



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 LÁTEK Z ČAJE NA G-QUADRUPLEXY A VAZEBNÉ A TRANSAKTIVAČNÍ VLASTNOSTI PROTEINU P53

EFFECT OF NATURAL SUBSTANCES FROM TEA ON G-QUADRUPLEXES AND BINDING AND
TRANSACTIVATION PROPERTIES OF P53 PROTEIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klára Foltanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1802/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Klára Foltanová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vliv přírodních látek z čaje na G–quadrupelexy a vazebné a transaktivací vlastnosti proteinu p53

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je zjistit vliv vybraných látek na G–quadrupelexy a transaktivaci vlastnosti proteinu p53.

K dosažení budou realizovány tyto kroky:

Literární rešerše o látkách obsažených v čaji a možných interakcích s cílovými molekulami

Testování interakce těchto látek s DNA in vitro (například pomocí gelové retardační analýzy a fluorescenčních metod)

Testování vlivu na transaktivaci proteinem p53 v kvasinkovém expresním systému

Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.

Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Klára Foltanová
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Nádorový supresorový protein p53 patří mezi nejdůležitější regulátory buněčného cyklu při poškození DNA. Kromě zástavy buněčného cyklu a navození apoptózy, interaguje protein p53 s jinými proteiny a DNA. Mutace genu TP53 kódující protein p53 jsou společným znakem lidské rakoviny. Tato bakalářská práce zkoumá přírodní látky z čaje, které by mohly hrát pozitivní roli v aktivaci proteinu p53 u nádorových onemocnění a uplatnit se v podpoře léčby těchto onemocnění.

V teoretické části bakalářské práce byly popsány sekundární struktury DNA, konkrétně struktura a vlastnosti G-kvadruplexů, dále protein p53 a jeho vazebná aktivita k sekundárním strukturám DNA. Byly popsány vybrané přírodní látky vyskytující se v čajích a potravinách – kyselina gallová a apigenin. Cílem experimentální části této práce bylo ověřit schopnost těchto látek interagovat s G-kvadruplexy *in vitro* a tím je stabilizovat v kvasinkovém modelu a posoudit následný vliv na intenzitu účinku transaktivace proteinu p53. Interakce kvartérních struktur s G4 ligandy byla ověřena *in vitro* pomocí ThT fluorescenčního testu a luciferázového reportérového testu. Bylo zjištěno, že G4 ligandy o koncentraci 30 μM po 20 hodinách inkubace nevykazovaly výraznější vliv na testované kvasinkové kultury. Při koncentraci G4 ligandů 60 μM bylo pozorováno navýšení produkce proteinu p53, vlivem buněčného stresu způsobeného přítomností G4 ligandů.

Klíčová slova: protein p53, G-kvadruplexy, kyselina gallová, apigenin

ABSTRACT

The tumor suppressor protein p53 belongs to the most important regulator of the cell cycle in case of DNA damage. Apart from stopping the cell cycle and inducing apoptosis, protein p53 interacts with other proteins and DNA. Mutation of the TP53 gene encoding the protein p53 are a common feature of human cancer. This Bachelor thesis investigates natural substances from tea which could play a positive role in the activation of protein p53 in cancer and be used to support the treatment of these diseases.

In the theoretical part of the Bachelor thesis, the secondary structures of DNA were described, specifically the structure and properties of G-quadruplexes, as well as protein p53 and its binding activity to the secondary structure of DNA. Selected natural substances found in tea and food were described – gallic acid and apigenin. The aim of the experimental part of this work was to verify the ability of these substances to interact with G-quadruplexes *in vitro* and thus to stabilize them in the yeast model and to assess the subsequent effect on measuring the effect of protein p53 transactivation. The interaction of quaternary structures with G4 ligands was verified *in vitro* by using the ThT fluorescence assay and the luciferase reporter assay. It was found that G4 ligands at 30 μM concentration after 20 hours of incubation did not show a significant effect on the tested yeast cultures. At a 60 μM concentration of G4 ligands, an increase in protein p53 production was observed due to cellular stress caused by the presence of G4 ligands.

Keywords: protein p53, G-quadruplexes, gallic acid, apigenin

FOLTANOVÁ, Klára. *Vliv přírodních látek z čaje na G-quadruplexy a vazebné a trans-aktivační vlastnosti proteinu p53*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148390>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Václav Brázda.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu prof. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Velké díky patří také mé konzultantce Ing. Lucii Šislerové za úsilí, čas, trpělivost a rady, které mi věnovala vždy, když jsem je potřebovala. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat kolektivu oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR, kde byla provedena experimentální část této práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1. Sekundární struktury DNA.....	7
2.2. G-kvadruplexy	7
2.3. Protein p53.....	9
2.3.1. Struktura p53.....	9
2.3.2. Vazebná aktivita p53 k sekundárním strukturám.....	10
2.4. Přírodní látky interagující s G-kvadruplexy	11
2.4.1. Čaje a jejich zdravotní přínosy.....	11
2.4.2. Kyselina gallová.....	11
2.4.3. Apigenin.....	12
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	14
3.1. Materiál a přístroje.....	14
3.1.1. Chemikálie	14
3.1.2. Biologický materiál.....	15
3.1.3. Ostatní	15
3.1.4. Roztoky a jejich příprava	15
3.1.5. Média použitá ke kultivaci kvasinkových kultur	16
3.1.6. Laboratorní přístroje a zařízení	17
3.2. Metody.....	17
3.2.1. Izolace plazmidové DNA	17
3.2.2. Transformace plazmidové DNA do kvasinkového expresního systému	18
3.2.3. Fluorescenční ThT kompetiční test.....	19
3.2.4. Test viability.....	19
3.2.5. Luciferázový reportérový test	20
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	22
4.1. Fluorescenční ThT kompetiční test	22
4.2. Test viability a analýza transkativace proteinu p53.....	25
4.2.1. Test viability.....	25
4.2.2. Luciferázový reportérový test	27
5. ZÁVĚR.....	33
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	34
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	38

1. ÚVOD

V posledních letech došlo k velkému pokroku v objasnění biologických a biochemických vlastností proteinu p53. Jeho mutace a poruchy exprese patří mezi nejčastější příčiny nádorových onemocnění [1]. Nádory se vyvíjejí prostřednictvím genetických a epigenetických změn modifikujících základní buněčné programy růstu a proliferace, po nichž následuje selekce přeprogramovaných buněk, které se nejlépe přizpůsobí různým stresovým podmínkám. Nejčastěji pozměněným genem u lidských nádorů je TP53, kódující protein p53. Hlavním důsledkem mutací genu TP53 je ztráta funkcí proteinu p53 wild type [2].

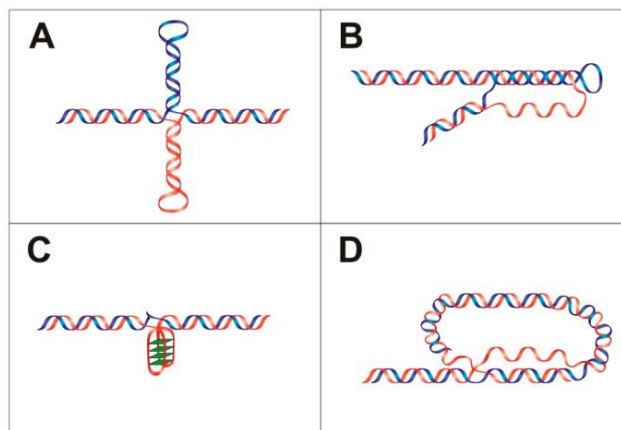
Obnovení původních funkcí proteinu p53 může být jednou z možných metod při léčbě rakoviny. Současná léčba využívá cytostatika, která z pravidla působí na všechny dělicí se buňky a vyvolávají tak také velké množství vedlejších účinků, jako snížení imunity, vypadávání vlasů nebo poruchy trávicího systému [3]. Nádorové tkáně vykazují zvýšenou tvorbu G-kvadruplexů ve srovnání s normálními tkáněmi [4]. G-kvadruplexy přispívají k nestabilitě genomu, proto zvýšená hladina těchto struktur může sloužit jako indikátor maligního progresu. G-kvadruplexy hrají důležitou roli v karcinogenezi a maligním fenotypu rakovinných buněk [5]. Cílem výzkumu mnoha vědeckých skupin je najít sloučeniny, které by byly schopné obnovit funkce proteinu p53. Existuje velké množství přírodních látek, jenž vykazují možné terapeutické účinky. Poznání interakce proteinu p53 s DNA a schopnost vázat se na různé DNA struktury je klíčová pro potenciální využití těchto látek při léčbě nádorových onemocnění [6]. Vzhledem k tomu, že mají G-kvadruplexy velký podíl ve struktuře lidských onemocněních jako je rakovina, byly G-kvadruplexy označeny jako terapeutické cíle [5].

Hlavním zdrojem látek využívaných v medicíně jsou mikroby a rostliny. Přírodní látky jsou biologicky aktivní a u některých byly prokázány různé protinádorové a antioxidační vlastnosti. Mezi zdroje těchto přírodních látek patří také zelený [7], černý [8] a bylinný čaj s obsahem významných antioxidantů kyseliny gallové a apigeninu [9].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Sekundární struktury DNA

Objev struktury B-DNA Watsonem a Crickem v roce 1953 objasnil základní strukturu DNA [10]. Struktury, které neodpovídaly základnímu modelu dvojité šroubovice, byly označovány jako vzácné [11]. Jejich výskyt je ale v genomech všech organismů běžný a hrají zásadní roli při regulaci mnoha biologických funkcí. Vazba proteinů na DNA může zvýšit stabilitu lokální konformace a vyvolat změny, které vedou ke vzniku alternativních struktur DNA, jejichž schéma je znázorněno na Obrázek 1.



Obrázek 1: (A) Křížová struktura; (B) triplex; (C) kvadruplex; (D) T-smyčka [12].

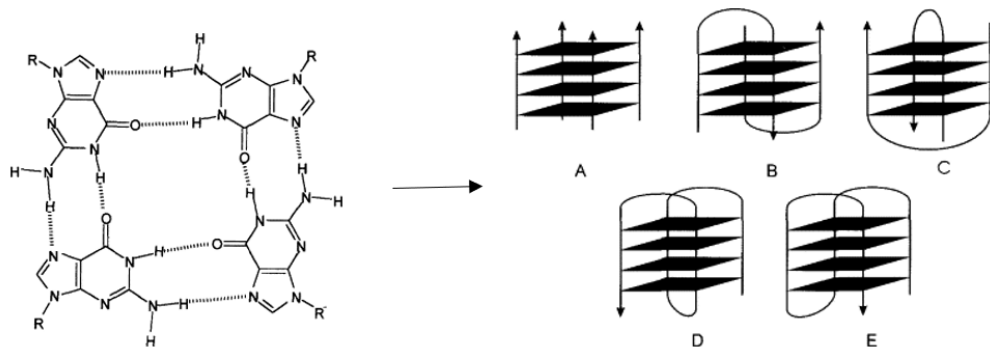
Tvorba křížové struktury je závislá na sekvenci DNA a vyžaduje invertované repetice v sekvenci nukleových kyselin. Délka této repetice by měla být šest nebo více nukleotidů [13]. Křížové struktury se vyskytují v blízkosti replikačních počátků, v oblasti zlomů a promotorů [14]. Tyto struktury jsou schopny ovlivňovat nadšroubovicové vinutí DNA, umístění nukleozomů, ale také tvorbu a stabilizaci dalších sekundárních struktur DNA [12].

Triplex je ne-B-DNA struktura skládající se ze tří řetězců DNA, kde se uplatňuje jak Watson-Crickovo, tak Hoogsteenovo párování bází. Triplexy lze rozdělit do dvou skupin: intramolekulární a intermolekulární. U intramolekulárních triplexů byla prokázána jejich role v regulaci genové exprese [15]. Sekvence tvořící triplexy jsou běžné u genomu eukaryot, vzácnější u prokaryot [16].

Pro tvorbu telomer savců jsou typické tzv. T-smyčky. Tvorba T-smyčky vyžaduje přítomnost proteinu TRF2, spojení telomer z 3' jednořetězcového přesahu a repetice TTAGGG ohraničující dvouřetězcovou telomerní část. Telomerní smyčka je pravděpodobně běžný mechanismus ochrany konců lineárních chromozomů [12].

2.2. G-kvadruplexy

Již dlouho je známo, že guanin agreguje v roztoku ve formě nukleosidů, oligonukleotidů a polynukleotidů [17]. Tetramerní uspořádání guaninů bylo prokázáno v roce 1962 [18]. Čtyři guaninové zbytky mají sklon vázat se ve čtvercové planární konfiguraci zvané guaninový kvartet. Kvadruplexní struktury jsou složeny z dvou či více guaninových kvartetů [19]. Různé možnosti tvorby G-kvadruplexů jsou znázorněny na Obrázek 2.



Obrázek 2: Struktura guaninového kvartetu a různé formy guaninových kvadruplexů, složených ze čtyř kvartetů. (A) lineární čtyřvláknový; (B) dimerní vlásenka s okrajovou smyčkou; (C) dimerní vlásenka s diagonální smyčkou; (D) jednomolekulární s diagonální centrální smyčkou; (E) unimolekulární s centrální smyčkou okrajového typu [19].

Tvorba guaninového kvartetu je závislá na kationtech. Sodné a draselné ionty patří mezi nejúčinnější při stabilizaci kvadruplexů [17]. Zmíněné kationty obsazují centrální dutinu mezi vrstvami a neutralizují elektrostatické odpuzování guaninových kyslíků [20]. Ve struktuře mohou být přítomny i dvojmocné vápenaté a hořečnaté kationty [21]. Nejpravděpodobnějším místem k nalezení kvadruplexů v přírodě je telomera, neboli terminální oblast lineárních chromozomů [22]. U savců je genomová distribuce G-kvadruplexů specifická pro genomové oblasti jako jsou promotory, vazebná místa transkripčních faktorů, místa s dvouvláknovými zlomy a již zmíněné telomery [23].

Vzhledem k častému výskytu G-kvadruplexů v telomerické DNA a aktivitě telomerázy v zárodečných a rakovinových buňkách se předpokládá, že právě enzym telomeráza může hrát roli v nekontrolovatelném růstu nádorových buněk [24, 25]. G-kvadruplexy mohou být také lokalizovány v promotorových oblastech onkogenů, což může vést ke vzniku zhoubného bujení. G-kvadruplexy zde fungují jako regulátory transkripce, translace, replikace a hrají významnou roli v genové stabilitě [26]. Přírodní látky interagující s G-kvadruplexy jsou potenciálními terapeutickými cíli při léčbě nádorových onemocnění. V současné době je proto studium těchto struktur věnována zvýšená pozornost [27]. Ve srovnání onkogenů a nádorových supresorů je tvorba G-kvadruplexů podstatně vyšší právě u onkogenů. Proto se G-kvadruplexy považují za perspektivní pro léčbu onkologických onemocnění [28]. První důkaz interakce G-kvadruplexů s látkami stabilizujícími jejich strukturu, která vedla k inhibici aktivity telomerázy, popsala studie již v roce 1997 [29]. Bylo prokázáno, že se nádorový supresorový protein p53 váže na různé struktury DNA, jako jsou sekvence tvořící G-kvadruplexy, křížové tvary a další lokální struktury DNA [30].

Současný výzkum zdůrazňuje vliv a význam G-kvadruplexů u vazby a aktivity transkripčních faktorů, jako je protein p53. Disfunkce kvartérních struktur byly pozorovány u neurodegenerativních a nádorových onemocnění. Jsou tak potenciálními cíli pro terapie zaměřující se na DNA, zejména při návrhu protinádorových léků [31].

