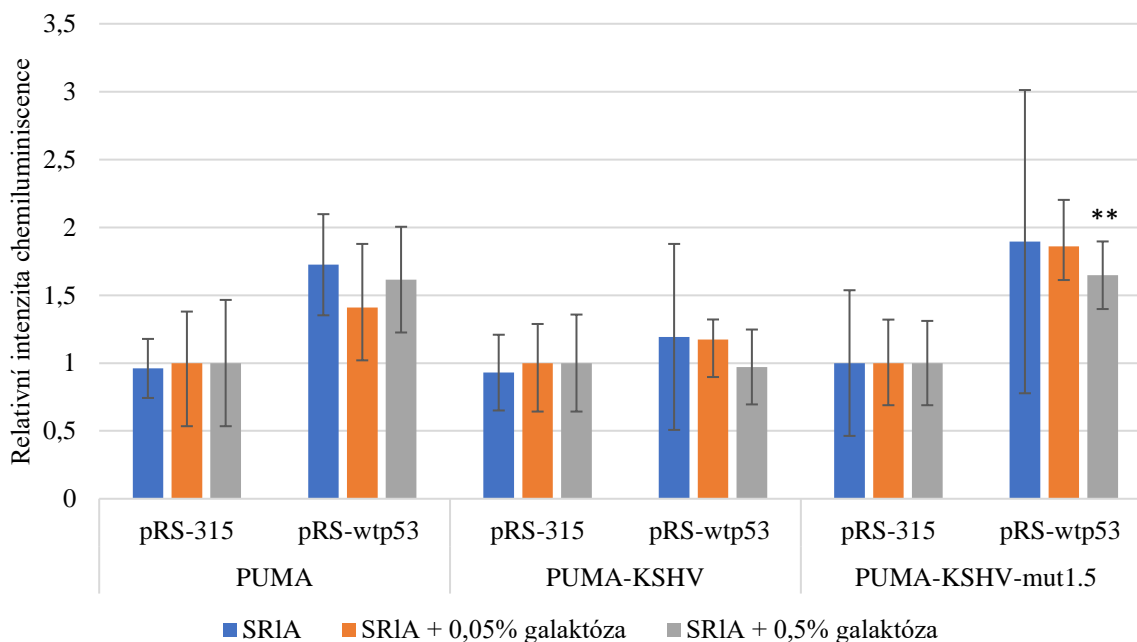
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DNA – deoxyribonukleová kyselina
RNA – ribonukleová kyselina
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina
G4 – G-kvadruplex
CDK – cyklin-dependentní kináza
ESI-MS – hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
CD – cirkulární dichroismus
NMR – nukleární magnetická rezonance
MDM2 – myší dvouminutový 2 homolog, negativní regulátor p53
MDM4 – myší dvouminutový 4 homolog, negativní regulátor p53
NHE III₁ – nuclear hypersensitive element III₁ – nukleázový hypersenzitivní prvek III₁
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
bcl-2 – regulátor apoptózy *bcl-2*
HIF-1A – hypoxií indukovatelný faktor 1 alfa
