



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

**TESTOVÁNÍ PŮSOBENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK NA
VIABILITU BUNĚČNÝCH LINIÍ**

THE EFFECTS OF CHEMICALS ON CELL LINES VIABILITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anita Zemanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1380/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Anita Zemanová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Testování působení chemických látek na viabilitu buněčných linií

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, testování viability a apoptózy na buněčných liniích po působení chemických látek.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

Bc. Anita Zemanová
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce pojednává o vlivu vybraných chemických látek na viabilitu buněčných linií. V teoretické části práce jsou rozebrány poznatky o možnostech léčby rakoviny pomocí chemoterapeutik včetně jejich mechanismu působení a nežádoucích účinků. Dále jsou zde popsány alternativní struktury DNA se zaměřením na G-kvadruplexy a ligandy, které s G-kvadruplexy interagují. Tyto látky jsou považovány za slibná léčiva při boji proti rakovině díky jejich vysoké specifitě vůči G-kvadruplexům nacházejících se v telomerách chromozomů. Ligandy interagující s G-kvadruplexy stabilizací G-kvadruplexů mohou inhibovat enzym telomerasu nezbytnou pro prodlužování telomer rychle se dělících nádorových buněk. Dále jsou v teoretické části shrnuty možnosti testování viability. Cílem experimentální části bylo porovnání cytotoxické aktivity mezi komerčně dostupnými chemoterapeutiky a vybranými ligandy interagující s G-kvadruplexy. Dalším úkolem bylo studium apoptózy a nekrózy po působení vybraných chemických látek na buněčné linie a následně proběhla i lokalizace ligandů interagujících s G-kvadruplexy v buňkách nádorové buněčné linie karcinomu prsu. V rámci experimentální části bylo zjištěno, že ligandy interagující s G-kvadruplexy vykazují podobnou cytotoxickou aktivitu jako komerčně dostupná chemoterapeutika.

ABSTRACT

The subject of this diploma thesis is the influence of selected chemicals on cell lines viability. The theoretical part contains options of cancer treatment by using chemotherapeutics including their mechanism of action and side effects. Additionally, there are described alternative DNA structures with focus on G-quadruplexes and ligands that interact with G-quadruplexes. These compounds are promising drugs in cancer treatment due to their high specificity to G-quadruplexes, which are found in telomeres of chromosomes. G-quadruplex interacting ligands by stabilization of G-quadruplexes can inhibit the enzyme telomerase, which is necessary for telomere lengthening of rapidly dividing cancer cells. Additionally, the possibilities of viability assays are summarized in the theoretical part. The aim of the experimental part was comparing cytotoxic activity between commercially available chemotherapeutics and selected G-quadruplex interacting ligands. Another task was the study of apoptosis and necrosis after the treatment of selected chemicals on cell lines and after the localization of ligands interacting with G-quadruplexes in the cells of the breast cancer cell line. In the experimental part, G-quadruplex interacting ligands have been shown to exhibit similar cytotoxic activity to commercially available chemotherapeutic agents.

KLÍČOVÁ SLOVA

Chemoterapeutika, G-kvadruplexy, ligandy interagující s DNA, testování viability

KEYWORDS

Chemotherapeutics, G-quadruplexes, DNA-interacting ligands, viability assays

ZEMANOVÁ, Anita. Testování působení chemických látek na viabilitu buněčných linií. Brno, 2019. 62 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D..

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.

.....
Anita Zemanová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za jeho odborné rady, cenné připomínky a pomoc při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR, zejména M.Sc. Alessiu Cantarovi, Mgr. Janu Coufalovi, Ph.D. a Mgr. Zuzaně Soldánové za jejich cenné rady, vytvoření přátelské atmosféry při práci v laboratoři a jejich ochotu mi poradit kdykoliv jsem potřebovala.

1 OBSAH

1	OBSAH.....	6
2	ÚVOD.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Nádory.....	9
3.1.1	Chemoterapeutika	9
3.1.1.1	5-Fluorouracil	9
3.1.1.2	Roskovitin	10
3.1.1.3	Doxorubicin	11
3.1.1.4	Cisplatina	11
3.2	Alternativní struktury DNA	12
3.2.1	G-kvadruplexy	13
3.2.1.1	G-kvadruplexy v telomerech.....	14
3.2.1.2	G-kvadruplexy v promotorových oblastech.....	14
3.2.1.3	G-kvadruplexy v RNA	15
3.2.2	I-motivy	15
3.2.3	Triplexy	16
3.2.4	Křížové struktury	17
3.2.5	Z-DNA.....	17
3.3	Ligandy interagující s DNA.....	17
3.3.1	Ligandy interagující s G-kvadruplexy	18
3.4	Testy viability	21
3.4.1	Tetrazoliové sloučeniny.....	21
3.4.2	Resazurin	22
3.4.3	ATP-bioluminiscenční test	23
3.4.4	Sulforhodamine B.....	23
4	CÍLE PRÁCE.....	24
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
5.1	Materiál	25
5.1.1	Použité chemikálie.....	25
5.1.2	Použité roztoky a média	25
5.1.3	Použité přístroje a pomůcky	25
5.1.4	Buněčné linie	26
5.1.5	Chemoterapeutika a ligandy interagující s G-kvadruplexy	26
5.2	Metody	26
5.2.1	Kultivace buněčných linií	26
5.2.2	Testy viability	27