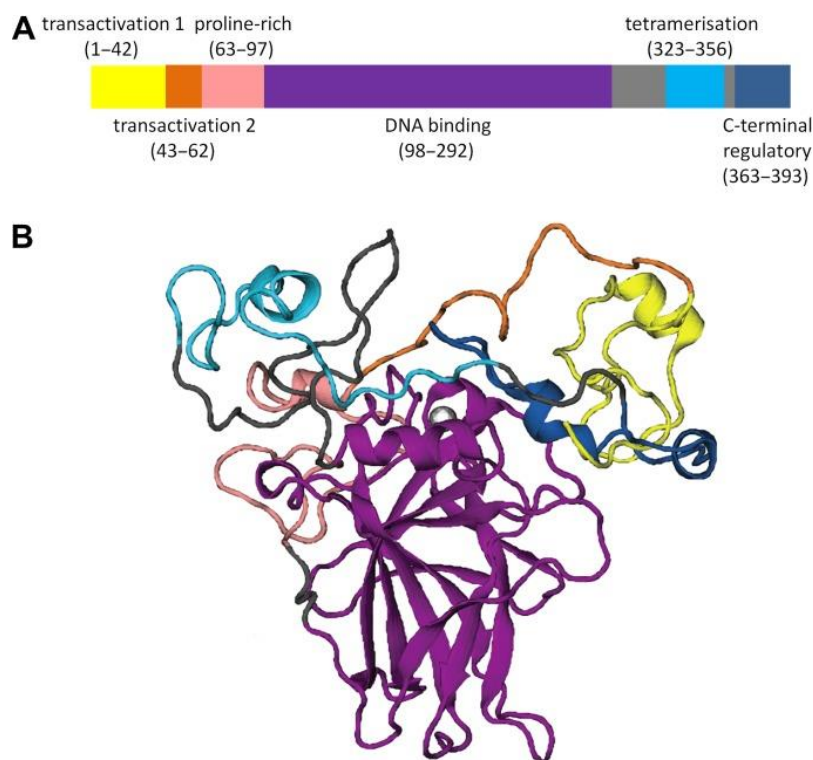
2.3. Protein p53

Gen TP53 kóduje nádorový supresorový protein p53, jinak označován jako strážce genomu. Byl poprvé identifikován v roce 1979 jako buněčný protein, který se váže na T antigen opičího viru a hromadí se v jádře rakovinných buněk [32]. Protein p53 je jedním z nejvíce studovaných nádorových supresorových proteinů a jeho regulace a vztah k onkologickým onemocněním byly rozsáhle studovány [12]. Je součástí signálních drah, kterými buňka reaguje na stresové podmínky a jeho cílem je minimalizovat škody způsobené těmito vlivy. Jedná se o transkripční faktor se schopností navodit expresi genů, které navozují zastavení buněčného cyklu. Běžně se p53 wild-type (wtp53) váže na negativní regulátor a je inaktivován. Pokud v buňce dojde k poškození DNA, je p53 aktivován. Díky tomu má buňka dostatek času na opravu [33]. Mutace nebo funkční inaktivace nádorového supresoru p53 je téměř univerzálním rysem lidské onkologických onemocnění [34].

Interakce wtp53 s transkripčními faktory usnadňuje represi nebo aktivaci vhodných genů, tento proces je ale narušen přítomností mutantního mtp53 [35]. Mutace nebo funkční inaktivace genu TP53 jsou častými jevy v nádorových buňkách, kde přispívají k metastázování a ke vzniku rezistence vůči léčbě nádoru. V lidských nádorech je mutace tohoto genu způsobena nukleotidovou substitucí převážně v DNA vazebné doméně, což znemožňuje vazbu proteinu na DNA. Bodová mutace může změnit smysl kodónu, následně záměně aminokyseliny v molekule proteinu a tím vést ke změně nebo ztrátě funkce [36].

2.3.1. Struktura p53

Protein p53 se skládá z 393 aminokyselin s několika funkčními doménami. N-koncová doména, tvořená aminokyselinami 1-42, obsahuje vazebné místo pro ubikvidin ligázu a transkripčně aktivační doménu, na kterou se vážou proteiny transkripčního aparátu buňky. Doména bohatá na prolin, tvořená aminokyselinami 63-97, reguluje transaktivaci apoptických genů, které navozují spuštění programované buněčné smrti. C-koncová doména, kterou tvoří aminokyseliny 363-393. Centrální DNA vazebná doména, tvořená aminokyselinami 98-292, umožňuje rozpoznání cílových sekvencí DNA [37]. Centrální doména proteinu p53 je hlavní oblastí odpovědnou za sekvencně specifickou vazbu na B-DNA. Tato oblast obsahuje všechny běžné mutace pozorovatelné u rakoviny. Tyto hotspot mutace mění konformaci DNA vazebné domény, nebo způsobují mutaci aminokyseliny, která je přímo v kontaktu s DNA. V několika výzkumech byla ověřena důležitost jednotlivých aminokyselinových zbytků interagujících s DNA. C-koncová doména obsahuje aminokyselinové zbytky interagující s triplexy a G-kvadruplexy [38]. Strukturu proteinu p53 a jeho doménu znázorňuje Obrázek 3.



Obrázek 3: (A) doména p53; (B) struktura p53 [39].

2.3.2. Vazebná aktivita p53 k sekundárním strukturám

Mnohé vlastnosti proteinu p53, jako jsou zástava buněčného cyklu, apoptóza a oprava DNA, jsou realizovány prostřednictvím jeho interakce s proteiny a DNA. Přestože transkripce genu zprostředkovaná p53 je většinou spojena s jeho přímou interakcí s DNA, p53 také zřejmě interaguje s mnoha dalšími proteiny, včetně několika transkripčních faktorů a regulátorů [40]. To ukazuje na jeho důležitou roli v mnoha zásadních regulačních procesech buňky [41]. Oproti jiným transkripčním faktorům nejsou jeho cílová místa DNA definována konkrétní sekvencí. Protein p53 je schopen se navázat na různé sekvence DNA tvořící sekundární struktury. Mnohé z těchto struktur hrají významnou roli v regulaci rozmanitých biologických procesů [16]. Vazebné preference p53 byly objasněny již před více než dvaceti lety. Proto vazba p53 k sekundárním strukturám není překvapivá [42].

Protein interaguje se strukturou T-smyčky jako tetramer nebo dva tetramery. Kromě toho váže jednovláknovou sekvenci TTAGGG s vysokou afinitou v oligonukleotidech a dvouvláknové formě plazmidové DNA. Kooperace s proteinem TRF-2 naznačuje důležitost p53 při tvorbě nebo udržení struktury T-smyčky. Jako proteinové cíle jsou často identifikovány palindromické sekvence, které se v genomu nenacházejí náhodně, ale v blízkosti zlomových spojení, promotorů a počátků replikace. Invertované repetice jsou také často v blízkosti cílových sekvencí p53 [38].

2.4. Přírodní látky interagující s G-kvadruplexy

Nádorová onemocnění jsou celosvětově jednou z nejčastějších příčin úmrtí a účinná terapeutika pro její léčbu nejsou doposud vždy dostupná i přes rozsáhlý výzkum v této oblasti. Mezi hlavní problémy patří faktory spojené s tradičními chemoterapeutiky, především látková rezistence a nežádoucí vedlejší účinky. Proto roste poptávka po nových protinádorových léčích, které jsou účinné a bezpečné pro léčbu i prevenci rakoviny [43]. Jednou z kategorií těchto látek, které mohou přispívat k léčbě jsou i látky, které interagují s G-kvadruplexy - G4 ligandy. Některé ze známých G4 ligandů se vyskytují v běžných potravinách.

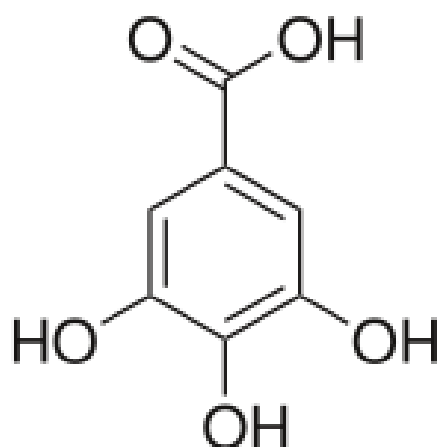
2.4.1. Čaje a jejich zdravotní přínosy

Bylinné čaje se používají jako terapeutické prostředky v mnoha formách tradiční medicíny a jsou oblíbeným celosvětovým nápojem. Obvyklá konzumace černého a zeleného čaje pocházejícího z rostliny *Camellia sinensis* přesahuje několik tisíc let [44]. Byly provedeny studie vztahu mezi bylinným čajem a nádorovými onemocněními, které prokázaly, že pravidelná konzumace heřmánkového čaje po řadu let byla spojena se sníženým rizikem rakoviny štítné žlázy [45].

Čajové flavonoidy patří do velké skupiny polyfenolů s antioxidačními a protizánětlivými vlastnostmi. Tyto sloučeniny jsou produkovány čajovníky a vykazují *in vivo* aktivity podobné aktivitám biologických látek, které se široce využívají jako terapeutika při chronických zánětlivých onemocněních [46].

2.4.2. Kyselina gallová

Kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová je přírodní botanická fenolická látka, která se hojně vyskytuje v různých rostlinách a potravinách. Příkladem jejího výskytu jsou ořechy, čajové lístky, citrón, hrozny, zelený čaj, červené a bílé víno [47]. Studie prokázaly ochranné účinky zeleného čaje před vznikem některých typů nádorů [48]. Je o ní známo, že ovlivňuje několik farmakologických a biochemických drah. Má různé účinky na různé typy onkologických onemocnění na odlišných molekulárních úrovních. Dále vykazuje selektivní cytotoxicitu pro onkogenní buňky a má naopak velmi malé toxické účinky pro zdravé buňky [49]. Nedávné zprávy o schopnosti kyseliny gallové snižovat poškození neuronů a mozkové amyloidní neuropatologie, charakteristické pro Alzheimerovu chorobu, značně zintenzivnily výzkum této sloučeniny a obecný zájem o její vlastnosti [50].



Obrázek 4: Struktura kyseliny gallové.

Kyselina gallová, kterou identifikoval Carl Wilhelm Scheele, je šedý prášek s kyselou chutí, který šumí v roztoku uhličitanu vápenatého. Je dobře rozpustná ve vodě, etheru, alkoholu a glycerolu [51]. Má silně antibakteriální, protizánětlivé, antimutagenní a antioxidační vlastnosti [52]. Protinádorová aktivita byla popsána u několika typů rakoviny, jako je rakovina plic [53], prostaty [54], prsu [55], tlustého střeva [56] a leukémie [57]. Tato aktivita spočívá především v apoptóze a zastavení buněčného cyklu, dále vykazuje potenciál do budoucna jako lék proti rakovině [43]. Antioxidační aktivita kyseliny gallové byla stanovena měřením jejích různých schopností, jako například neutralizovat umělý radikál, redukovat kovové ionty a inhibovat oxidační procesy. U všech testů byl potvrzen její silný antioxidační účinek [58]. Její antioxidační schopnost souvisí s počtem hydroxylových skupin v kruhové struktuře [59], kterou znázorňuje Obrázek 4. Dále je spojen s její schopností zvýšit aktivitu enzymů, jako jsou superoxid dismutázy a katalázy, nebo schopností navýšit množství neenzymatických antioxidantů, jako je vitamin C a E [60].

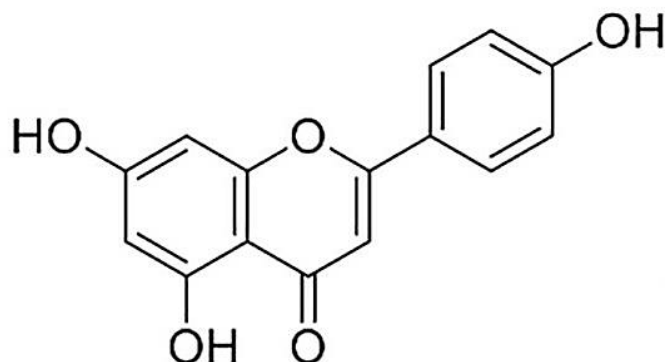
Studie potvrzují interakci kyseliny gallové s G-kvadruplexy jak *in vitro*, tak *in vivo*. Konkrétně se zaměřuje na G-kvadruplexy v ribozomální DNA a CMYC onkogenu, což vede k ovlivnění genové exprese. Dále bylo prokázáno, že kyselina gallová stabilizuje G-kvadruplexy inhibicí transkripce několika onkogenů a indukci poškození DNA [61].

2.4.3. Apigenin

Apigenin, také známý jako versulin nebo 4',5,7-trihydroxyflavon [62], je flavonoid spadající do skupiny přirozeně se vyskytujících polyfenolů. Je široce distribuován v rostlinách, jako je celer, petržel a heřmánek [63], dále je součástí červeného vína a piva. Několik těchto rostlinných bioaktivních sloučenin vykazovalo aktivity, které naznačují, že by mohly hrát významnou roli v prevenci proti široké škále chronických onemocnění. [64]. Tyto sloučeniny působí jako lapače volných radikálů a antioxidanty. Vykazují antimutagenní a protizánětlivé účinky [65].

Vzhledem k účinnosti apigeninu při potlačování růstu buněk v různých typech lidské rakoviny, tedy leukémii, rakovině štítné žlázy, kůže, prostaty, tlustého střeva a prsu, má potenciál jako terapeutikum [66]. Spouští zástavu buněčného cyklu a aktivuje proces apoptózy v rakovinných

buňkách. Bylo provedeno mnoho výzkumů o příznivých účincích apigeninu na různé kožní problémy, jako jsou kožní skvrny, vrásky, záněty vyvolané UV zářením a dermatitida.



Obrázek 5: Chemická struktura apigeninu [67].

V přírodě se vyskytuje jak v čisté, tak v glykosylované formě. Čistý apigenin je relativně nestabilní kvůli vysokému počtu hydroxylových skupin, což usnadňuje proces jeho degradace. V glykosylované formě má lepší rozpustnost ve vodě, což je potřeba brát v úvahu při extrakčních metodách používaných pro výrobu léčiv z rostlinných zdrojů bohatých na apigenin. V čisté formě je apigenin žlutá krystalická látka, která je prakticky nerozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v ethanolu, DMSO a DMF [62].

Je známo, že apigenin inhibuje buňky karcinomu prostaty ve fázi G2. Současně snižuje hladiny mRNA a proteinů klíčových regulátorů, které řídí přechod z G2 do M fáze. Na základě provedených studií apigenin způsobuje zastavení buněčného cyklu v G2 fázi represí transkripční aktivity genů pro regulátory řídící přechod z G2 do M fáze [68]. Apigenin se zaměřuje na desítky farmakologických cílů, jako jsou estrogenové receptory, membránové proteiny, proteiny související s buněčným cyklem a mnoho dalších signálních drah [69].

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)

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

Nosičová DNA – Salmon sperm (THERMOFISHER)

Syntetické oligonukleotidy hTel24 1, mycPU21 1, Random 22-1, hTel24 2 (SIGMA ALDRICH)

Tabulka 1: Název a sekvence použitých oligonukleotidů.