ETS1 – homolog onkogenu viru ptačí erytroblastózy E26 (V-Ets)-1, transkripční faktor
SP1 – transkripční faktor Sp1
MYC – protoonkogen *MYC*, transkripční faktor bHLH
TMPyP4 – 5,10,15,20-tetra(*N*-methyl-4-pyridyl)porfyrin
Phen-DC – N2,N9-bis(1-methylcholin-3-yl)-1,10-fenanthrolin-2,9-dikarboxamid
PDS – 3-{1-[3-(dimethylamino)propyl]-2-methyl-1*h*-indol-3-yl}-4-(2-methyl-1*h*-indol-3-yl)-1*h*-pyrrol-2,5-dion
NF-κB – jaderný faktor kappa B
TP53 – gen kódující protein p53
K⁺ – kation draslíku
Na⁺ – kation sodíku
TSP-1 – trombospondin 1
CDKN1A – inhibitor cyklin dependentní kinázy 1A
BAX – BCL2 asociovaný s X, regulátor apoptózy
kDa – kilo dalton
E2F7 – E2F transkripční faktor 7
RE – z ang. „response element“ – prvek odpovědi, cílová sekvence DNA
kb – kilobáze
CNBP – z ang. „cellular nucleic acid binding protein“
NM23-H2 – z ang. „Nucleoside diphosphate kinase B“
TRF2 – z ang. „telomeric repeat-binding factor 2“
cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina
ThT – thioflavin T
KSHV – herpesvirus spojený s Kaposiho sarkomem
Fas/CD95 – signalizační receptor buněčné smrti
PIG3 – p53-indukovatelný gen 3

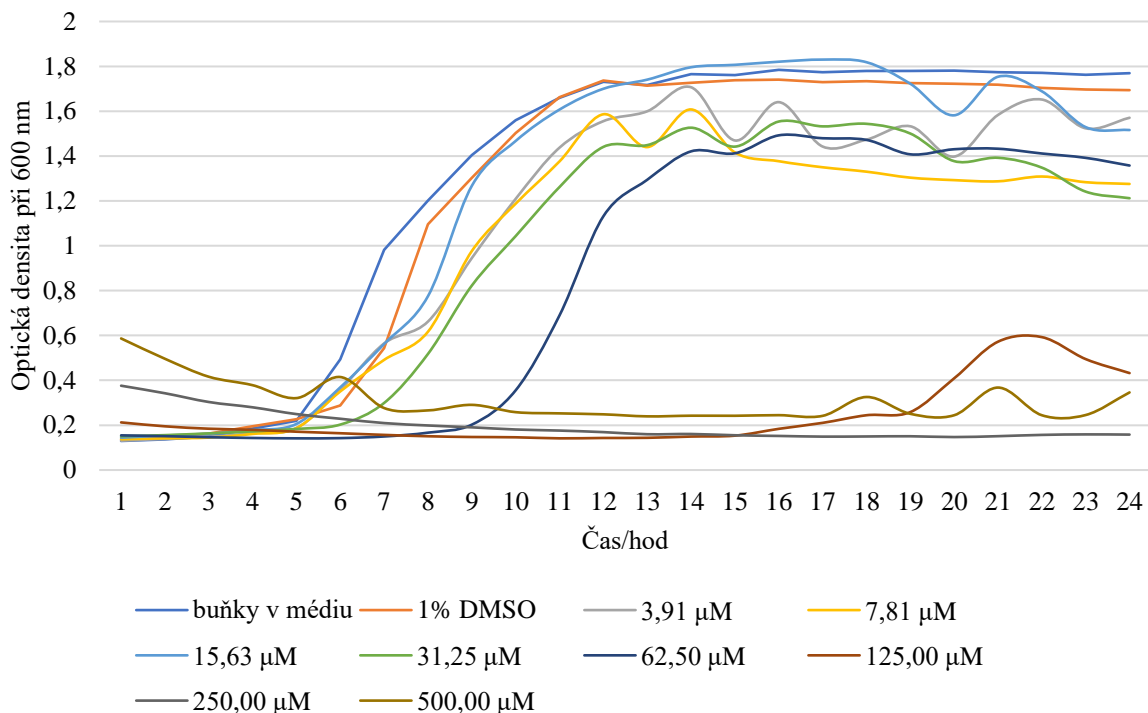
8 PŘÍLOHY



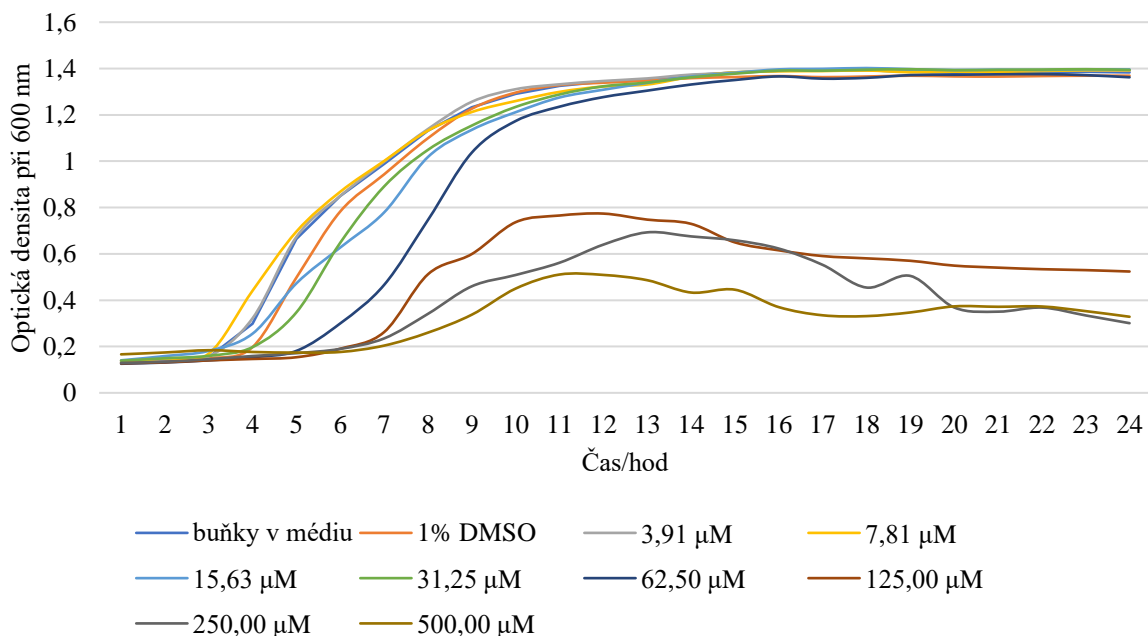
Příloha 1: ThT test pro syntetický oligonukleotid PUMA a G4-ligandy berberin, kvercetin, kyselinu ellagovou a kurkumin. Ligandy byly přidávány vždy v 1, 3, 6 a 12 μM koncentracích, provedeno vždy ve třech opakováních. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech, kdy oligonukleotid s ThT vyjadřuje 100 %. U ligandů byla odpočítána autofluorescence jednotlivých ligandů. Na histogramu jsou zaznačené směrodatné odchylky ze 3 opakování.



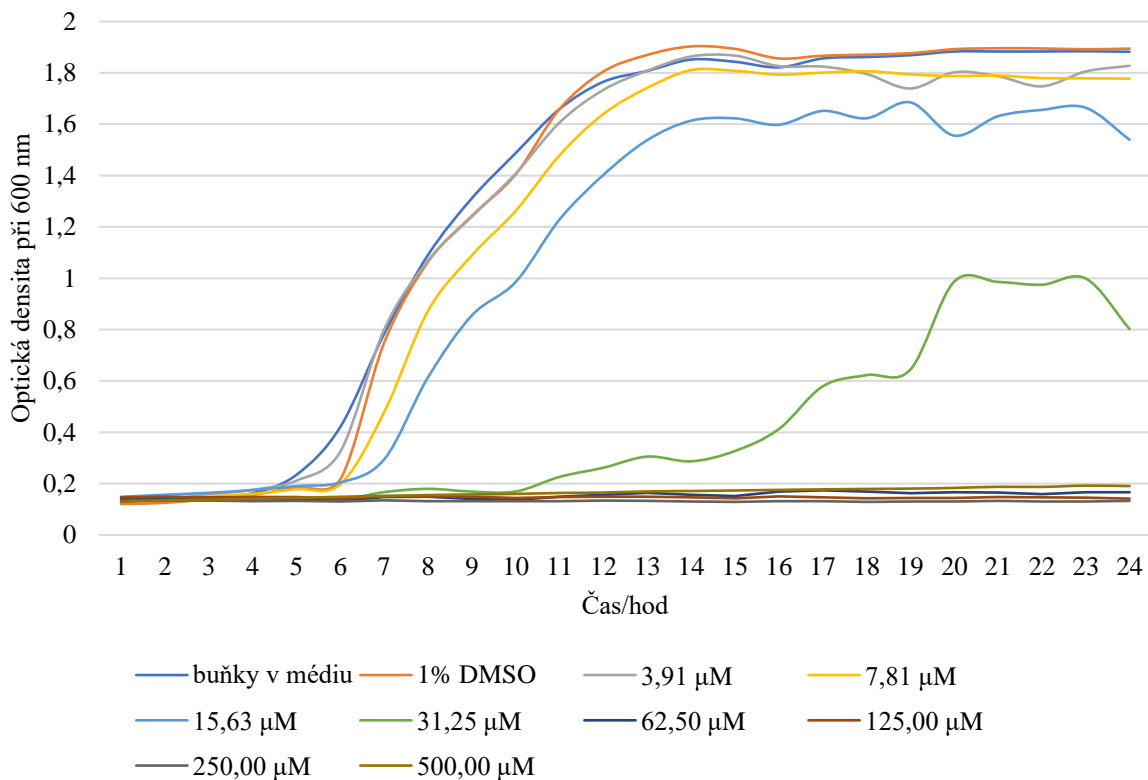
Příloha 2: Vyhodnocení transaktivační aktivity proteinu v čase 0 hodin v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae*. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.



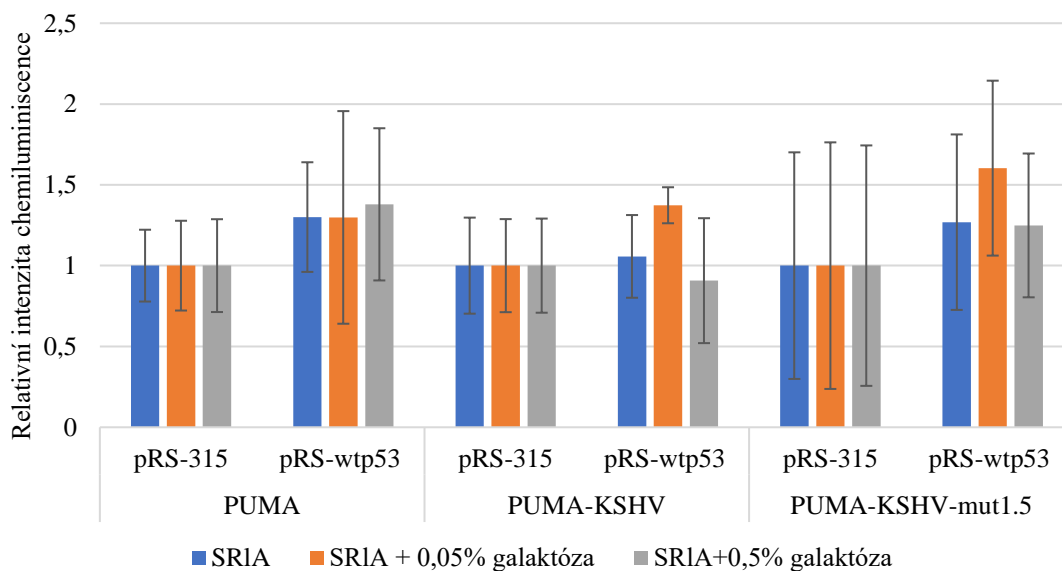
Příloha 3: Růstová křivka kvasinkových buněk kmene PUMA pro ligand kurkumin. Byla měřena optická densita při 600 nm po dobu 24 hodin. Testované koncentrace kurkuminu byly od 500 μM po 3,91 μM . Byl testován i vliv 1% DMSO a to z toho důvodu, že ligandy byly rozpuštěny v DMSO. Jako výchozí hodnota optické density buněk při 600 nm byla zvolena 0,02.