5.2.3	Měření absorpčních a emisních spekter.....	27
5.2.4	Detekce apoptózy a nekrózy	28
5.2.5	Studium lokalizace cytostatika v buňkách.....	29
6	VÝSLEDKY	30
6.1	Testování viability a stanovení IC_{50}	30
6.2	Absorpční a emisní spektra ligandů interagujících s G-kvadruplexy	34
6.3	Detekce apoptózy a nekrózy	36
6.4	Lokalizace ligandů interagujících s G-kvadruplexy v buňkách.....	39
7	DISKUZE	44
8	ZÁVĚR	46
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	47
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	61

2 ÚVOD

V dnešní době se lidé dožívají vyššího věku, než tomu bylo v minulosti, ale s prodlužující se délkou života narůstá pravděpodobnost, že u nás propukne rakovina. Je to velmi aktuální téma, jelikož spolu s nemocemi oběhové soustavy se jedná o nejčastější příčinu smrti ve většině rozvinutých zemích a Česká republika není výjimkou. Ačkoliv je známo mnoho nemocí, které již byly vymýceny nebo proti nim lze účinně bojovat, spolehlivý lék na rakovinu se dosud nepodařilo objevit. Proto je hledání účinného léčiva na rakovinu stále v popředí zájmu mnoha vědců. Ve většině případů je také zásadní, v jaké fázi byla nemoc diagnostikována a včasná diagnostika tak může výrazně zvýšit šanci na vyléčení, což je dalším problémem při boji proti rakovině, jelikož nemoc může dlouho probíhat bez příznaků a první příznaky se mohou objevit až když dojde k rozvoji metastáz.

Existují některé léčebné postupy, kterými lze proti rakovině více či méně úspěšně bojovat. Tyto postupy ve většině případů zahrnují chirurgické odstranění nádoru kombinované s chemoterapií a radioterapií. Tento způsob léčby je však spojen s mnoha nežádoucími účinky a nejistým výsledkem. V dnešní době se také do popředí dostávají metody využívající k boji proti rakovině vlastní imunitní systém nebo metody genové terapie.

Slibnými léčivy jsou také ligandy interagující s G-kvadruplexy, což jsou sekundární struktury v DNA. Jedná se o čtyřřetězcové struktury vyskytující se v oblastech bohatých na guanin, které se často nachází v regulačních oblastech DNA, jako jsou například promotory a dále jsou G-kvadruplexy také hojně zastoupeny v telomerách. Ligandy interagující s G-kvadruplexy jsou schopné stabilizovat strukturu G-kvadruplexu, a tím inhibovat enzym telomerasu, která je nezbytná pro prodlužování telomer rychle se dělících nádorových buněk. Podobně ligandy interagující s G-kvadruplexy mohou stabilizovat tyto čtyřřetězcové struktury v promotorových oblastech genů, a tím ovlivnit jejich expresi.

Cílem této diplomové práce je porovnat vliv vybraných komerčně dostupných chemoterapeutik a ligandů interagujících s G-kvadruplexy na viabilitu buněčných linií. Testy byly provedeny na nádorové buněčné linii karcinomu prsu (MCF7) a nenádorových embryonálních buňkách ledvin (HEK293FT). V práci byly testovány čtyři chemoterapeutika a čtyři ligandy interagující s G-kvadruplexy.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Nádory

Rakovina patří mezi nejčastější onemocnění ve většině rozvinutých zemích. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny byla v roce 2018 rakovina diagnostikována 18,1 milionu lidí a zemřelo na ni 9,6 milionu lidí [1]. Vyznačuje se rychlým buněčným dělením a tvorbou abnormálních buněk, které se mohou šířit do okolních tkání a metastázovat. Mezi současné způsoby léčby patří chirurgická resekce, radioterapie, hormonální léčba a chemoterapie [2]. Nádorové buňky jsou náchylnější na poškození DNA díky neustálému dělení a chemoterapie a radioterapie má tak na ně mnohem větší efekt než na okolní tkáň, které se nedělí. Nádorové buňky také mají nedostatek možností opravit poškozenou DNA [3].

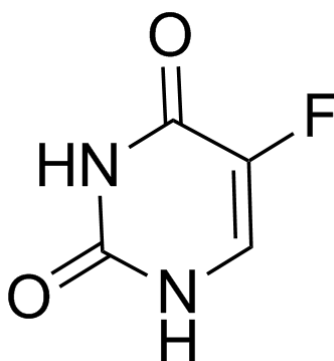
3.1.1 Chemoterapeutika

Od většiny momentálně používaných chemoterapeutik se očekává, že spustí apoptózu u buněk, které jsou na ně náchylné. Použití těchto látek je však spojeno s mnoha nežádoucími účinky, jako je například alopecie, imunodeficience, únava a problémy s plodností [2, 4].