Název	Sekvence	G4 skóre
mycPU21 1	AGCTTGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAA	1,889
hTel24 1	AGCTTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAA	1,2
Random 22-1	TAGATCTGGATTGACTCTATGA	0,182
hTel24 2	AGCTTTAACCCTAACCCCTAACCCCA	-1,2

Thioflavin T (SIGMA ALDRICH)

Kyselina gallová, 98% (ACROS ORGANICS)

Apigenin, 97% (Alfa Aesar)

Adenin (SIGMA ALDRICH)

Histidin (SIGMA ALDRICH)

Lysin (SIGMA ALDRICH)

Uracil (SIGMA ALDRICH)

Tryptofan (SIGMA ALDRICH)

Leucin (SIGMA ALDRICH)

NaOH (SIGMA ALDRICH)

sterilní H₂O

TAE 50x (SIGMA ALDRICH)

EDTA (SIGMA ALDRICH)

Tris-HCl (DUCHEFA BIOCHEMIE)

KCl (SIGMA ALDRICH)

PEG (SIGMA ALDRICH)

TE (SIGMA ALDRICH)

dextrosa (SIGMA ALDRICH)

glukóza (SIGMA ALDRICH)
MgCl₂ (SIGMA ALDRICH)
trypton (VWR PROLABO CHEMICALS)
kvasinkový extrakt (SIGMA ALDRICH)
MgSO₄ (SIGMA ALDRICH)
LiAc (SIGMA-ALDRICH)

3.1.2. Biologický materiál

Plazmidová DNA pRS15 (Biofyzikální ústav Akademie věd ČR)
Plazmidová DNA pRS314 (Biofyzikální ústav Akademie věd ČR)
Plazmidová DNA pRSp53 (laboratoř profesora Alberta Inga, CIBIO institut v Trentu, Itálie)
Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* PUMA, PUMA-KSHV (Biofyzikální ústav Akademie věd ČR)

Tabulka 2: Použitá plazmidová DNA.

Plazmidová DNA	Inzert	Selekční marker
pRS314	-	Promotor pro syntézu tryptofanu
pRS315	-	Promotor pro syntézu leucinu
pRSp53	wtp53	Promotor pro syntézu leucinu

Tabulka 3: Použité kmeny *Saccharomyces cerevisiae* s vloženými sekvencemi.

Kmen	Vložená sekvence
PUMA	CTGCAAGTCCTGACTTGTCC
PUMA-KSHV	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGGGCGGGGGACGGGGGAGGGG

3.1.3. Ostatní

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 sterilní 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

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

SOC médium:

2 % trypton, 0.5 % kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza

Kompletní neselektivní tekuté YPDA médium:

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

Syntetické leucin a tryptofan selektivní médium (ItA):

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
10 ml/l 1% leucin
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
10 ml/l 1% leucin

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)
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)
Flow-box – Bio II Advance Plus (TELSTAR)
Systém čištění vody (Synergy UV)

3.2. Metody

3.2.1. Izolace plazmidové DNA

Při izolaci plazmidové DNA byl použit komerční kit E.N.Z.A. Plasmid DNA mini kit I od firmy OMEGA BIO-TEK. Zmražené kultury předem připravených kompetentních buněk *Escherichia Coli* STBL4 byly zaočkovány do 15 ml tekutého LB média s obsahem ampicilinu a ponechány přes noc při 30 °C a 140 rpm. Následně byly buňky přeneseny do 2 ml zkumavek a stočeny při 10000 x g po dobu jedné minuty při laboratorní teplotě a veškerý supernatant byl odebrán. Získaný pelet byl dvakrát promyt sterilní vodou. K peletu bylo přidáno 250 µl Solution I s obsahem RNázy A a směs byla vortexována do úplného resuspendování. K těmto vzorkům bylo přidáno 250 µl Solution II a celá směs byla několikrát promíchána pomalým otáčením, aby bylo dosaženo úplné lýzy buněk. Dále bylo přidáno 350 µl Solution III a roztok byl ihned opatrně promíchán, až došlo ke vzniku bílé sraženiny. Vzorky byly stočeny po dobu 10 minut na maximální rychlost. Do sterilních 2 ml zkumavek byla nasazena kolona Spin Column, na kterou byly přeneseny jednotlivě odebrané supernatanty ze stočených vzorků. Po minutové centrifugaci byl supernatant ze zkumavek odebrán a na kolonu bylo následně přidáno 500 µl HBC Bufferu s přidáním 100% isopropanolem. Vzorky byly v nových 2ml zkumavkách stáčeny jednu minutu na maximální otáčky. Na kolonu bylo přidáno 700 µl DNA Wash Bufferu s přidáním 99,8% ethanolem a vzorky byly stočeny na maximální otáčky 30 s. Dvojitou centrifugací bylo dosaženo vysušení membrány v kolonách, které byly umístěny do nových zkumavek a po přidání 50 µl elučního pufru a stočením po jednu minutu byla získána izolovaná plazmidová DNA.

Na přístroji NanoDrop byla stanovována koncentrace a čistota získaných vzorků. Principem měření je spektrofotometrické vyhodnocení absorbance světla při vlnové délce 260 nm a 280 nm z kapky vzorku. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm udává koncentraci přítomných proteinů. Vzorek s hodnotou poměru A260/A280 ~ 1,8 je považován za čistý. Poměr A260/230 stanovuje, že vzorek není znečištěn organickými látkami. Optimální hodnoty pro tento poměr jsou ~ 2,0-2,2.

Tabulka 4 Výsledky naměřené přístrojem NanoDrop při testování vzorků po izolaci plazmidové DNA.

vzorek	koncentrace (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Blank	0,0	0,0	0,000
314	207,9	1,9	2,3
p53 WT	119,0	1,9	2,3
315	343,6	1,9	2,2

3.2.2. Transformace plazmidové DNA do kvasinkového expresního systému

Tato metoda byla provedena za účelem sledování závislosti odezvy transaktivací aktivity proteinu p53, na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti G-kvadruplexu. Oba použité kmeny kvasinek, viz. Tabulka 3, obsahují reportérový gen pro luciferázu LUC1.

Kvůli neschopnosti kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* exprimovat protein p53, byly pro tento účel cíleně modifikovány. Pro selekci transformovaných kvasinek byl použit plazmid pRS314, který je tryptofan specifický, a plazmid pRS315, který je leucin specifický. Dále byl použit plazmid pRSp53, který byl přidán s cílem exprese proteinu p53. Tento plazmid obsahuje promotor pro syntézu leucinu, bylo tedy možné docílit selekce na tryptofan leucin (ItA) selektivních miskách.

Zmražené kultury *Saccharomyces cerevisiae* byly sterilně odebrány a z připravených roztěrů byla odebrána jedna kolonie, která byla inkubována v 10 ml tekutého YPDA média přes noc při 30 °C a 210 rpm. Další den byl pelet z 1 ml kultury po stočení a odsátí média resuspendován ve sterilní vodě a následně centrifugován v 1,5ml zkumavkách značky Eppendorf. Tento proces byl proveden dvakrát. K získanému peletu byly přidány 2 μl od každého izolovaného plazmidu (v kombinaci s 5 μl salmon sperm, předehřátého na 100 °C na 10 minut a ihned uloženého na led). Použité plazmidy jsou znázorněny v Tabulka 2. Tyto plazmidy jsou prázdné vektory, které obsahují promotory pro syntézu tryptofanu (pRS314) a leucinu (pRS315). Plazmid plsWT obsahuje inzert genu pro p53 wild type.

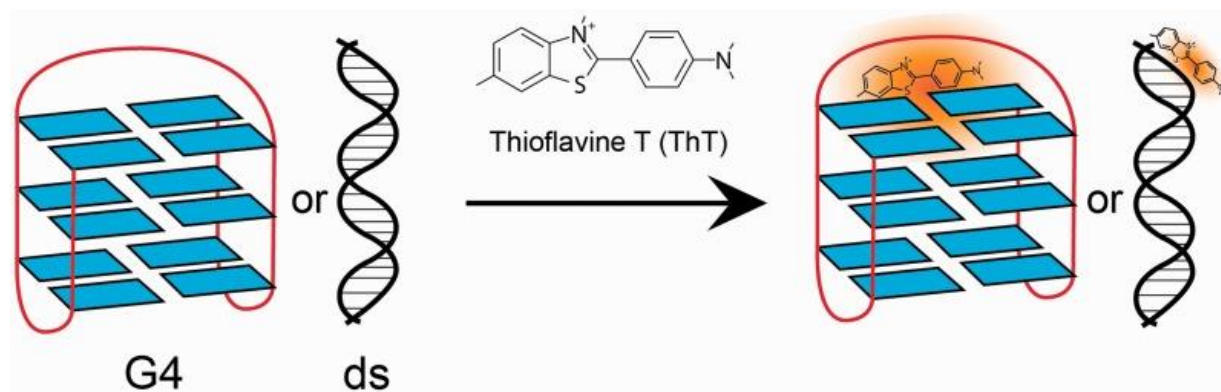
Dále bylo přidáno 300 μl předem připravené směsi PEG/LiAc/TE (1 ml: 100 μl 10xTE, 100 μl 1M LiAc a 800 μl 50% PEG) a 36 μl DMSO. Vše bylo opatrně promáchno pipetou a zkumavky byly vloženy do šikmého stojanu a ponechány třepat 30 minut při 30 °C a následně přesunuty na 15 minut do 42 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány 3 minuty a veškerý supernatant byl odstraněn. Získaný pelet byl resuspendován v 400 ul sterilní vody a 80 μl transformované směsi bylo rozetřeno na selektivní YNB miskách a inkubováno tři dny při 30 °C. Následně byly z narostlých kultur připraveny obdélníkové roztěry jednotlivých kolonií a misky byly inkubovány dva dny při 30 °C. Kombinací zmíněných plazmidů s oběma kmeny kvasi-

nek bylo docíleno získání transformovaných buněk selektovatelných na ItA miskách, tedy bez obsahu leucinu a tryptofanu. Transformace byla provedena pomocí tepelného šoku.

3.2.3. Fluorescenční ThT kompetiční test

Barvivo Thioflavin T (ThT) se využívá jako fluorescenční světelná sonda pro identifikaci vytvořených G-kvadruplexů. ThT se stává silně fluorescenčním v přítomnosti kvartérní struktury a využívá se tak jako rychlý test pro přítomnost G-kvadruplexů. Schéma testu znázorňuje Obrázek 6. Použité oligonukleotidy, jež znázorňuje Tabulka 1, byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich a zředěny vodou na koncentraci 100 μM . Celý test byl proveden při laboratorní teplotě.

Vzorky byly následně zředěny na finální koncentraci 2 μM v 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 100 mM KCl. Následně byly zahřívány na 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut a pomalu ochlazovány na laboratorní teplotu. Ochlazování probíhalo v termobloku přes noc. Mikrozkušavky byly obaleny parafilmem, aby nedošlo k odpaření vzorku. Thioflavin T byl naředěn vodou na koncentraci 1 μM . Měření probíhalo v černé 384-jamkové destičce při laboratorní teplotě. Vybrané oligonukleotidy byly smíchány s ThT v molárním poměru 1:0,5, ve výsledném objemu 20 μM a finální koncentraci 1 μM pro DNA a 0,5 μM pro ThT (2 μM vzorek oligonukleotidu o objemu 10 μl a 1 μM ThT o objemu 10 μl). Všechny vzorky byly měřeny v tripletu, kde poslední triplet byl ThT s vodou použitý jako negativní kontrola. Dále bylo měření opakováno za přítomnosti apigeninu a kyseliny gallové. Byla sestavena vhodná koncentrační řada pro každý G4 ligand a k 10 μl oligonukleotidu bylo přidáno 5 μl 2 μM ThT a 5 μl G4 ligandu. Fluorescence byla měřena při 490 nm po excitaci při 425 nm.



Obrázek 6: Princip ThT testu za použití Thioflavinu T. Fluorescence ThT je zesílena při interakci s G-kvadruplexem. V případě nízkého fluorescenčního signálu se v sekvenci pravděpodobně G-kvadruplex nenachází [70].

3.2.4. Test viability

Pro test viability byly založeny kultury *Saccharomyces cerevisiae*, kmen PUMA, do tekutého YPDA média. Sterilním párátkem byly buňky odebrány z křížových roztěrů a přeneseny do 15ml centrifugačních zkumavek s obsahem tekutého YPDA média o objemu 8 ml a inkubovány přes noc při 30 $^{\circ}\text{C}$ a 210 rpm.

Do 96-ti jamkové destičky byla napipetována koncentrační řada příslušných ligandů a buněk, vždy ve 2 opakováních, ve výsledném objemu 200 μl . Nejvyšší koncentrace byla zvolena 500 μM a byla postupně ředěna tekutým YPDA médiem. Byl ověřen vliv 1% DMSO na via-

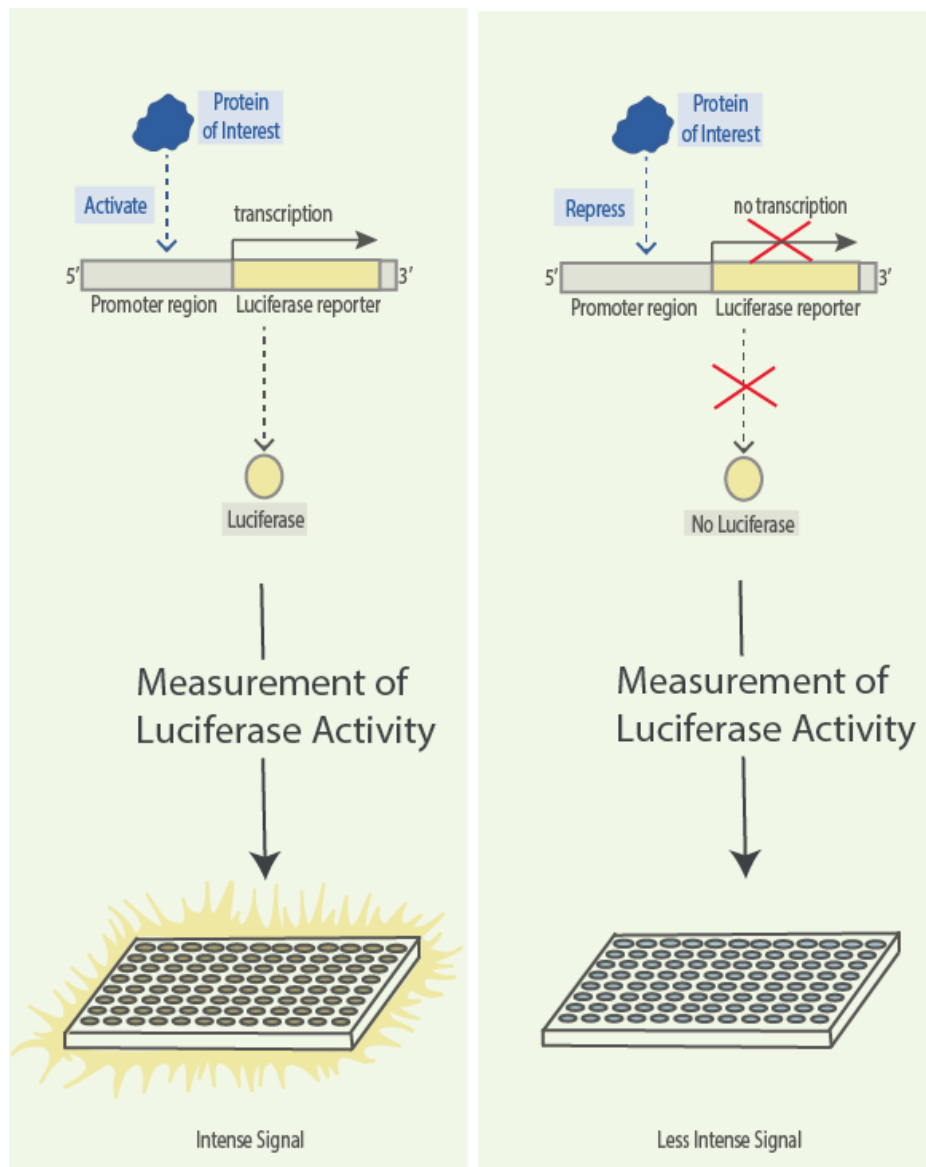
bilitu, jelikož sypké G4 ligandy byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 100 mM. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl média s buňkami o optické hustotě 0,2 při 600 nm. Jako negativní kontrola bylo použito 200 µl ATB (antibiotikum GENETICIN 50 mg/ml) a 100 µl média s buňkami. Následně byla měřena optická hustota při 600 nm po dobu 24 hodin a z těchto dat byla sestavena růstová křivka. Na základě testu viability byla vybrána vhodná koncentrace ligandů pro luciferázový reportérový test, při které buňky optimálně rostou. Dále byla pro porovnání vybrána velmi hraniční koncentrace, při které růstová křivka již není optimální, buňky ale stále množství ligandu přežijí. Rozložení destičky při měření znázorňuje Tabulka 5.