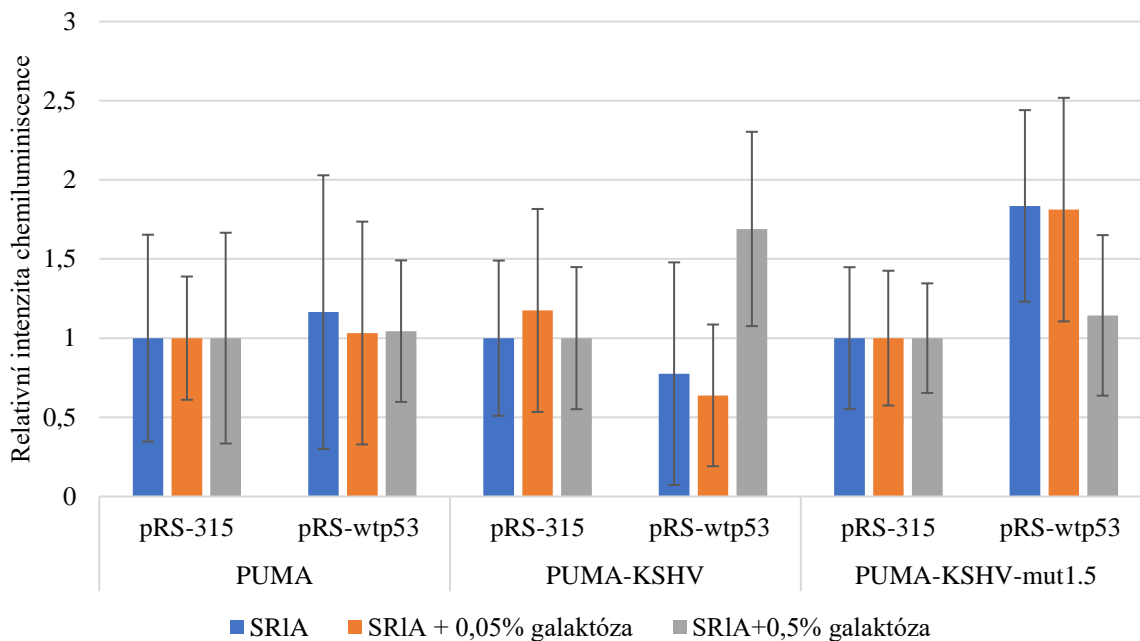
Příloha 4: Růstová křivka kvasinkových buněk kmene PUMA pro ligand kvercetin. Byla měřena optická densita při 600 nm po dobu 24 hodin. Testované koncentrace kvercetinu byly od 500 μM po 3,91 μM . Byl testován i vliv 1% DMSO a to z toho důvodu, že ligandy byly rozpuštěny v DMSO. Jako výchozí hodnota optické density buněk při 600 nm byla zvolena 0,02.



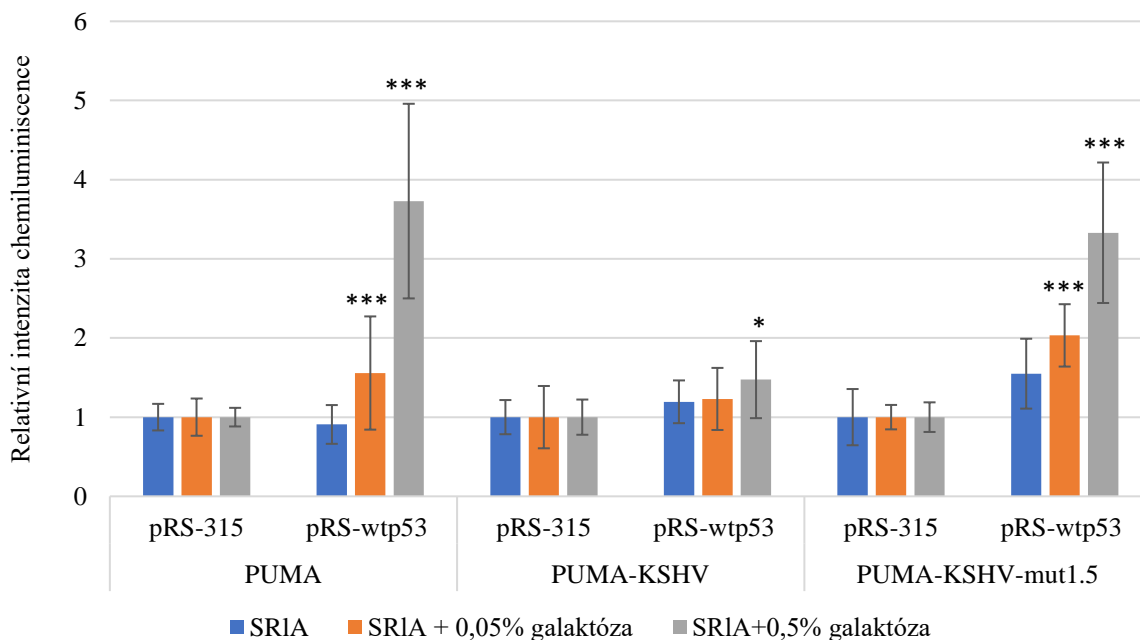
Příloha 5: Růstová křivka kvasinkových buněk kmene PUMA pro ligand kyseliny ellagovou. Byla měřena optická densita při 600 