Chemoterapeutika (též cytostatika nebo antineoplastika) se dělí do několika kategorií. Jednou z kategorií jsou alkylační činidla, která způsobují alkylaci DNA. To vede k tvorbě crosslinků a rozlomení vlákna dvoušroubovice, což má za následek apoptózu nebo nekrózu. Nejvíce náchylné na alkylaci DNA jsou rychle dělící se buňky, ale alkylace může též nastat i v buňkách klidových. Mezi alkylační činidla patří například cyklofosfamid, ifosfamid, busulfan a melfalan [5]. Další skupinou jsou antimetabolity, které ovlivňují syntézu DNA nebo RNA, a to buď nahrazením nukleotidu (např. 6-merkaptopurin), nebo blokadou syntézy nukleotidu (5-fluorouracil). DNA nebo RNA obsahující antimetabolitové nukleotidy vede k tvorbě zkrácených proteinů a následné apoptóze. Dalšími cytostatiky jsou přírodní produkty, tedy chemoterapeutika odvozená od rostlin, hub nebo bakterií. Patří sem převážně rostlinné alkaloidy a antibiotika s protinádorovým účinkem. Rostlinné alkaloidy jako vinblastin nebo vinkristin inhibují pohyb mikrotubulů tvořících buněčný cytoskelet, který umožňuje intracelulární transport. Funkční mikrotubuly jsou také důležité během mitózy, kdy umožňují transport replikovaných chromozomů. Přerušení transportu znemožní rozdělení dělící se buňky. Protinádorová antibiotika (např. doxorubicin, mytomicin C) se izolují z bakterií rodu *Streptomyces*, které patří mezi volně se vyskytující aktinobakterie. Další kategorie zahrnuje platinové sloučeniny jako cisplatina, karboplatina a oxaliplatina. Jejich mechanismus účinku spočívá v tom, že dokážou kovalentně spojit molekuly DNA, RNA a proteinů. To následně vede k chybám při replikaci, transkripci a inhibuje to funkci poškozených proteinů. Posledním příkladem mohou být také multikinázové inhibitory [6].

3.1.1.1 5-Fluorouracil

Tato látka byla vyvinuta v roce 1957 a patří mezi antimetabolity. Je to analog uracilu s atomem fluoru v poloze C5 (Obrázek 1). Jeho protinádorové účinky spočívají v inhibici thymidylát syntázy a v inkorporaci svých metabolitů (fluorodeoxyuridinmonofosfát, fluoredeoxyuridintrifosfát, fluorouridintrifosfát) do RNA, čímž narušují syntézu a její funkci. Thymidylát syntáza katalyzuje přeměnu deoxyuridinmonofosfátu (dUMP) na



Obrázek 1 Struktura 5-fluorouracilu (převzato z [119])

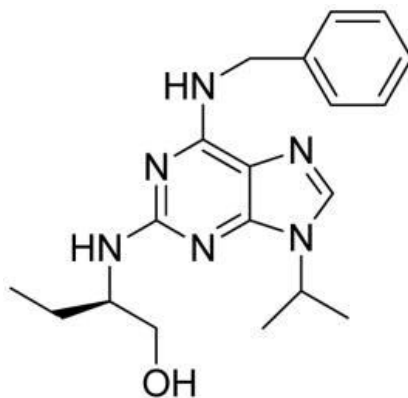
deoxytymidinmonofosfátu (dTMP). Její inhibicí je tedy blokována syntéza dTMP, což vede k nerovnováze deoxynukleotidů a zvýšené hladině deoxyuridintrifosfátu. To způsobuje narušení syntézy DNA a vede k jejímu poškození [7, 8].

5-Fluorouracil se používá během chemoterapie proti několika druhům rakoviny, zejména trávicího traktu. Obvykle se podává kontinuální infúzí, často také v kombinaci s chemoterapeutickými látkami [9]. Problémem mohou být jeho toxické vedlejší účinky, jako jsou průjem, mukozitida a leukopenie [10].