Tabulka 5: Schéma rozložení jednotlivých vzorků v destičce při měření. Jako pozitivní kontrola (PK) bylo použito médium s buňkami.

		Koncentrace apigeninu v µM								
PK	1% DMSO	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK
PK	1% DMSO	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK
PK	1% DMSO	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK
		Koncentrace kyseliny gallové v µM								
PK	1% DMSO	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK
PK	1% DMSO	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK
PK	1% DMSO	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK

3.2.5. Luciferázový reportérový test

Luciferázový reportérový test je běžný bioluminiscenční test v molekulární biologii, který využívá enzym luciferázu a substrát (jako je luciferin) ke studiu genové regulace na úrovni transkripce. Hlavními výhodami tohoto testu je jeho vysoká citlivost, a především reprodukovatelnost měření. Luciferáza je enzym způsobující bioluminiscenci mnoha živých organismů, nejčastěji světlušek. Oxiduje luciferin na oxy-luciferin za uvolnění světelného záření. V principu luciferázový reportérový test zkoumá, zda protein může aktivovat nebo potlačit expresi cílového genu pomocí luciferázy jako reportérového proteinu [71]. Syntéza reportérového proteinu vede k chemické reakci s bioluminiscencí jako vedlejším produktem. Toto záření přímo koresponduje s účinkem proteinu na expresi cílového genu. Mechanismus znázorňuje Obrázek 7.



Obrázek 7: Mechanismus luciferázového testu. Když sledovaný protein aktivuje transkripci genu, dochází k markantnímu nárůstu bioluminiscence (obrázek vlevo). Pokud však protein potlačí transkripci, je signál velmi nízký (obrázek vpravo) [72].

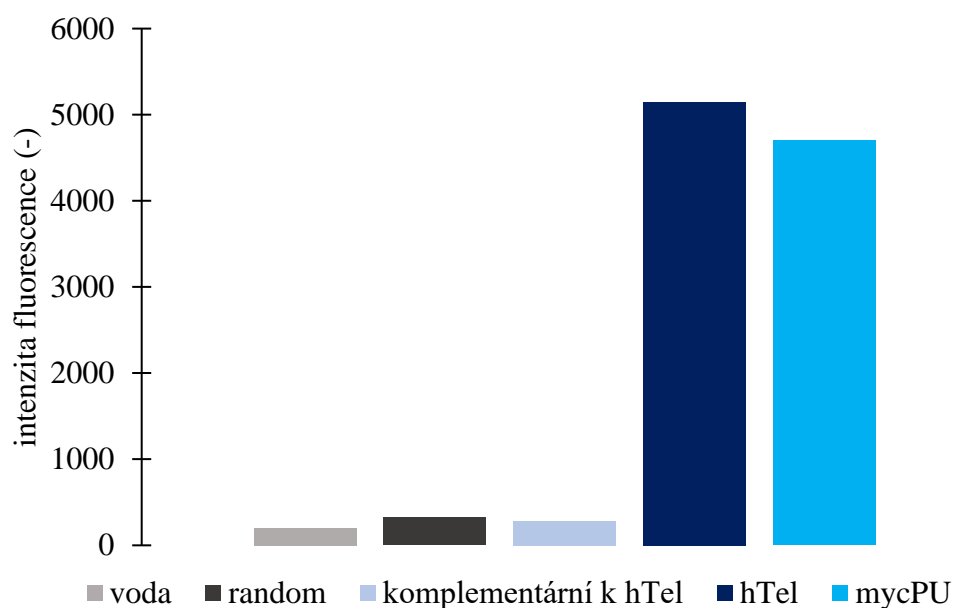
Pro náš experiment bylo do 96-ti jamkové destičky napipetováno 200 μ l SRItA média. Sterilním párátkem bylo odebíráno vždy stejné množství narostlé kultury z obdélníkových roztěrů a důkladně resuspendováno v médiu v jamce. Od každého typu transformantu bylo připraveno vždy pět opakování, v šesté jamce bylo pouze médium jako negativní kontola. Do další 96-ti jamkové destičky bylo multikanálovou pipetou přeneseno 60 μ l média s buňkami a následně 60 μ l média s přídavkem 0,15% galaktózy bez ligandu, s apigeninem nebo kyselinou gallovou ve výsledné koncentraci korespondující s hodnotami z testu viability. U této destičky byla měřena optická hustota při 600 nm v čase T0. Do bílé 384-jamkové destičky bylo přeneseno 20 μ l média s buňkami tak, že dva řádky z 96-ti jamkové destičky odpovídaly jednomu řádku na 384-jamkové destičce. Do každé jamky bylo přidáno 20 μ l lyzačního pufru. Destička byla inkubována při 500 rpm po dobu 15 minut. Před samotnou analýzou bylo do jamek přidáno 20 μ l luciferázového substrátu Bright Glo Luciferase assay systema. Ihned po přidání byla mě-

řena intenzita luminiscenčního signálu. 96-ti jamková destička byla zalepena parafilmem a ponechána inkubovat 20 hodin při 30 °C. Po uplynutí požadované doby byla každá jamka důkladně resuspendována a změřena optická hustota při 600 nm v čase T20. Stejným způsobem jako v čas T0 bylo přeneseno médium s buňkami do nové 384-jamkové destičky. Po přidavku lyzačního pufru, inkubaci při 500 rpm po dobu 15 minut a po přidavku 20 µl luciferázového substrátu, byla měřena intenzita luminiscenčního signálu v čase T20.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

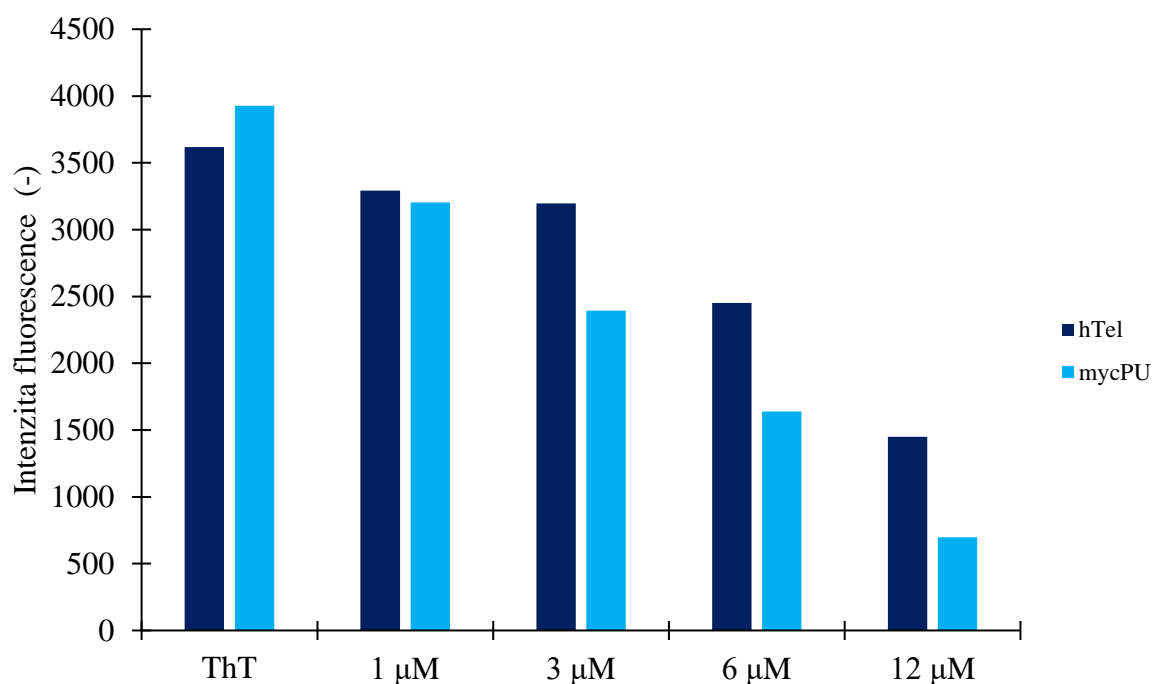
4.1. Fluorescenční ThT kompetiční test

Byly testovány syntetické oligonukleotidy, jejichž názvy a sekvence jsou v Tabulka 1. Schopnost ThT vázat se na vybrané oligonukleotidy byla nejprve měřena bez přítomnosti G4 ligandů, pouze se samotnými oligonukleotidy. ThT bylo měřeno s vodou. Toto měření nám slouží jako rychlý test, zda námi zvolené sekvence tvoří kvadruplexy. Z grafu je patrné, že největší pravděpodobnost k vytvoření kvadruplexů mají oligonukleotidy hTel a mycPu. Pro porovnání byla testována i komplementární sekvence pro hTel, kde vlivem přítomnosti komplementárních bází v sekvenci nevznikají žádné kvadruplexy.



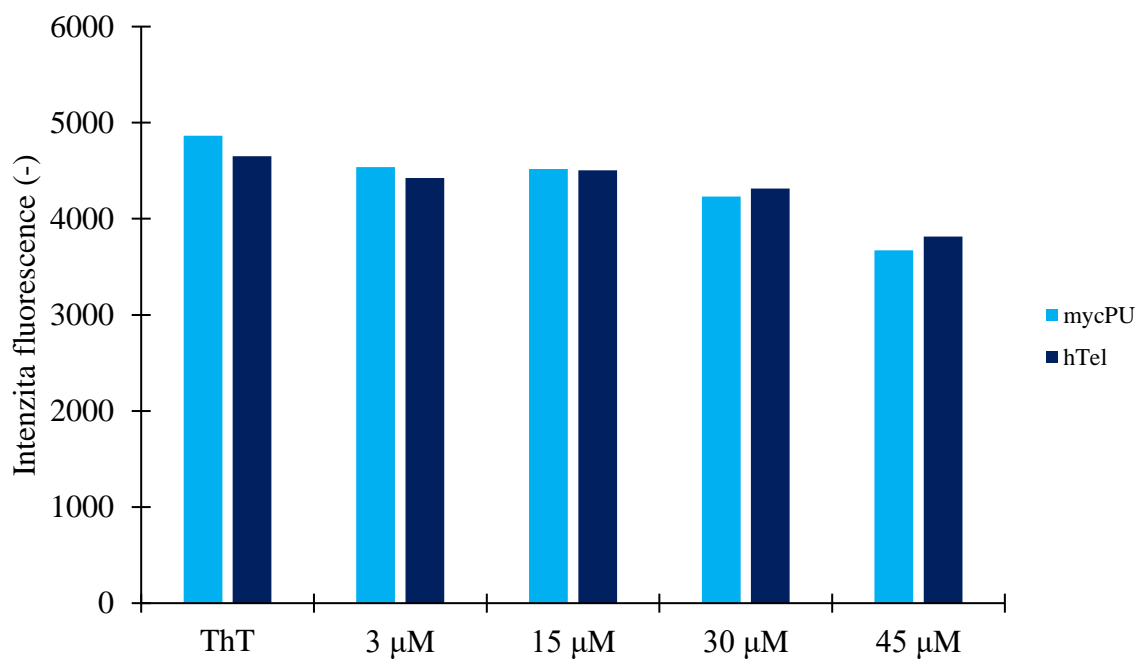
Obrázek 8: Graf znázorňující intenzitu záření ThT s vodou a s oligonukleotidy. Míra intenzity fluorescence udává pravděpodobnost vytvoření G-kvadruplexu v sekvenci oligonukleotidu.

Pro další měření byly použity pouze oligonukleotidy s nejvyšší pravděpodobností tvorby kvadruplexů za přítomnosti G4 ligandů. Nejprve byla testována kyselina gallová, jejíž vzorky byly připraveny o koncentracích 1 µM, 3 µM, 6 µM a 12 µM. Graf byl sestaven z naměřených hodnot intenzity fluorescence ThT. V Obrázek 9 můžeme pozorovat jistý trend, kde s rostoucí koncentrací kyseliny gallové klesá intenzita fluorescence. Kyselina gallová působí jako kompetiční látka pro ThT, váže se tak místo něj, čímž klesá intenzita fluorescence.



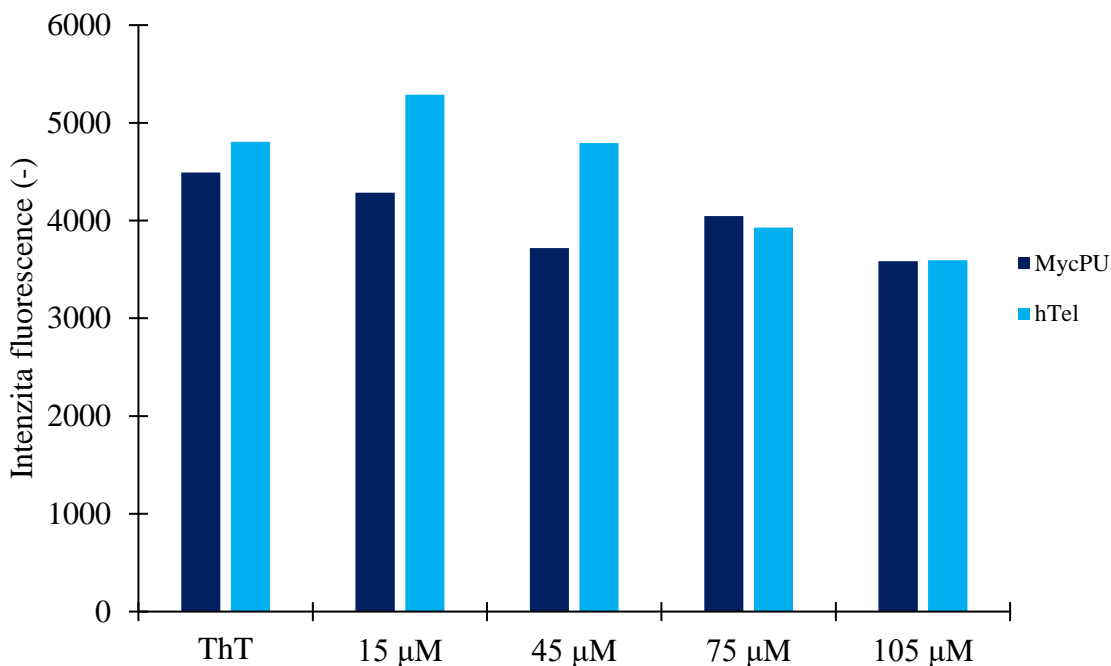
Obrázek 9: Graf znázorňující intenzitu záření při rostoucí koncentraci kyseliny gallové ve vzorku. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací kyseliny gallové klesá intenzita záření ThT.

Stejným způsobem byly testovány vzorky s přidavkem apigeninu. Koncentrační řada byla zvolena v koncentracích 3 μM, 15 μM, 30 μM a 45 μM. I v případě apigeninu je v grafu vidět klesající trend, ale ne v takové míře jako u kyseliny gallové.