nm po dobu 24 hodin. Testované koncentrace kyseliny ellagové byly od 500 µM po 3,91 µM. Byl testován i vliv 1% DMSO a to z toho důvodu, že ligandy byly rozpuštěny v DMSO. Jako výchozí hodnota optické density buněk při 600 nm byla zvolena 0,02.



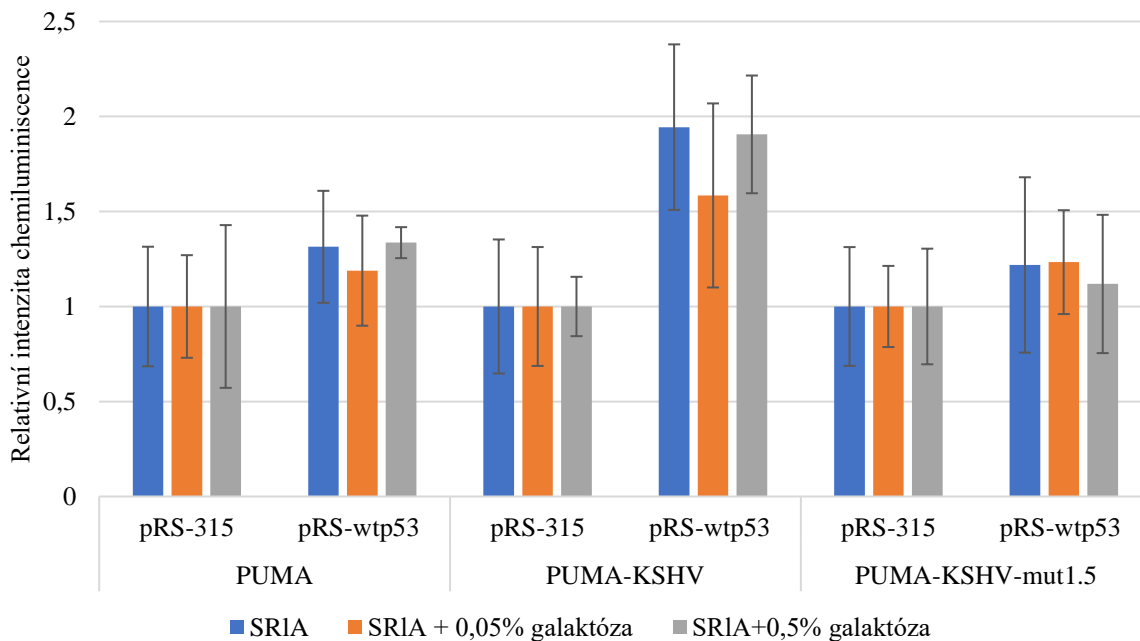
Příloha 6: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu v čase 0 hodin v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 62,50 µM berberinem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripční aktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.