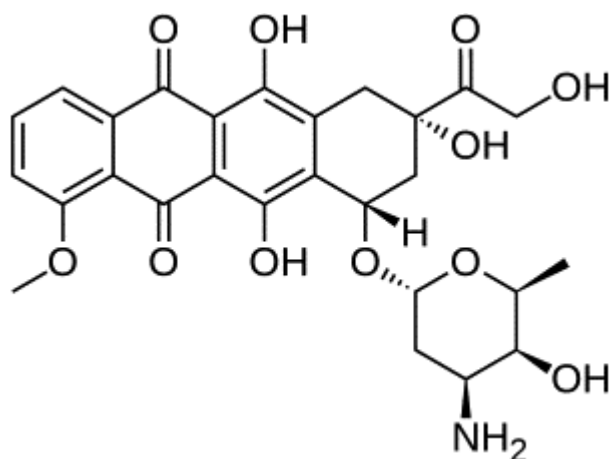
3.1.1.2 Roskovitin

R-roskovitin, také známý jako Seliciclib a CYC202, patří mezi inhibitory cyklin-dependentních kinas (Cdk) a byl objeven roku 1997. Cyklin dependentní kinasy hrají důležitou roli při regulaci buněčného dělení a Cdk proteiny a jejich regulátory jsou často deregulovány v lidských nádorech. Mechanismus účinku roskovitinu je založen na tom, že soutěží s ATP o vazebné místo na Cdk [11, 12]. V podmínkách *in vitro* je účinný vůči Cdk1, Cdk2, Cdk5, Cdk7 a Cdk9 [3]. U buněčných linií způsobuje akumulaci buněk v G1 a G2 fázi, inhibuje zpracování rRNA, inhibuje transkripci, způsobuje poškození jádérka a indukuje v buňkách apoptózu ve všech fázích buněčného cyklu [12]. R-roskovitin je třikrát substituovaný purinový analog, konkrétně se jedná o benzylaminový substituent, (2R) -1-hydroxybutan-2-yl a isopropyl v polohách C-6, C-2-N a N-9 (Obrázek 2) [13].

Roskovitin má široký lékařský potenciál, kromě rakoviny byly provedeny předklinické studie na řadu dalších onemocnění. Mezi ně patří mrtvice, Parkinsonova choroba, některé virové infekce, Lambert-Eatonův syndrom, Cushingův syndrom, diabetes a další [14].



Obrázek 2 Chemická struktura R-roskovitinu (převzato z [12])



Obrázek 3 Chemická struktura doxorubicinu (převzato z [120])

Momentálně je roskovitin ve fázi klinického testování na léčbu rakoviny a mezi jeho dosud zjištěné negativní účinky patří únava, zvracení, nauzea, horečka a hypokalémie. Bylo také zjištěno, že roskovitin má synergistický účinek spolu s dalšími chemoterapeutiky (např. doxorubicin, taxol, vinblastin, 5-fluorouracil) [15, 16].

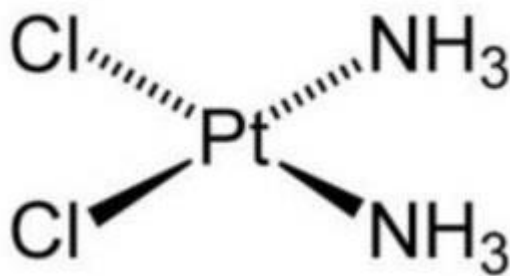
3.1.1.3 Doxorubicin

Doxorubicin, také známý pod obchodním názvem Adriamycin, je jedním z nejúčinnějších cytostatik a je běžně používán pro léčbu několika typů rakoviny. Patří mezi anthracyklinová antibiotika a poprvé byl izolován v roce 1969 ze *Streptomyces peucetius* var. *caesius* [17]. Má různý mechanismus účinku na maligní buňky. Je schopený interkalace do DNA, a tím dochází k inhibici syntézy DNA a RNA v rychle rostoucích buňkách blokováním replikačních a transkripčních procesů. Také inhibuje topoizomerasu II a vyvolává tvorbu volných radikálů, což způsobuje oxidační poškození membrán, proteinů a DNA [18]. Molekula doxorubicinu obsahuje anthrachinonové jádro spojené glykosidickou vazbou s aminosacharidem daunosaminem (Obrázek 3) [19].

Tato látka se používá k léčbě různých typů rakoviny, jako jsou některé typy leukémií, lymfomy, sarkomy, myelomy, rakovina prsu, prostaty, vaječníků, pankreatu a další [20]. U doxorubicinu se také projevují některé vedlejší účinky jako u jiných chemoterapeutik. Patří mezi ně alopecie, hyperpigmentace nehtů, vyrážka, svědění, nevolnost, zvracení, mukositida, průjem, dehydratace a další. Jeho negativem je ale kardiotoxicita, která je pravděpodobně spojena s tvorbou volných radikálů a tvorbou komplexů doxorubicinu s železem v membránách mitochondrií a s tím spojenou zvýšenou permeabilitou vnitřní mitochondriální membrány [18].

3.1.1.4 Cisplatina

Cisplatina, cisplatinum nebo *cis*-diamminedichloroplatinum (II) byla poprvé syntetizována v roce 1844, ale zájem o možné použití sloučenin platiny při léčbě rakoviny vznikl později. V 60. letech 20. st. bylo zjištěno, že některé elektrolytické produkty platinových elektrod jsou schopné inhibovat dělení buněk *Escherichia coli*. Následně se zjistilo, že činidlo odpovědné za inhibici byla cisplatina [21, 22]. Jedná se o komplex platiny s navázanými dvěma atomy chloridu a dvěma molekulami amoniaku (Obrázek 4). Aby cisplatina vykazovala protinádorovou aktivitu, musí dojít ke ztrátě chlorů z molekuly cisplatiny. Ty jsou při disociaci nahrazeny molekulami vody, zatímco dvě aminové skupiny zůstávají připojeny k platině