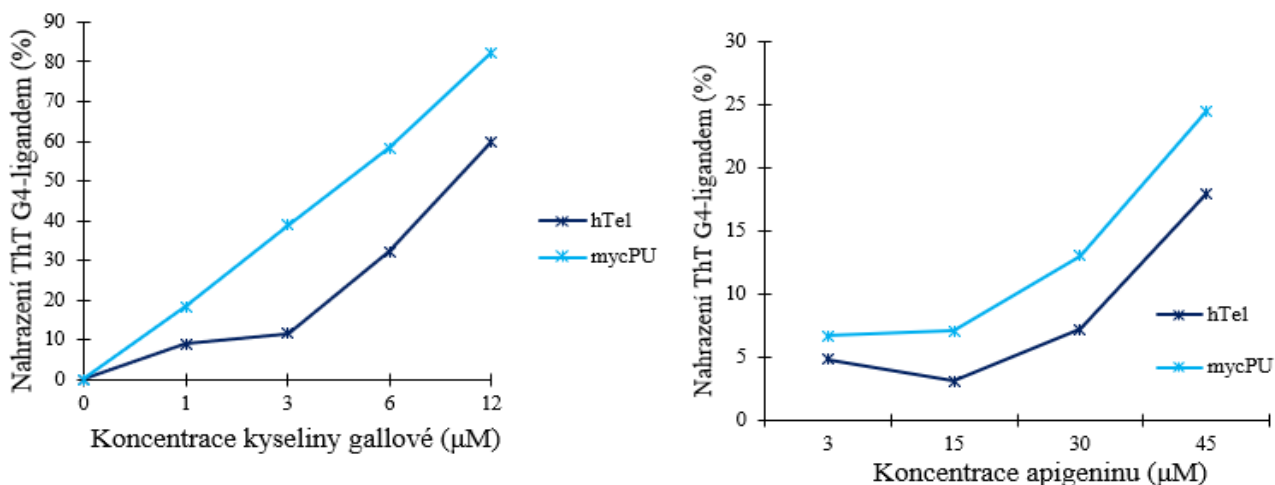
Obrázek 10: Graf znázorňující závislost intenzity záření na zvolené koncentraci apigeninu ve vzorku. Z grafu vyplývá, že s rostoucí koncentrací apigeninu klesá intenzita záření jen velmi málo.

Z důvodu malých rozdílů mezi naměřenými hodnotami při zvolených koncentracích, byla navýšena koncentrace apigeninu, a to na 15 μM , 45 μM , 75 μM a 105 μM . Byl očekáván stejný trend jako u předchozího měření, který ale nebyl potvrzen.



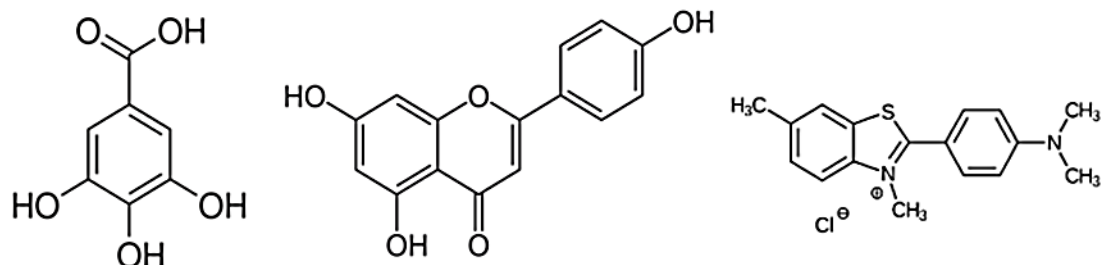
Obrázek 11 Graf závislosti intenzity záření na zvolené koncentraci apigeninu ve vzorku. Oproti předchozímu měření byla koncentrace G4 ligandu navýšena.

Pro porovnání všech výsledků a lepší vizualizaci vlivu G4 ligandů byly sestrojeny grafy, které znázorňují procentuální nahrazení ThT G4 ligandem v závislosti na jeho koncentraci. V případě kyseliny gallové a apigeninu pozorujeme očekávaný rostoucí trend.



Obrázek 12: Grafy znázorňující procentuální zastoupení ThT G4-ligandem. Vlevo graf pro apigenin, vpravo graf pro kyselinu gallovou.

Tyto výsledky naznačují, že se G4 ligandy v těchto koncentracích dokáží vázat na G-kvadruplex a vytěsnit tak molekulu ThT. Ze získaných dat tak vyplývá, že apigenin, který je svou strukturou podobný struktuře Thioflavinu T, se pravděpodobně neváže na G-kvadruplex tak efektivně, jako kyselina gallová. Porovnání struktur G4 ligandů a ThT znázorňuje Obrázek 13.



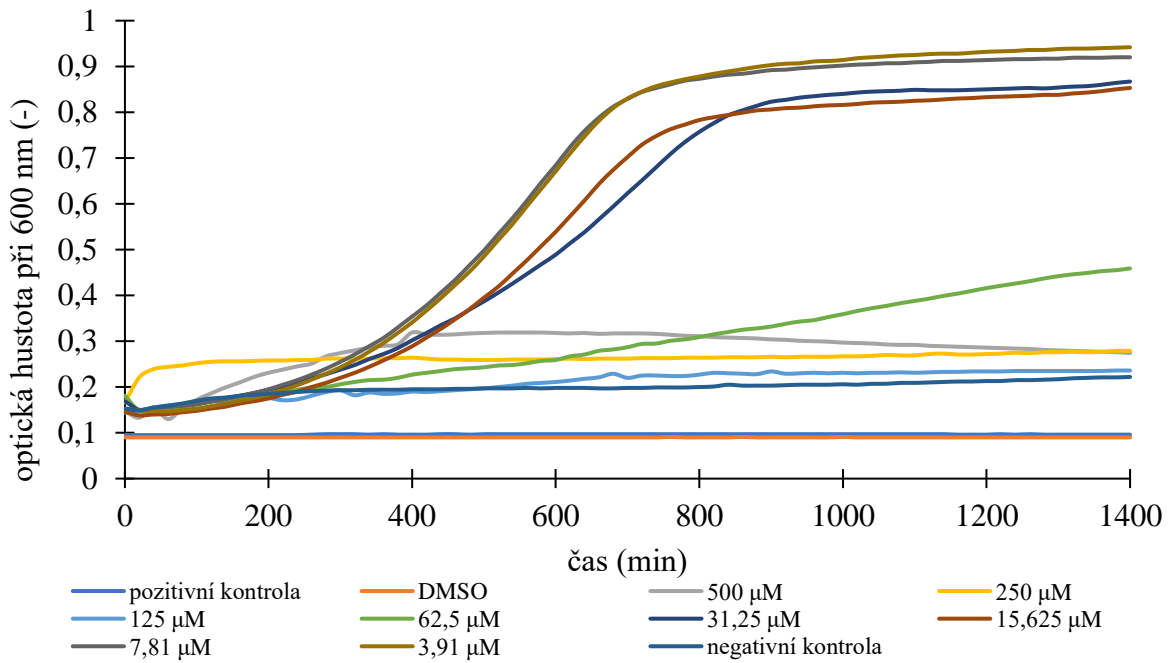
Obrázek 13: Struktura kyseliny gallové, apigeninu a Thioflavinu T.

4.2. Test viability a analýza transaktivace proteinu p53

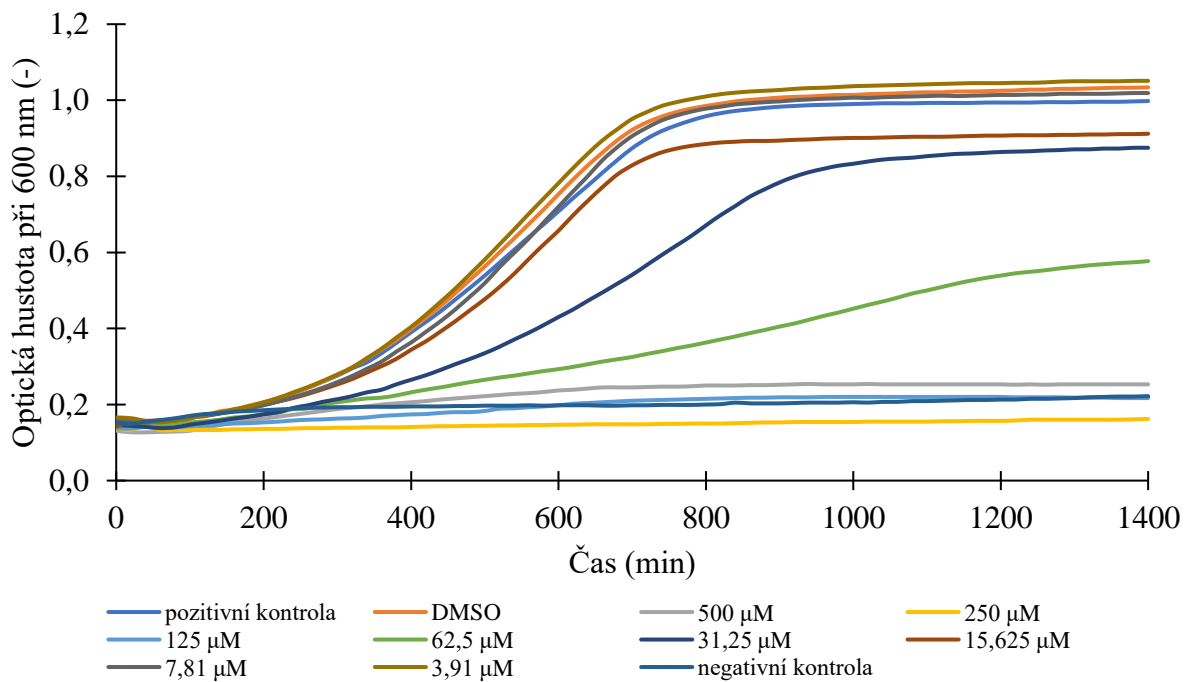
4.2.1. Test viability

Aby mohl být testován vliv G4-ligandů na transaktivaci proteinu p53, bylo nejprve nutné provést test viability kvasinek v přítomnosti ligandů a zvolit nejvyšší možnou koncentraci. Byla měřena optická hustota jednotlivých vzorků po dobu 24 hodin při 600 nm. Koncentrační řada se skládala z osmi bodů, kde nejnižší koncentrace byla 3,91 μM a nejvyšší 500 μM . Každá koncentrace byla měřena ve třech opakováních. Výsledky měření jsou zaznamenány v Obrázek 14 pro apigenin.

Pro luciferázový reportérový test byla zvolena koncentrace 60 μM , kdy je růstová křivka ještě stále úplná a buňky neumírají v důsledku přítomnosti G4 ligandu. Jako porovnání byla vybrána koncentrace 120 μM , což je velmi hraniční koncentrace, při které buňky ještě stále rostou, ale ne tak optimálně. V případě kyseliny gallové byla vybrána stejná koncentrace, jako pro apigenin. Výsledky měření jsou zaznamenány v Obrázek 15. Koncentrace použité při testu viability byly pro další využití při luciferázovém reportérovém testu dvakrát ředěny. Použitá koncentrace pro další testy byla tedy 30 μM a 60 μM .



Obrázek 14: Růstové křivky buněk kvasinek pro G4 ligand apigenin. Byla měřena optická hustota při 600 nm po dobu 24 h. Testované koncentrace apigeninu byly od 500 μM do 3,91 μM . Dále byl testován vliv 1% DMSO jako pozitivní kontrola.

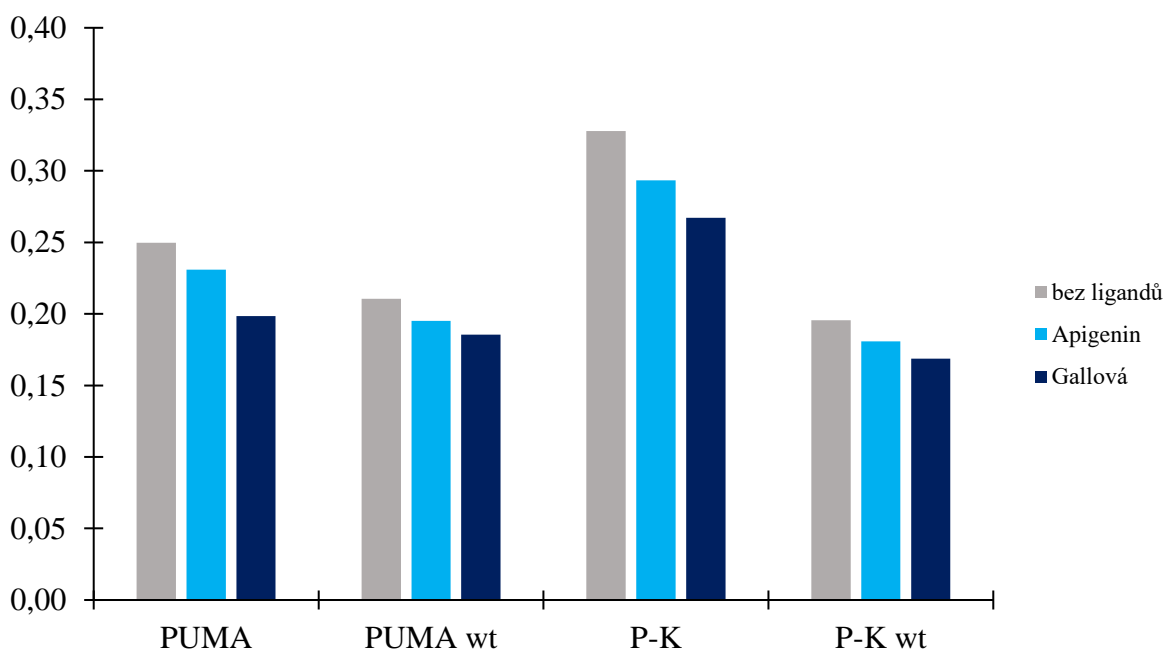


Obrázek 15: Růstové křivky buněk kvasinek pro G4 ligand kyselinu gallovou. Byla měřena optická hustota při 600 nm po dobu 24 h. Testované koncentrace apigeninu byly od 500 μM do 3,91 μM . Dále byl testován vliv 1% DMSO jako pozitivní kontrola.

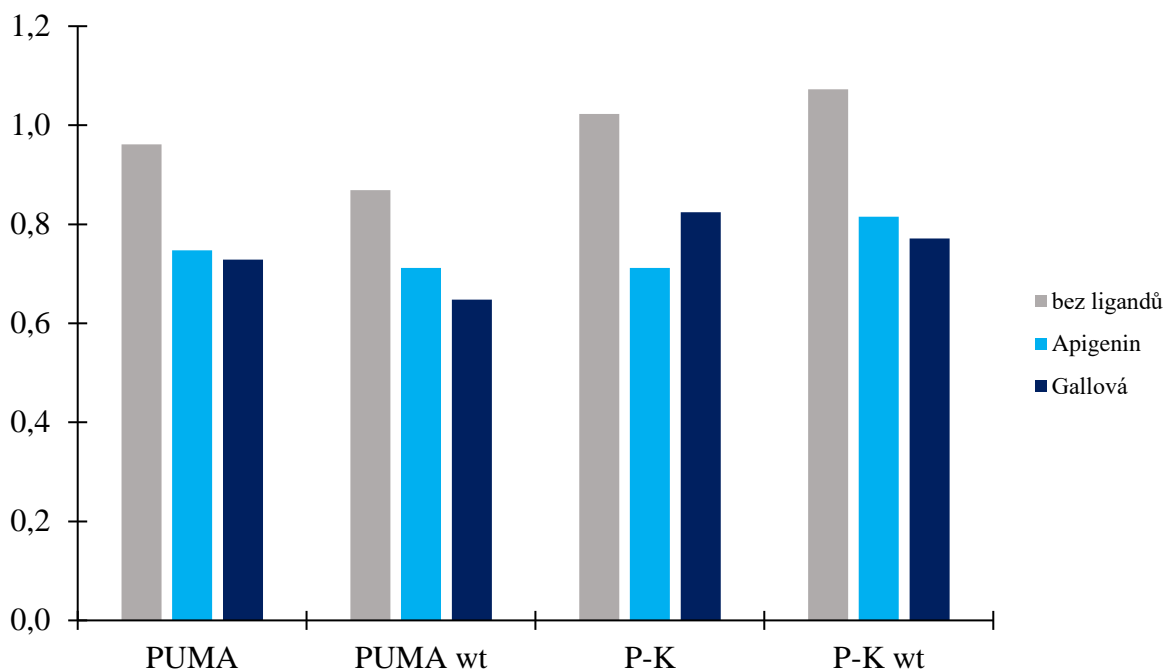
4.2.2. Luciferázový reportérový test

Pro sledování změn transkripční aktivity p53 a vlivu G4 ligandů, byl proveden luciferázový reportérový test podle postupu v kapitole 3.2.5. Luciferázový reportérový test. Pro ověření správnosti výsledků bylo měření provedeno ve čtyřech opakováních. Nejprve byla měřena optická hustota v čase T0 a čase T20, kvůli kontrole množství buněk. Výsledky z měření za přítomnosti dvakrát řaděných G4 ligandů o koncentraci 60 μM popisují Obrázek 16 a Obrázek 17.