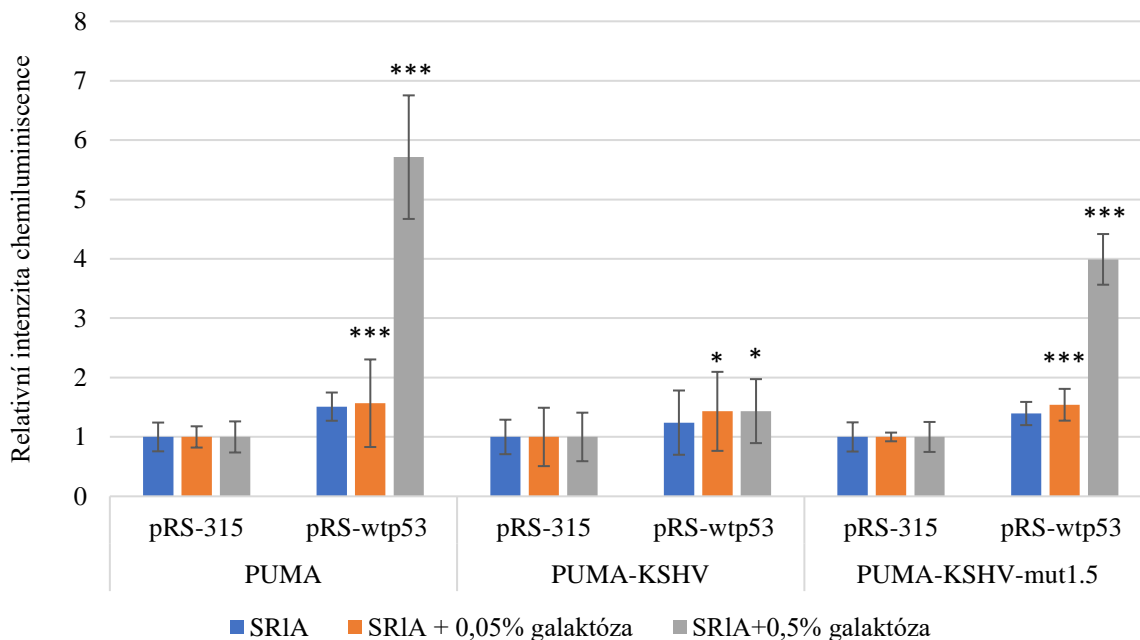
Příloha 7: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu v čase 0 hodin v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 31,25 μ M kyselinou ellagovou. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.



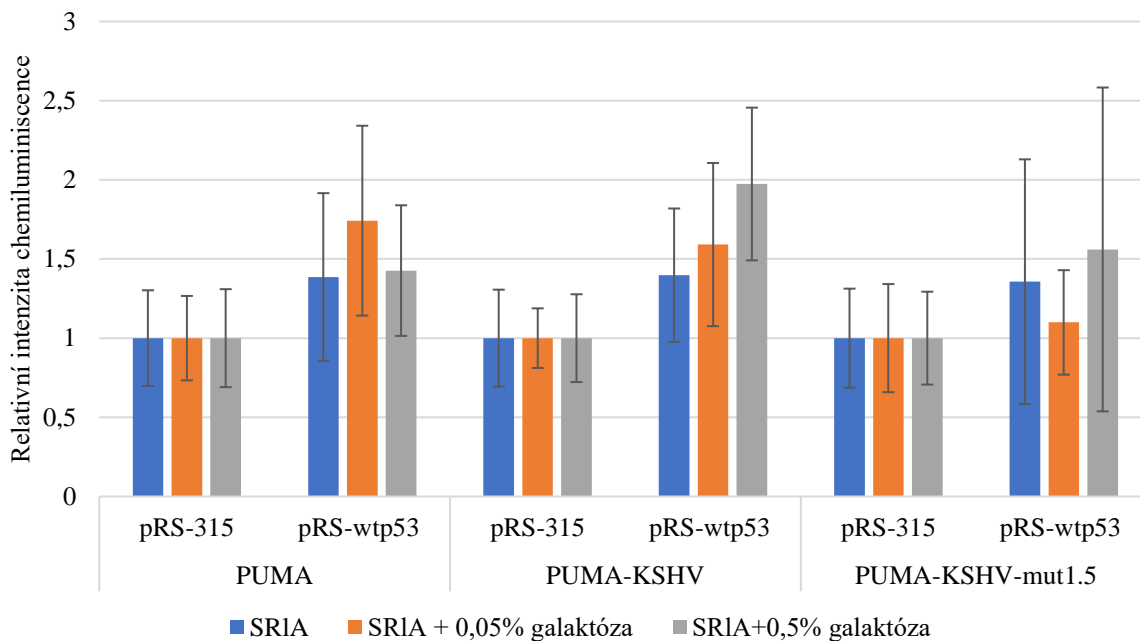
Příloha 8: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 6hodinové inkubaci v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 31,25 μ M kyselinou ellagovou. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transkripci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.