Obrázek 4 Chemická struktura cisplatiny (převzato z [21])

i po vazbě na DNA. V extracelulárním prostředí je koncentrace chloridů vysoká, nevznikají zde tedy vodné komplexy cisplatiny. Ty vznikají až v intracelulárním prostředí, kde je koncentrace těchto iontů nižší [23]. Vstup této látky do buněk přes plazmatickou membránu není zcela objasněn. Dříve se předpokládalo, že cisplatina vstupuje do buněk pasivní difúzí, ale později se ukázalo, že transportér mědi (CRT1) souvisí se vstupem cisplatiny. Buňky, které jsou ošetřeny mědí, což je hlavní substrát CRT1, jsou tedy chráněny před cytotoxickými účinky cisplatiny a tento mechanismus také může vysvětlovat některé případy získané rezistence na toto chemoterapeutikum [24]. Vznikem vodných komplexů uvnitř buněk se cisplatina stává silným elektrofilem a může reagovat s nukleofily. Váže se v pozici N7 na purinových zbytcích a může tak způsobit poškození DNA, blokování buněčného dělení a vyvolat následnou apoptózu [21].

Pro klinické využití byla cisplatina schválena v roce 1978 a běžně se používá při léčbě mnoha typů rakoviny, včetně rakoviny močového měchýře, hlavy a krku, vaječníků a varlat. Použití cisplatiny se pojí s mnoha nežádoucími účinky. Mezi ně patří například zvracení, nauzea, myelosuprese, nefrotoxicita, neurotoxicita, neurosenzorické poruchy, kam patří hlavně ototoxicita [25]. Cisplatina se také dlouhodobě akumuluje v těle. U pacientů, kteří se léčili na rakovinu varlat, bylo zjištěno, že až 20 let po léčbě je možné detekovat cisplatinu v plazmě [26]. U derivátů cisplatiny, karboplatiny a oxaliplatiny bylo pozorováno méně nežádoucích účinků. Avšak karboplatina vykazuje nižší cytotoxické účinky oproti cisplatině a musí být podávána ve vyšších dávkách. Druhý derivát oxaliplatina ve srovnání s cisplatinou působí více cytotoxicky [27].

3.2 Alternativní struktury DNA

Struktura DNA je známá od roku 1953, kdy Watson a Crick popsali její strukturu na základě rentgenové strukturní analýzy Wilkinse a Franklinové [28]. Tato struktura, složená ze dvou řetězců tvořících pravotočivou dvoušroubovici, je nejznámější verze této šroubovice a bývá označovaná jako B-DNA. Řetězce, které mají antiparalelní orientaci, jsou spojeny vodíkovými vazbami mezi dusíkatými bázemi a na jednu otočku dvoušroubovice připadá 10,5 párů bází. Struktura B-DNA je nejstabilnější při vysoké vlhkosti a při snížení aktivity vody se mění na jinou formu, pravotočivou A-DNA. A-DNA obsahuje 11 párů bází na jednu otočku helixu a má tedy více ohnutou konfiguraci, která je méně výhodná [29]. Kromě pravotočivé dvoušroubovice může DNA zaujmout řadu dalších struktur, jako je Z-DNA, vlásenky, křížové struktury, triplexy a kvadruplexy (i-motivy a G-kvadruplexy). Tvorba těchto struktur je ovlivněna fyziologickými podmínkami, sekvencí nukleotidů a torzním napětím DNA. Funkce těchto struktur nebyla zatím zcela objasněna. Z důvodu častého výskytu v blízkosti promotoru, je možné, že se mohou podílet na iniciaci transkripce [30].