V čase T0 pozorujeme, že množství buněk v jednotlivých jamkách je srovnatelné na základě podobné optické hustoty. Po 20 hodinách inkubace došlo k výraznému nárůstu buněk. U buněk v médiu bez obsahu G4 ligandu došlo k vyššímu nárůstu optické hustoty než u buněk v médiu s obsahem G4 ligandu o koncentraci 60 μM . Výsledky dle očekávání potvrzují, že vybraná koncentrace G4 ligandů má již výraznější vliv na buněčnou viabilitu. Nejvyšší nárůst pozorujeme u kmene PUMA-KSHV, kde se optická hodnota zvýšila téměř třikrát. Z výsledných hodnot optické hustoty je patrné, že i přes to, že zvolená koncentrace G4 ligandů byla z testu viability velmi hraniční pro životaschopnost buněk, byly buňky schopné se na ligandy adaptovat a jejich množství je stále dostatečné pro analýzu transkripčního potenciálu.

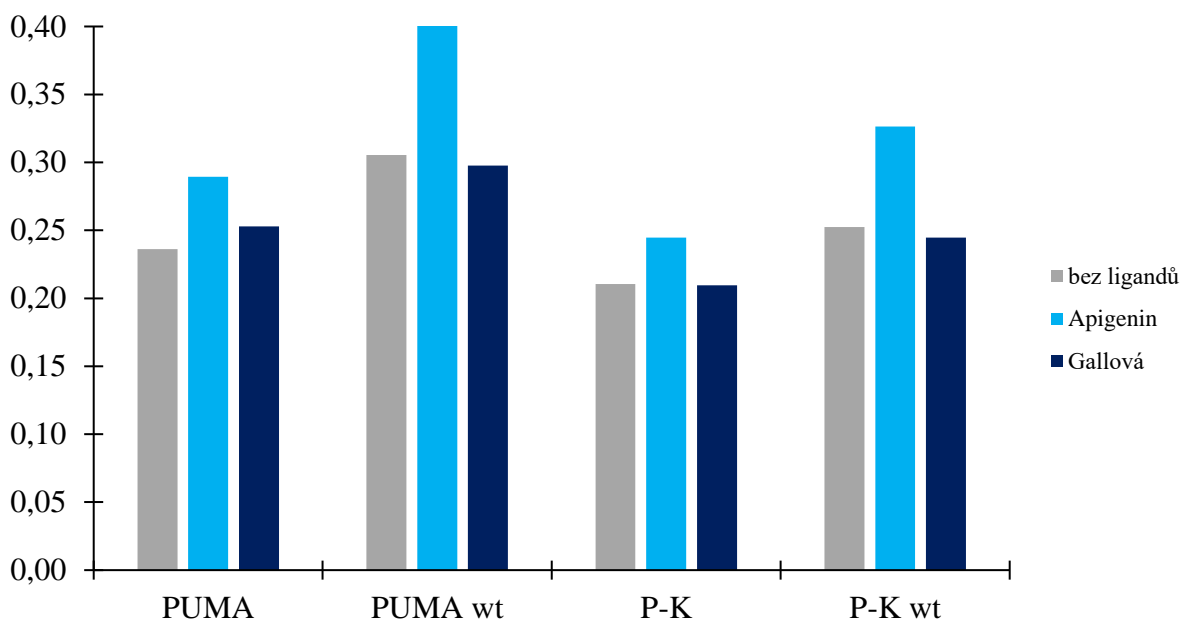


Obrázek 16: Graf naměřených hodnot optické hustoty při 600 nm pro jednotlivé kmeny kvasinek s G4 ligandy o koncentraci 60 μM v čase T0.

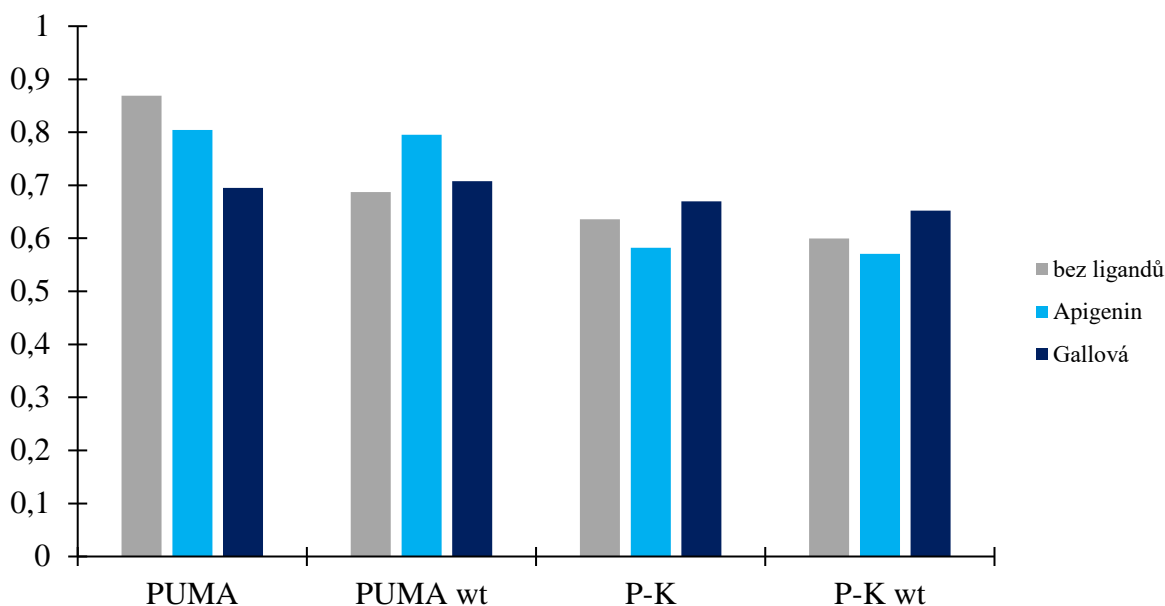


Obrázek 17: Graf naměřených hodnot optické hustoty při 600 nm pro jednotlivé kmeny kvasinek s G4 ligandy o koncentraci 60 μM v čase T20.

Výsledky z měření za přítomnosti G4 ligandů o koncentraci 30 μM znázorňují Obrázek 18 a Obrázek 19.



Obrázek 18: Graf naměřených hodnot optické hustoty při 600 nm pro jednotlivé kmeny kvasinek s G4 ligandy o koncentraci 30 μM v čase T0.

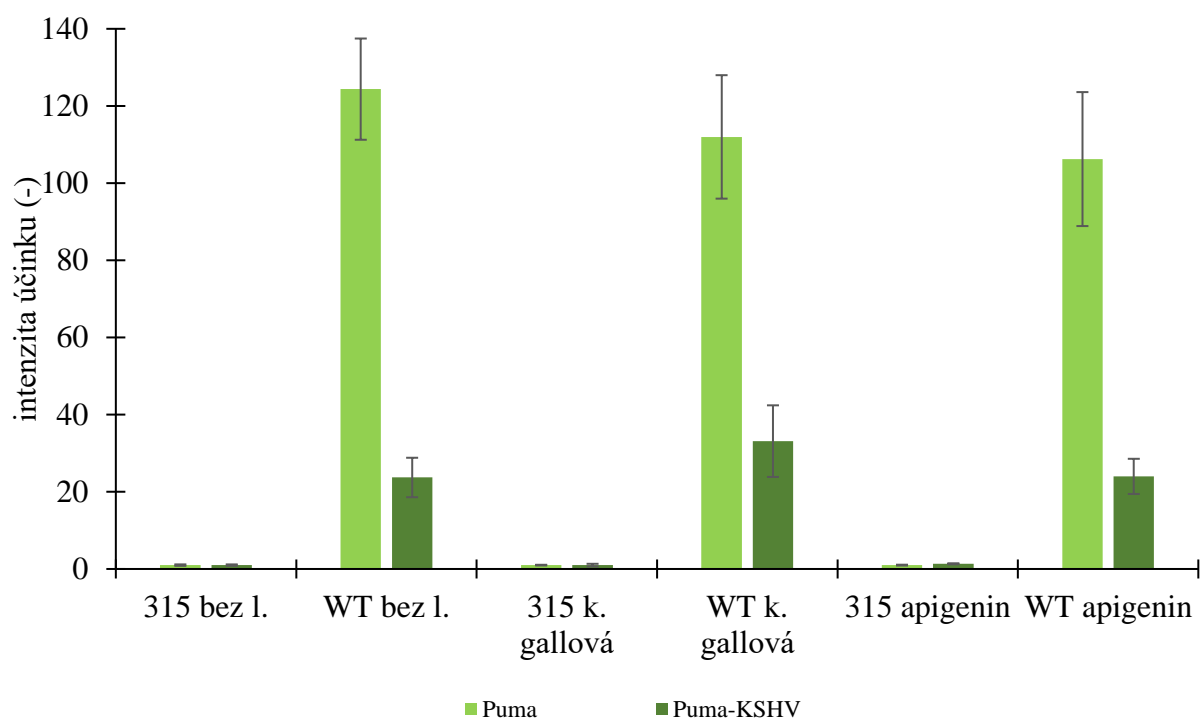


Obrázek 19: Graf naměřených hodnot optické hustoty při 600 nm pro jednotlivé kmeny kvasinek s G4 ligandy o koncentraci 60 μM v čase T20.

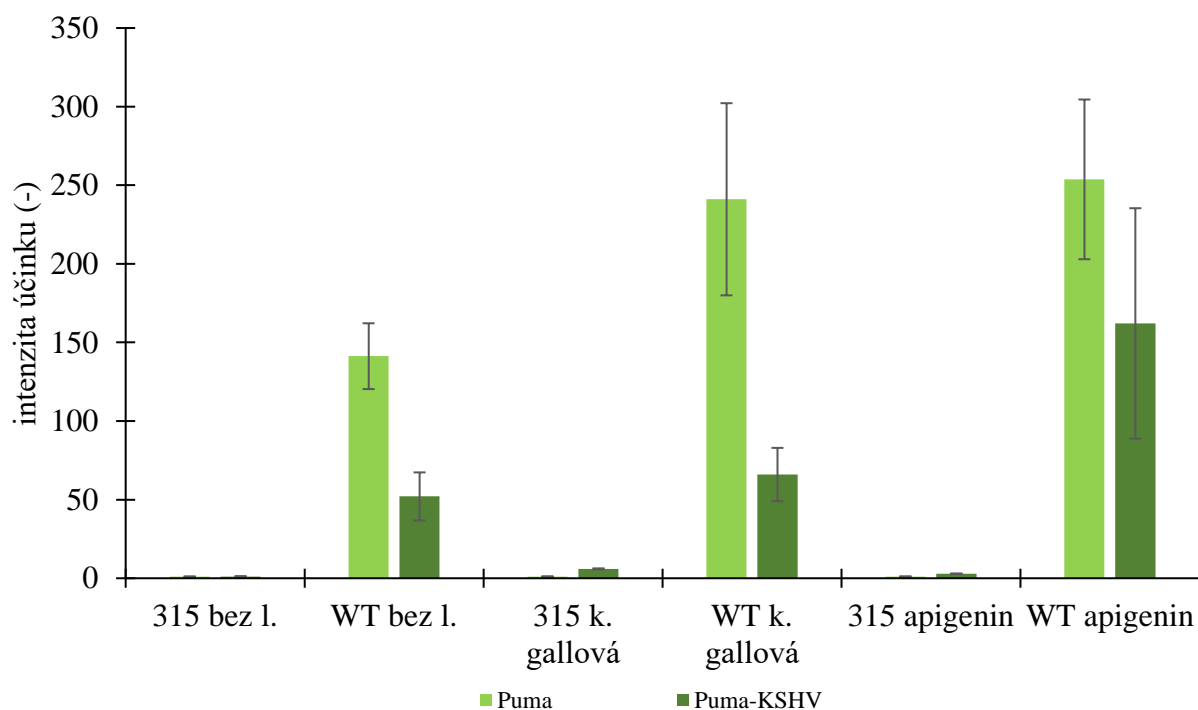
Po 20 hodinách inkubace při 30 °C došlo k nárůstu buněk, především v přítomnosti G4 ligandů, kdy naměřené hodnoty optické hustoty dosahovaly v některých případech vyšších hodnot než pro buňky v médiu bez obsahu G4 ligandu. Obecně buňky v médiu s G4 ligandem rostly srovnatelně, jako bez něj. To značí, že G4 ligandy o koncentraci 30 μM neměly výrazný vliv na životaschopnost buněk, jako to bylo při koncentraci 60 μM .

Výsledky luciferázového reportérového testu jsou uvedeny jako závislost intenzity luminiscenčního signálu po transformaci kvasinek v porovnání s prázdným vektorem (pRS314-pRS315). Měřeno bylo vždy v čase T0 a T20 pro obě zvolené koncentrace G4 ligandů. Naměřená data byla analyzována a výsledné hodnoty pro koncentraci 60 μM znázorňují Obrázek 20 pro čas T0 a Obrázek 21 pro čas T20.

V čase T0 jsou hodnoty pro kmeny PUMA i PUMA-KSHV v přítomnosti ligandů a pouze v médiu srovnatelné, protože buňky byly vystaveny ligandům jen krátce. Po 20 hodinách inkubace nedošlo k předpokládanému snížení intenzity účinku transaktivace proteinu p53, naopak došlo k navýšení především u kmene PUMA-KSHV pRS315-p53 s obsahem 60 μM apigeninu. Zajímavým výsledkem je, že mnohem vyšší intenzitu účinku vykazuje kmen PUMA, který neobsahuje ve své sekvenci G-kvadruplexy. Předpokládáme, že se produkce proteinu p53 zvýšila v důsledku stresu, kterému byly buňky přidavkem G4 ligandu o hraniční koncentraci vystaveny. I přes to, že byl tento gen vložen do sekvence uměle, došlo k jeho začlenění a aktivaci jeho ochranné funkce. Intenzita účinku se pro kmen PUMA-KSHV po uplynutí inkubační doby navýšila, k čemuž došlo pravděpodobně v důsledku zvolené koncentrace G4 ligandů z testu viability, která byla pro životaschopnost buněk velmi hraniční.



Obrázek 20: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu p53 v čase T0 pro oba kmeny *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 60 μ M apigeninem a kyselinou gallovou. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity luminiscence po transaktivaci proteinem p53 v porovnání s prázdným vektorem a směrodatné odchylky z dvaceti opakování.