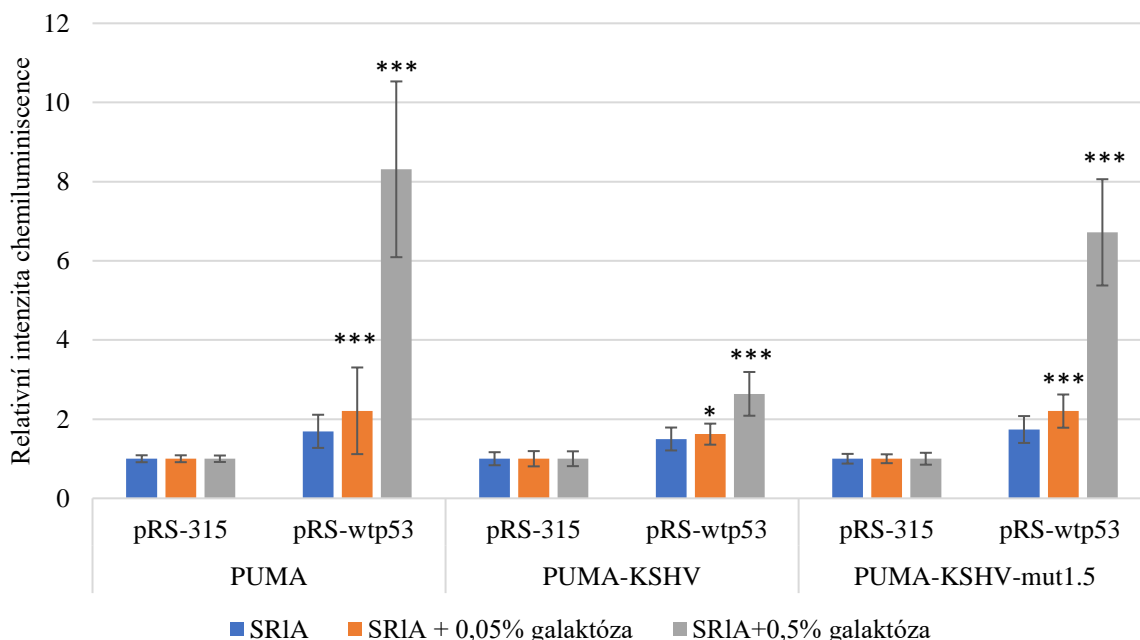
Příloha 9: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu v čase 0 hodin v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 62,50 μ M kurkuminem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.



Příloha 10: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu po 6hodinové inkubaci v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 62,50 μ M kurkuminem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.



Příloha 11: Vyhodnocení transaktivační aktivity proteinu v čase 0 hodin v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 125 μ M kvercetinem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.



Příloha 12: Vyhodnocení transaktivační aktivity proteinu po 6hodinové inkubaci v různých kmech *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 125 μ M kvercetinem. Histogram znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity chemiluminiscence po transaktivaci proteinem p53 (pRS-p53) v porovnání s prázdným vektorem (pRS-315) a směrodatné odchylky z pěti opakování. Statistická významnost viz Graf 7.