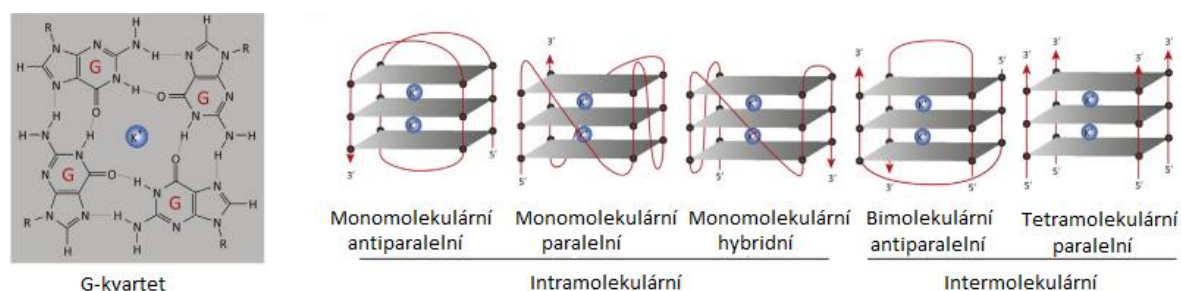
3.2.1 G-kvadruplexy

Sekvence DNA a RNA, které jsou bohaté na guanin, se mohou skládat do stabilních sekundárních struktur nazývaných G-kvadruplexy (guaninové kvadruplexy, G4). Jsou tvořeny minimálně dvěma G-kvartety, což je rovinná struktura skládající se ze čtyř guaninových zbytků spojených pomocí Hoogstenova párování. G-kvadruplexy se dělí na intramolekulární, pokud je struktura tvořena jedním řetězcem nukleové kyseliny, a na intermolekulární, který je složený z více než jednoho řetězce nukleové kyseliny. G-kvadruplexy mohou mít paralelní nebo antiparalelní topologii. U paralelní topologie jsou všechny řetězce nukleových kyselin orientovány stejným směrem, kdežto u antiparalelní probíhají v opačných směrech. Struktura G-kvartetu a rozdílné možnosti uspořádání G-kvadruplexu jsou znázorněny na Obrázku 5 [31, 32].

V 60. letech minulého století bylo pozorováno, že guanosinmonofosfát (GMP) tvoří agregáty složené ze čtyř jednotek [33]. Později během experimentů s oligonukleotidy obsahujícími tři nebo čtyři sousedící guaniny bylo zjištěno, že oligonukleotidy spontánně tvoří čtyřřetězcovou strukturu – G-kvadruplex [34]. Dlouhou dobu byly kvadruplexy pozorovány pouze *in vitro* a potvrzení jejich existence *in vivo* bylo umožněno díky vývoji specifických protilátek namířených proti G-kvadruplexům v telomerách. G-kvadruplexy byly poprvé vizualizovány v roce 2001 pomocí imunodetekce v telomerách *Stylonychia lemnae* [35].

Tvorba a stabilita G-kvadruplexů závisí na několika faktorech, jako jsou interakce mezi bázemi nukleových kyselin, elektrostatickými interakcemi a hydratačním obalem. Pro tvorbu G-kvadruplexů je nutná přítomnost monovalentního kationtu, jako je Na^+ nebo K^+ . Tyto ionty se nachází ve středu guaninového uspořádání a jejich umístění závisí na jejich velikosti a náboji. Velikost ovlivňuje, jestli se kation bude nacházet v rovině kvartetu nebo mezi dvěma kvartety. Menší Na^+ se tedy může nacházet v obou pozicích, ale větší ionty jako K^+ a NH_4^+ jsou příliš velké a bývají umístěny pouze mezi dvěma sousedními kvartety [36]. Nedávné studie také ukazují, že kromě velikosti iontu může záležet i na topologii kvadruplexu. Na^+ dokázal stabilizovat antiparalelní G-kvadruplex, ale K^+ tuhle topologii destabilizoval [37].

Nejvíce sekvencí, které mají potenciál tvořit G-kvadruplexy se nachází v telomerách, jsou také časté v promotorech a na hranici mezi introny a exony. Jejich tvorba v buňkách hraje roli v různých biologických funkcích. Tvorba v promotorech genů může souviset s vazbou transkripčního faktoru a exprese genu. G-kvadruplexy také mohou blokovat postup DNA polymerasy a způsobit tak poškození DNA, kterým je například zlomení řetězce. Dále hrají důležitou roli při iniciaci replikace a bylo také zjištěno, že mohou vyvolávat epigenetické změny tím, že G-kvadruplexy dočasně zastaví proces duplikace a toto časové zpoždění způsobí ireverzibilní změnu v histonové konfiguraci tvorbou mezery a tím dochází ke ztrátě rodičovské epigenetické informace [38, 39].



Obrázek 5 Struktura G-kvartetu a jednotlivé typy G-kvadruplexů (převzato a upraveno dle [121])

3.2.1.1 G-kvadruplexy v telomerech

Telomery jsou nukleoproteinové struktury, které se vyskytují na koncích chromozomů. Jsou nezbytné pro replikaci chromozomů a chrání je před degradací a fúzí. Jejich udržování je zajištěno specifickou reverzní transkriptasou – telomerasou. Hlavní funkcí telomerasy je tedy syntéza telomerních DNA repetice k zachování délky telomer. V opačném případě se buňky rychle dostávají do stavu senescence a může dojít k apoptóze [40]. Telomerasa je potlačena ve většině lidských somatických buňkách a znovu bývá aktivována ve většině nádorech. Telomery jsou tedy chráněny a nádorové buňky mohou proliferovat neomezeným způsobem [40, 41].

Telomery obratlovců jsou tvořeny dvouřetězcovou DNA s opakující se sekvencí $d(\text{GGGTTA})_n/d(\text{CCCAAT})_n$ a jsou zakončeny 50-200 nukleotidů dlouhým jednořetězcovým přepisem úsekem. Přepis telomery na konci 3' je obvykle bohatý na guanin a může vytvářet různé struktury, jako jsou G-kvadruplexy nebo T-smyčky. S každým buněčným dělením dochází ke ztrátě 100 až 200 bp ze sekvence telomery. To je způsobeno tím, že polymerasa není schopná plně syntetizovat opožďující se řetězec během replikace [35, 42]. Udržování a ochrana telomer je spojena také s proteinovým komplexem (Shelterin), který je tvořen šesti proteiny, a to TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 a TPP1. TRF2 je také zapojen do tvorby T-smyčky a její stabilizace. T-smyčka je tvořena jednořetězcovým 3' přepisem zapleteným do dsDNA telomery a slouží hlavně jako ochrana konce telomery [43].