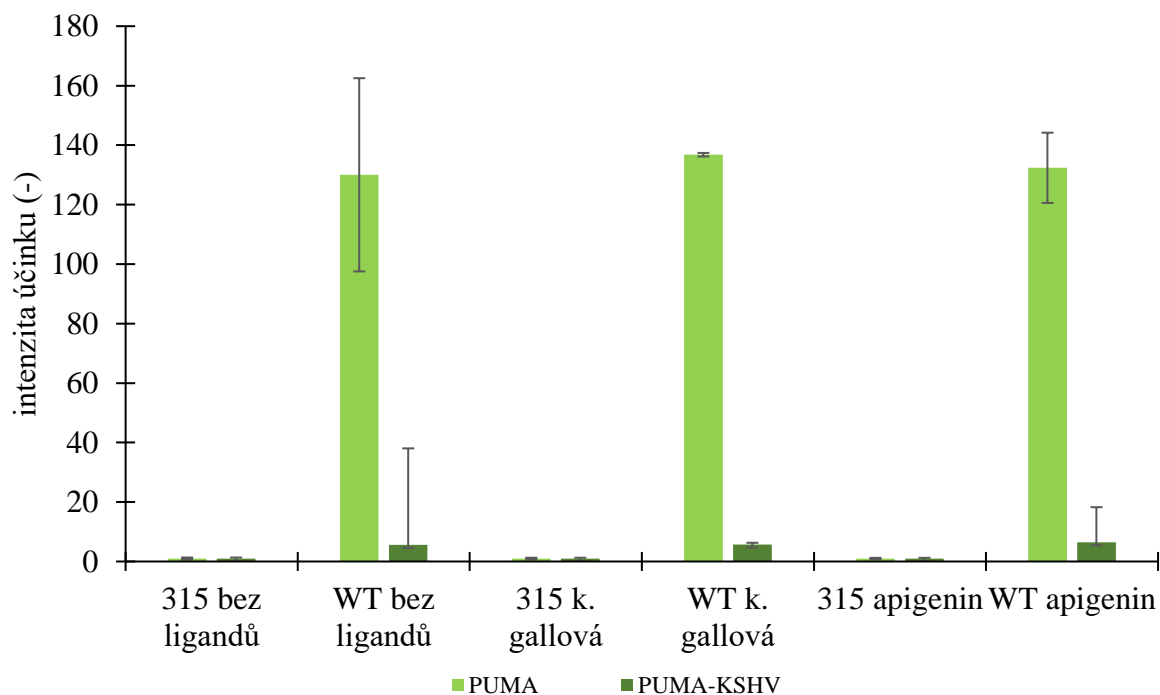


Obrázek 21: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu p53 v čase T20 pro oba kmeny *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 60 μ M apigeninem a kyselinou gallovou. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity luminiscence po transaktivaci proteinem p53 v porovnání s prázdným vektorem a směrodatné odchylky z pěti opakování.

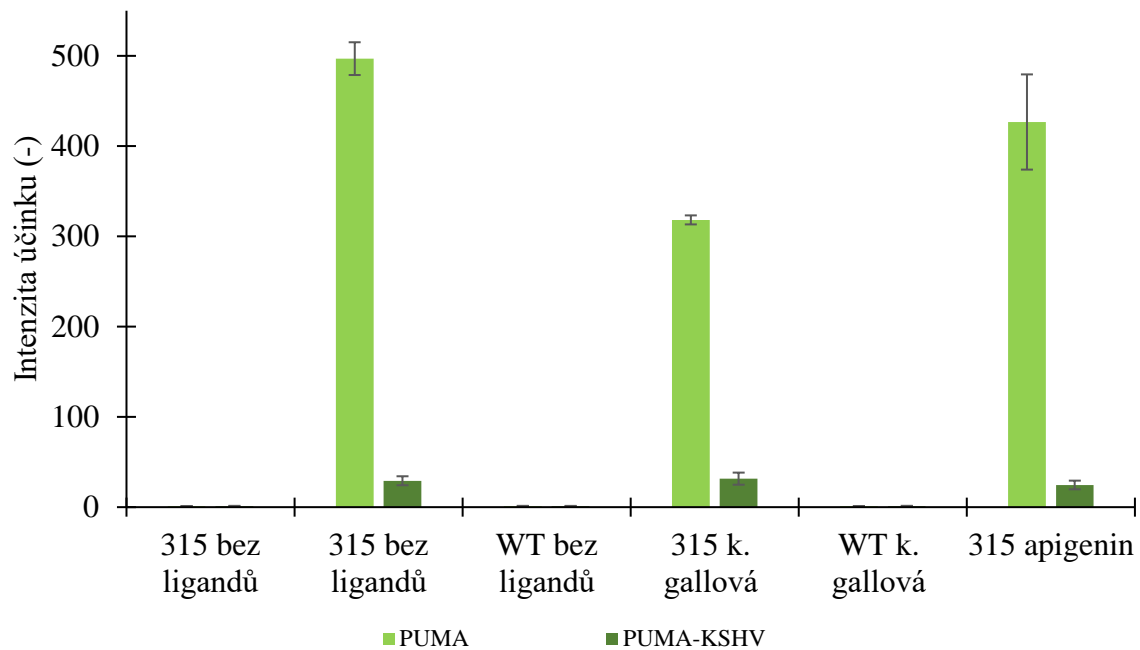
Nejvyšší nárůst intenzity účinku byl u apigeninu pravděpodobně proto, že se díky své struktuře váže hůře na G-kvadruplex než kyselina gallová. Ta se po navázání na kvartérní strukturu stává méně dostupnou pro metabolizaci a slaběji ovlivňuje celkovou míru stresu a viabilitu buněk. Oproti tomu se apigenin na G-kvadruplexy váže méně, tím se stává přístupnější pro případnou metabolizaci a způsobuje buňkám větší stres než lépe navázaná kyselina gallová.

Při koncentraci G4 ligandů 30 μM , při které buňky v testu viability rostly standardně, byla měřena intenzita účinku transaktivace proteinu p53 v čase T0 (Obrázek 22) a v čase T20 (Obrázek 23). V čase T0 jsou naměřené hodnoty srovnatelné, protože buňky byly vystaveny vlivu G4 ligandů krátkou dobu. Po inkubaci 20 hodin jsme předpokládali, že dojde ke snížení intenzity účinku u kmene PUMA-KSHV, protože se G4 ligandy navážou na G-kvadruplex a tím dojde k jeho stabilizaci. Z výsledků je ale patrné, že koncentrace G4 ligandů 30 μM nemá na kmen PUMA-KSHV výrazný vliv, protože naměřené hodnoty pro G4 ligandy jsou velmi podobné, jako pro měření bez nich.

Při porovnání obou testovaných koncentrací pozorujeme, že 60 μM koncentrace G4 ligandů má viditelnější vliv na kmen PUMA-KSHV i přes to, že dochází ke zvýšení intenzity účinku. Takto vysoká koncentrace pravděpodobně způsobuje buňkám stresové podmínky a tím pádem dochází ke zvýšení produkce p53 jako obranného mechanismu. V obou případech dochází po 20hodinové inkubaci ke snížení intenzity účinku u kmene PUMA po přidání G4 ligandů a to i přes to, že neobsahuje G-kvadruplexy.



Obrázek 22: Vyhodnocení transaktivací aktivity proteinu p53 v čase T0 pro oba kmeny *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 30 μM apigeninem a kyselinou gallovou. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity luminiscence po transaktivaci proteinem p53 v porovnání s prázdným vektorem a směrodatné odchylky z pěti opakování.



Obrázek 23: Vyhodnocení transkripční aktivity proteinu p53 v čase T20 pro oba kmeny *Saccharomyces cerevisiae* ošetřených 30 μ M apigeninem a kyselinou gallovou. Graf znázorňuje průměrnou hodnotu relativní intenzity luminiscence po transaktivaci proteinem p53 v porovnání s prázdným vektorem a směrodatné odchylky z pěti opakování.

5. ZÁVĚR

V této práci byla testována vazba a vliv přírodních G4 ligandů nacházejících se v čajích na G-kvadruplexy a na transaktivaci proteinu p53. Interakce těchto látek s DNA byla testována metodami *in vitro*. Testování vlivu G4 ligandů na transaktivací vlastnosti proteinu p53 bylo provedeno v kvasinkovém expresním systému dvou izogenních kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

Teoretická část práce popisuje sekundární struktury DNA, více konkrétně G-kvadruplexy, které se vyskytují především v promotorech lidských genů, onkogenů a telomerách. Dále popisuje dosavadní poznatky o nádorovém supresorovém proteinu p53, jeho strukturu, funkci a vazebné vlastnosti. Vzhledem k tomu, že vykazuje jistou afinitu ke strukturám G-kvadruplexů, hledají se přírodní látky, které by se na G-kvadruplexy mohly navázat a stabilizovat je.

V experimentální části byl testován vliv apigeninu a kyseliny gallové vyskytujících se v čaji, protože u nich byla již v dřívějších výzkumech potvrzena afinita ke kvartérním strukturám [61, 73]. Nejprve byla testována jejich vazba ke G-kvadruplexům u vybraných syntetických oligonukleotidů hTel24 1 a mycPU21 1 pomocí ThT fluorescenčního testu. Oba ligandy nahradily Thioflavin T ve vazbě na strukturu G-kvadruplexu. Kyselina gallová vykazovala výraznější snížení fluorescenčního signálu, protože se díky své struktuře lépe vázala na G-kvadruplex, než apigenin. K testování vlivu G4 ligandů na transaktivaci proteinu p53 byly využity metody *in vivo*. Na základě testů viability pro oba G4 ligandy byly vybrány koncentrace 30 μM , kde buňky rostly optimálně, a 60 μM , což byla velmi hraniční koncentrace pro viabilitu testovaných buněk. Buňky byly následně ošetřeny G4 ligandy o zvolených koncentracích a pro vyhodnocení transaktivacích vlastností p53 byl proveden luciferázový reportérový test.

U kmene PUMA došlo v obou případech v T0 po přidání G4 ligandů ke snížení intenzity signálu. V čase T0 pro koncentraci 30 μM bylo naměřeno mírné zvýšení intenzity signálu, ale pravděpodobně vlivem toho, že G4 ligandy byly přidány jen krátkou dobu. Po 20hodinové inkubaci došlo k výraznému nárůstu intenzity signálu především u kmene PUMA-KSHV s inzertovanými plazmidy pRS315-p53. K tomu došlo pravděpodobně vlivem slabé vazby molekuly apigeninu na G-kvadruplex, který následně vyvolal větší buněčný stres a došlo k navýšení produkce proteinu p53, který je markerem stresu a funguje jako ochrana buněk před stresovými podmínkami. Kyselina gallová způsobila pro tento kmen jen mírný nárůst intenzity signálu. Pro kmen PUMA došlo k výraznému navýšení intenzity účinku pro oba testované G4 ligandy, protože v důsledku absence G-kvadruplexů nedošlo k jejich navázání. Pro koncentraci 30 μM dosahovaly hodnoty pro G4 ligandy podobných hodnot, jako bez nich. Lze tedy říct, že tato koncentrace G4 ligandů nemá výrazný vliv na transaktivaci proteinu p53.

Po porovnání obou testovaných koncentracích lze říct, že výraznější vliv na transaktivací aktivitu mají ligandy o koncentraci 60 μM , pravděpodobně ale vlivem stresu způsobeného buňkám, dochází k navýšení intenzity účinku a vyšší produkci proteinu p53.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] P. May a E. May, „Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein", *Oncogene*, roč. 18, č. 53, s. 7621–7636, pro. 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1203285.
- [2] C. Kandoth *et al.*, „Mutational landscape and significance across 12 major cancer types", *Nature*, roč. 502, č. 7471, s. 333–339, říj. 2013, doi: 10.1038/nature12634.
- [3] S. Keshishyan, H. L. Nguyen, O. D. Afolabi, C. Moore, A. T. Black, a S. D. Ray, „Cytostatic Agents", in *Side Effects of Drugs Annual*, Elsevier, 2018, s. 569–577. doi: 10.1016/bs.seda.2018.08.012.
- [4] G. Biffi, D. Tannahill, J. Miller, W. J. Howat, a S. Balasubramanian, „Elevated Levels of G-Quadruplex Formation in Human Stomach and Liver Cancer Tissues", *PLoS ONE*, roč. 9, č. 7, s. e102711, čvc. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0102711.
- [5] C. Nakanishi a H. Seimiya, „G-quadruplex in cancer biology and drug discovery", *Biochem Biophys Res Commun*, roč. 531, č. 1, s. 45–50, říj. 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.178.
- [6] W. S. El-Deiry, S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, a B. Vogelstein, „Definition of a consensus binding site for p53", *Nat Genet*, roč. 1, č. 1, s. 45–49, dub. 1992, doi: 10.1038/ng0492-45.
- [7] C. S. Yang a H. Wang, „Cancer therapy combination: green tea and a phosphodiesterase 5 inhibitor?", *J. Clin. Invest.*, s. JCI67589, led. 2013, doi: 10.1172/JCI67589.
- [8] L.-S. Lee, Y.-C. Kim, J.-D. Park, Y.-B. Kim, a S.-H. Kim, „Changes in major polyphenolic compounds of tea (*Camellia sinensis*) leaves during the production of black tea", *Food Sci Biotechnol*, roč. 25, č. 6, s. 1523–1527, pro. 2016, doi: 10.1007/s10068-016-0236-y.
- [9] F. S. Poswal, G. Russell, M. Mackonochie, E. MacLennan, E. C. Adukwu, a V. Rolfe, „Herbal Teas and their Health Benefits: A Scoping Review", *Plant Foods Hum Nutr*, roč. 74, č. 3, s. 266–276, zář. 2019, doi: 10.1007/s11130-019-00750-w.
- [10] J. D. Watson a F. H. C. Crick, „Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature*, roč. 171, č. 4356, s. 737–738, dub. 1953, doi: 10.1038/171737a0.
- [11] K. van Holde a J. Zlatanova, „Unusual DNA structures, chromatin and transcription", *Bioessays*, roč. 16, č. 1, s. 59–68, led. 1994, doi: 10.1002/bies.950160110.
- [12] V. Brázda a J. Coufal, „Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein", *IJMS*, roč. 18, č. 2, s. 375, úno. 2017, doi: 10.3390/ijms18020375.
- [13] A. L. Mikheikin, A. Y. Lushnikov, a Y. L. Lyubchenko, „Effect of DNA Supercoiling on the Geometry of Holliday Junctions", *Biochemistry*, roč. 45, č. 43, s. 12998–13006, říj. 2006, doi: 10.1021/bi061002k.
- [14] C. E. Pearson, H. Zorbas, G. B. Price, a M. Zannis-Hadjopoulos, „Inverted repeats, stem-loops, and cruciforms: significance for initiation of DNA replication", *J Cell Biochem*, roč. 63, č. 1, s. 1–22, říj. 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(199610)63:1%3C1::AID-JCB1%3E3.0.CO;2-3.
- [15] A. Mukherjee a K. M. Vasquez, „Triplex technology in studies of DNA damage, DNA repair, and mutagenesis", *Biochimie*, roč. 93, č. 8, s. 1197–1208, srp. 2011, doi: 10.1016/j.biochi.2011.04.001.
- [16] M. L. Bochman, K. Paeschke, a V. A. Zakian, „DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures", *Nat Rev Genet*, roč. 13, č. 11, s. 770–780, lis. 2012, doi: 10.1038/nrg3296.
- [17] W. Guschlbauer, J.-F. Chantot, a D. Thiele, „Four-Stranded Nucleic Acid Structures 25 Years Later: From Guanosine Gels to Telomer DNA", *Journal of Biomolecular*