Telomerasa je aktivní asi u 85 % nádorových buněk a vznik G-kvadruplexů v telomerní DNA způsobuje inhibici enzymu telomerasy nutnou pro proliferaci nádorových buněk. A proto sloučeniny, které jsou schopny se vázat na G-kvadruplexy a stabilizovat je, mohou být slibnými protinádorovými léčivy. Dlouhodobá aplikace takových ligandů na buněčné linie s aktivní telomerasou vedla ke zkrácení telomer a následné apoptóze, která souvisela s poruchou funkce telomerasy. Při pokusech s myšimi a lidskými nádorovými buňkami bylo také prokázáno, že různé ligandy (telomestatin, RHPS4) stabilizující G-kvadruplexy, způsobily dysfunkci telomery změnou integrity komplexu Shelterinu, nutného pro udržení telomer [44].

3.2.1.2 G-kvadruplexy v promotorových oblastech

Přibližně 40 % lidských genů obsahuje v blízkosti promotorových oblastí sekvence, které mají potenciál k tvorbě G-kvadruplexů, což pravděpodobně souvisí s jejich funkcí při regulaci transkripce. Tyto struktury byly identifikovány u řady genů jako jsou *c-MYC*, *c-Kit*, *KRAS*, *PDGF-A*, *hTERT*, *Rb*, *RET* a *HIF*. Také mezi onkogeny a nádorově supresorovými geny je počet G-kvadruplexů rozdílný, což naznačuje různé regulační mechanismy těchto genů [45].

c-MYC kóduje multifunkční transkripční faktor, který může působit jako aktivátor transkripce některých genů zapojených do buněčné proliferace a zároveň působí jako transkripční represor jiných genů podílejících se na zastavení růstu. V nádorových buňkách je funkce proteinu *c-MYC* téměř vždy aktivována prostřednictvím zvýšené aktivace onkogenních drah. Vzhledem k tomu, že nadměrná exprese *c-MYC* se vyskytuje u mnoha lidských malignit, včetně nádorů, snížení exprese genu by mohlo být účinné při léčbě rakoviny [46]. Promotorová oblast *c-MYC* genu obsahuje nukleasový hypersenzitivní element NHE III₁, který se nachází -142 až -115 párů bází před promotorem P1. V tomto elementu existuje jedna domnělá sekvence tvořící G-kvadruplex. Právě tvorba G-kvadruplexů v *c-MYC* promotoru pravděpodobně způsobuje potlačení transkripce. Tudíž by ligandy interagující s G-kvadruplexy mohly potlačit expresi *c-MYC* pomocí stabilizace G-kvadruplexů [47].

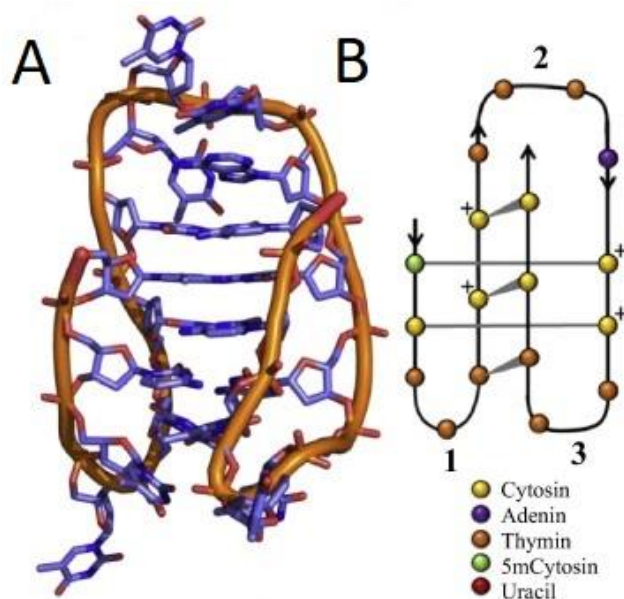
3.2.1.3 G-kvadruplexy v RNA

G-kvadruplexy v RNA jsou spojeny s mnoha biologickými procesy, jako je udržování telomer, sestřih pre-mRNA, polyadenylace a regulace translace. Sekvence bohaté na guaniny mají větší tendenci se skládat do G-kvadruplexů z důvodu chybějícího komplementárního řetězce a také díky vyšší stabilitě než DNA kvadruplexy. V lidském genomu se tyto struktury vyskytují v nepřekládaných oblastech (UTR) mRNA, které hrají důležitou roli v post-transkripční regulaci genové exprese. Iniclace translace probíhá v několika krocích, začíná vazbou malé ribozomální podjednotky na 5' konec a následuje skenování 5'-UTR ve směru 5'→3' až do identifikace iniciačního kodonu (AUG) a poté se připojí velká ribozomální podjednotka za vzniku ribozomu. U většiny mRNA, které obsahují G-kvadruplex v 5'-UTR, dochází k inhibici translace. G-kvadruplexy byly objeveny i v molekulách TERRA (Telomeric repeat-containing RNA). TERRA je RNA, která je transkribována z telomerické DNA a slouží k regulaci délky telomer a inhibici telomerasy [45].