- Structure and Dynamics*, roč. 8, č. 3, s. 491–511, pro. 1990, doi: 10.1080/07391102.1990.10507825.
- [18] M. Gellert, M. N. Lipsett, a D. R. Davies, „HELIX FORMATION BY GUANYLIC ACID", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, roč. 48, č. 12, s. 2013–2018, pro. 1962, doi: 10.1073/pnas.48.12.2013.
- [19] R. H. Shafer, „Stability and Structure of Model DNA Triplexes and Quadruplexes and Their Interactions with Small Ligands", in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Elsevier, 1997, s. 55–94. doi: 10.1016/S0079-6603(08)61029-6.
- [20] J. Bidzinska, G. Cimino-Reale, N. Zaffaroni, a M. Folini, „G-Quadruplex Structures in the Human Genome as Novel Therapeutic Targets", *Molecules*, roč. 18, č. 10, s. 12368–12395, říj. 2013, doi: 10.3390/molecules181012368.
- [21] D. Bhattacharyya, G. Mirihana Arachchilage, a S. Basu, „Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability", *Front. Chem.*, roč. 4, zář. 2016, doi: 10.3389/fchem.2016.00038.
- [22] E. H. Blackburn, „Structure and function of telomeres", *Nature*, roč. 350, č. 6319, s. 569–573, dub. 1991, doi: 10.1038/350569a0.
- [23] D. Varshney, J. Spiegel, K. Zyner, D. Tannahill, a S. Balasubramanian, „The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes", *Nat Rev Mol Cell Biol*, roč. 21, č. 8, s. 459–474, srp. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-0236-x.
- [24] L. K. White, W. E. Wright, a J. W. Shay, „Telomerase inhibitors", *Trends in Biotechnology*, roč. 19, č. 3, s. 114–120, bře. 2001, doi: 10.1016/S0167-7799(00)01541-9.
- [25] J. Lingner, J. P. Cooper, a T. R. Cech, „Telomerase and DNA End Replication: No Longer a Lagging Strand Problem?", *Science*, roč. 269, č. 5230, s. 1533–1534, zář. 1995, doi: 10.1126/science.7545310.
- [26] S. Balasubramanian a S. Neidle, „G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets", *Current Opinion in Chemical Biology*, roč. 13, č. 3, s. 345–353, čer. 2009, doi: 10.1016/j.cbpa.2009.04.637.
- [27] E. Ruggiero a S. N. Richter, „G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy", *Nucleic Acids Research*, roč. 46, č. 7, s. 3270–3283, dub. 2018, doi: 10.1093/nar/gky187.
- [28] J. Eddy a N. Maizels, „Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome", *Nucleic Acids Research*, roč. 34, č. 14, s. 3887–3896, zář. 2006, doi: 10.1093/nar/gkl529.
- [29] D. Sun *et al.*, „Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound", *J. Med. Chem.*, roč. 40, č. 14, s. 2113–2116, čvc. 1997, doi: 10.1021/jm970199z.
- [30] E. B. Jagelská, V. Brázda, P. Pečinka, E. Paleček, a M. Fojta, „DNA topology influences p53 sequence-specific DNA binding through structural transitions within the target sites", *Biochemical Journal*, roč. 412, č. 1, s. 57–63, kvě. 2008, doi: 10.1042/BJ20071648.
- [31] C. Li *et al.*, „Ligand-induced native G-quadruplex stabilization impairs transcription initiation", *Genome Res.*, roč. 31, č. 9, s. 1546–1560, zář. 2021, doi: 10.1101/gr.275431.121.
- [32] L. J. Hofseth, S. P. Hussain, a C. C. Harris, „p53: 25 years after its discovery", *Trends in Pharmacological Sciences*, roč. 25, č. 4, s. 177–181, dub. 2004, doi: 10.1016/j.tips.2004.02.009.
- [33] A. J. Levine a M. Oren, „The first 30 years of p53: growing ever more complex", *Nat Rev Cancer*, roč. 9, č. 10, s. 749–758, říj. 2009, doi: 10.1038/nrc2723.

- [34] A. M. Goh, C. R. Coffill, a D. P. Lane, „The role of mutant p53 in human cancer", *J. Pathol.*, roč. 223, č. 2, s. 116–126, led. 2011, doi: 10.1002/path.2784.
- [35] M. Babamohamadi, E. Babaei, B. Ahmed Salih, M. Babamohammadi, H. Jalal Azeez, a G. Othman, „Recent findings on the role of wild-type and mutant p53 in cancer development and therapy", *Front. Mol. Biosci.*, roč. 9, s. 903075, zář. 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.903075.
- [36] D. Adamson, W. Thompson, A. Dawson, B. Bennett, a N. Haites, „p53 mutation and expression in lymphoma", *Br J Cancer*, roč. 72, č. 1, s. 150–154, čvc. 1995, doi: 10.1038/bjc.1995.292.
- [37] T. Batinac, F. Gruber, J. Lipozencić, G. Zamolo-Koncar, A. Stasić, a I. Brajac, „Protein p53--structure, function, and possible therapeutic implications", *Acta Dermatovenerol Croat*, roč. 11, č. 4, s. 225–230, pro. 2003.
- [38] V. Brázda a M. Fojta, „The Rich World of p53 DNA Binding Targets: The Role of DNA Structure", *Int J Mol Sci*, roč. 20, č. 22, s. 5605, lis. 2019, doi: 10.3390/ijms20225605.
- [39] G. Chillemi *et al.*, „Molecular dynamics of the full-length p53 monomer", *Cell Cycle*, roč. 12, č. 18, s. 3098–3108, zář. 2013, doi: 10.4161/cc.26162.
- [40] M. Hussain, K. Tian, L. Mutti, M. Krstic-Demonacos, a J.-M. Schwartz, „The Expanded p53 Interactome as a Predictive Model for Cancer Therapy", *Genomics Comput Biol*, roč. 1, č. 1, s. 20, zář. 2015, doi: 10.18547/gcb.2015.vol1.iss1.e20.
- [41] P. A. J. Muller a K. H. Vousden, „p53 mutations in cancer", *Nat Cell Biol*, roč. 15, č. 1, s. 2–8, led. 2013, doi: 10.1038/ncb2641.
- [42] S. Lee, L. Cavallo, a J. Griffith, „Human p53 Binds Holliday Junctions Strongly and Facilitates Their Cleavage", *Journal of Biological Chemistry*, roč. 272, č. 11, s. 7532–7539, bře. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.11.7532.
- [43] Y. Jiang, J. Pei, Y. Zheng, Y. Miao, B. Duan, a L. Huang, „Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent", *Chin. J. Integr. Med.*, roč. 28, č. 7, s. 661–671, čvc. 2022, doi: 10.1007/s11655-021-3345-2.
- [44] N. Khan a H. Mukhtar, „Tea and health: studies in humans", *Curr Pharm Des*, roč. 19, č. 34, s. 6141–6147, 2013, doi: 10.2174/1381612811319340008.
- [45] E. Riza, A. Linos, A. Petralias, L. De Martinis, L. Duntas, a D. Linos, „The effect of Greek herbal tea consumption on thyroid cancer: a case-control study", *Eur J Public Health*, roč. 25, č. 6, s. 1001–1005, pro. 2015, doi: 10.1093/eurpub/ckv063.
- [46] H. Hoensch a R. Oertel, „Anti-inflammatorische Wirkungen der Tee-Flavonoide", *Dtsch med Wochenschr*, roč. 137, č. 51/52, s. 2738–2740, pro. 2012, doi: 10.1055/s-0032-1327348.
- [47] K.-C. Choi *et al.*, „Gallic Acid Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Nuclear Factor- κ B Signaling by Preventing RelA Acetylation in A549 Lung Cancer Cells", *Molecular Cancer Research*, roč. 7, č. 12, s. 2011–2021, pro. 2009, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0239.
- [48] M. Lopez-Lazaro, J. M. Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, a C. A. Austin, „Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide", *Mutagenesis*, roč. 26, č. 4, s. 489–498, čvc. 2011, doi: 10.1093/mutage/ger006.
- [49] Y.-C. Chia, R. Rajbanshi, C. Calhoun, a R. H. Chiu, „Anti-Neoplastic Effects of Gallic Acid, a Major Component of Toona sinensis Leaf Extract, on Oral Squamous Carcinoma Cells", *Molecules*, roč. 15, č. 11, s. 8377–8389, lis. 2010, doi: 10.3390/molecules15118377.

- [50] M. Yu *et al.*, „Gallic acid disruption of A β 1–42 aggregation rescues cognitive decline of APP/PS1 double transgenic mouse", *Neurobiology of Disease*, roč. 124, s. 67–80, dub. 2019, doi: 10.1016/j.nbd.2018.11.009.
- [51] D. Wianowska a M. Olszowy-Tomczyk, „A Concise Profile of Gallic Acid-From Its Natural Sources through Biological Properties and Chemical Methods of Determination", *Molecules*, roč. 28, č. 3, s. 1186, led. 2023, doi: 10.3390/molecules28031186.
- [52] M. Meng, „Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways", *Oncol Rep*, dub. 2011, doi: 10.3892/or.2011.1264.
- [53] Park, „The MEK inhibitor PD98059 attenuates growth inhibition and death in gallic acid-treated Calu-6 lung cancer cells by preventing glutathione depletion", *Mol Med Rep*, roč. 3, č. 3, dub. 2010, doi: 10.3892/mmr_00000291.
- [54] K.-C. Liu *et al.*, „Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells: GA Affects DNA Damage and Repair Gene in PC-3 Cells", *Environ. Toxicol*, roč. 28, č. 10, s. 579–587, říj. 2013, doi: 10.1002/tox.20752.
- [55] J.-D. Hsu, S.-H. Kao, T.-T. Ou, Y.-J. Chen, Y.-J. Li, a C.-J. Wang, „Gallic Acid Induces G2/M Phase Arrest of Breast Cancer Cell MCF-7 through Stabilization of p27^{Kip1} Attributed to Disruption of p27^{Kip1}/Skp2 Complex", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 59, č. 5, s. 1996–2003, bř. 2011, doi: 10.1021/jf103656v.
- [56] S. C. Forester, Y. Y. Choy, A. L. Waterhouse, a P. I. Oteiza, „The anthocyanin metabolites gallic acid, 3- *O* -methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals: ANTHOCYANIN METABOLITES INHIBIT NF- κ B", *Mol. Carcinog.*, roč. 53, č. 6, s. 432–439, čer. 2014, doi: 10.1002/mc.21974.
- [57] T. Chandramohan Reddy *et al.*, „Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF- κ B inactivation", *Toxicology in Vitro*, roč. 26, č. 3, s. 396–405, dub. 2012, doi: 10.1016/j.tiv.2011.12.018.
- [58] N. Phonsatta *et al.*, „Comparison of Antioxidant Evaluation Assays for Investigating Antioxidative Activity of Gallic Acid and Its Alkyl Esters in Different Food Matrices", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 65, č. 34, s. 7509–7518, srp. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b02503.
- [59] M. Olszowy, A. L. Dawidowicz, a M. Józwiak-Doleba, „Are mutual interactions between antioxidants the only factors responsible for antagonistic antioxidant effect of their mixtures? Additive and antagonistic antioxidant effects in mixtures of gallic, ferulic and caffeic acids", *Eur Food Res Technol*, roč. 245, č. 7, s. 1473–1485, čvc. 2019, doi: 10.1007/s00217-019-03255-7.
- [60] S. Alavi Rafiee, R. Farhoosh, a A. Sharif, „Antioxidant Activity of Gallic Acid as Affected by an Extra Carboxyl Group than Pyrogallol in Various Oxidative Environments", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, s. 1800319, zár. 2018, doi: 10.1002/ejlt.201800319.
- [61] V. Sanchez-Martin *et al.*, „Gallic Acid: A Natural Phenolic Compound Exerting Antitumoral Activities in Colorectal Cancer via Interaction with G-Quadruplexes", *Cancers*, roč. 14, č. 11, s. 2648, kvě. 2022, doi: 10.3390/cancers14112648.
- [62] P. Majma Sanaye, M. R. Mojaveri, R. Ahmadian, M. Sabet Jahromi, a R. Bahramsoltani, „Apigenin and its dermatological applications: A comprehensive review", *Phytochemistry*, roč. 203, s. 113390, lis. 2022, doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113390.

- [63] D. Tang, K. Chen, L. Huang, a J. Li, „Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone", *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, roč. 13, č. 3, s. 323–330, bř. 2017, doi: 10.1080/17425255.2017.1251903.
- [64] B. Salehi *et al.*, „The Therapeutic Potential of Apigenin", *IJMS*, roč. 20, č. 6, s. 1305, bř. 2019, doi: 10.3390/ijms20061305.
- [65] D. Patel, S. Shukla, a S. Gupta, „Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (Review)", *Int J Oncol*, led. 2007, doi: 10.3892/ijo.30.1.233.
- [66] Y. Zhu *et al.*, „Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells", *Cancer Cell Int*, roč. 13, č. 1, s. 54, pro. 2013, doi: 10.1186/1475-2867-13-54.
- [67] M. Imran *et al.*, „Apigenin as an anticancer agent", *Phytotherapy Research*, roč. 34, č. 8, s. 1812–1828, srp. 2020, doi: 10.1002/ptr.6647.
- [68] S. S. T. Hnit *et al.*, „Apigenin impedes cell cycle progression at G2 phase in prostate cancer cells", *Discov Oncol*, roč. 13, č. 1, s. 44, čer. 2022, doi: 10.1007/s12672-022-00505-1.
- [69] J. K. Kim a S. U. Park, „Recent insights into the biological functions of apigenin", *EXCLI Journal*; 19:Doc984; ISSN 1611-2156, 2020, doi: 10.17179/EXCLI2020-2579.
- [70] A. Renaud de la Faverie, A. Guédin, A. Bedrat, L. A. Yatsunyk, a J.-L. Mergny, „Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation", *Nucleic Acids Research*, roč. 42, č. 8, s. e65–e65, dub. 2014, doi: 10.1093/nar/gku111.
- [71] M. Carter a J. Shieh, „Biochemical Assays and Intracellular Signaling", in *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, Elsevier, 2015, s. 311–343. doi: 10.1016/B978-0-12-800511-8.00015-0.
- [72] T. Kroemer, „A Deep Dive Into the Luciferase Assay: What It is, How It Works and More", *GOLDBIO*, 1. duben 2023. <https://goldbio.com/articles/article/a-deep-dive-into-the-luciferase-assay-what-it-is-how-it-works-and-more>
- [73] S. Zhang, X. Sun, R. Kong, a M. Xu, „Studies on the interaction of apigenin with calf thymus DNA by spectroscopic methods", *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, roč. 136 Pt C, s. 1666–1670, úno. 2015, doi: 10.1016/j.saa.2014.10.062.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

B-DNA – pravotočivá deoxyribonukleová kyselina (nejčastější forma)

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

G4 – G-kvadruplex

KSHV – herpesvirus spojený s Kaposiho sarkomem

LiAC – octan lithný

MYC – protoonkogen MYC

PEG – polyethylenglykol

PUMA – modulátor apoptózy p53

RNA – ribonukleová kyselina

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

SRItA - syntetické leucin tryptofan selektivní médium

TE – pufr obsahující EDTA a Tris v daných koncentracích

ThT – thioflavin T

TP53 – gen kódující protein p53

TRF2 – z angl. „telomeric repeat-binding factor 2“

Tris – trisaminomethan

YNB – základní médium s obsahem síranu amonného, bez obsahu aminokyselin

YPD – komplexní médium pro růst kvasinek

YPDA – bohaté médium používané při kultivaci