3.2.2 I-motivy

I-motivy (interkalovaný motiv, iM) jsou vedle G-kvadruplexů dalším typem kvadruplexní struktury. Byly poprvé popsány v roce 1993, kdy bylo objeveno, že sekvence DNA obsahující úseky cytosinů mohou tvořit interkalované čtyřřetězcové struktury za kyselých podmínek [48].

I-motiv je jedinou známou strukturou nukleové kyseliny, která obsahuje systematickou interkalaci bází. Struktura iM je tvořena dvěma paralelními řetězci duplexů, které jsou interkalované v antiparalelní orientaci. Jsou drženy pohromadě hemiprotonovanými cytosin-cytosin⁺ (C-C⁺) páry bází. Stejně jako G-kvadruplexy mohou být i-motivy intermolekulární a být tedy složeny ze dvou nebo čtyř oddělených řetězců nukleové kyseliny. Nebo mohou být intramolekulární v důsledku uspořádání čtyř sekvencí bohatých na cytosin na stejném řetězci. Existují dvě různé interkalační topologie iM označované jako 3'E a 5'E. Pokud je nejkrajnější pár C-C⁺ na 3' konci, struktura je označovaná jako 3'E a naopak [49, 50]. Struktura a schématické zobrazení iM je zobrazeno na Obrázku 6.



Obrázek 6 (A) 3D struktura i-motivu; (B) schématické zobrazení 3'E struktury i-motivu (převzato a upraveno dle [122])

Jelikož i-motivy obsahují hemiprotonované páry bází, předpokládalo se, že se mohou tvořit pouze za kyselých podmínek. Ale některé studie ukazují, že může dojít k tvorbě i-motivů v závislosti na sekvenci a podmínkách prostředí i při neutrálním pH [51]. Nejdříve se předpokládalo, že iM se nemohou tvořit *in vivo* z důvodu jejich velké závislosti na podmínkách prostředí. Nedávno byly pro jejich studium v živých buňkách vyvinuty protilátky iMab, které jsou schopné se na iM vázat s vysokou afinitou a specifitou, a tyto protilátky byly použity pro imunofluorescenční barvení na třech různých buněčných liniích (MCF7, U2OS, HeLa) a lokalizovaly tak struktury i-motivů v jádře. Také se ukázalo, že jejich počet kolísá během buněčného cyklu a tvoří se v regulačních oblastech lidského genomu, včetně promotorů a telomer [52]. Předpokládá se, že iM se zapojují do regulace genové exprese a tyto struktury mohou fungovat jako rozpoznávací motivy pro proteiny, které se podílí na aktivaci transkripčního aparátu. Výskyt iM v genomu souvisí díky komplementaritě s výskytem G-kvadruplexů, ale jejich četnost a funkce v genomu není zatím zcela prozkoumána [49].

3.2.3 Triplexy

Struktura DNA složená ze tří řetězců byla poprvé popsána v roce 1957 [53]. Skládá se z pomocného jednořetězcového vlákna označovaného jako oligonukleotid tvořící triplex (triplex-forming oligonucleotide, TFO) a z dvouřetězcové DNA. Vznik triplexu je zajištěn pomocí Hoogstenova párování bází, přičemž TFO se váže do velkého žlábků duplexu. Rozlišují se dva typy triplexů, intermolekulární a intramolekulární. Pro tvorbu triplexu je ideálně vyžadována přítomnost homopurinové sekvence duplexu a homopyrimidinové sekvence u komplementárního řetězce [54, 55].

U intermolekulárních triplexů pochází třetí řetězec z jiné molekuly nukleové kyseliny. Rozlišují se dva různé motivy podle orientace třetího řetězce vůči duplexu. Třetí polypyrimidinový řetězec může být připojen na polypurinové duplexní vlákno pomocí Hoogstenova párování paralelně, tedy v orientaci 5'→3', stejně jako vlákno duplexu bohaté na puriny. Nebo může být také připojen antiparalelně, a to pomocí reverzních Hoogsteenových vodíkových vazeb. Zatímco antiparalelní připojení je stabilní při neutrálním pH, paralelní orientace se tvoří pouze za kyselých podmínek, kdy N3 v cytosinu u TFO je protonován. Intramolekulární triplex (H-DNA nebo *H-DNA) se skládá z duplexu a TFO pocházejícího z jednoho řetězce stejného duplexu. Komplementární řetězec zůstává jednořetězcový a je citlivý na nukleasovou aktivitu. H-DNA je struktura, ve které se pyrimidinový řetězec váže paralelně na purinové vlákno v duplexu, kdežto u *H-DNA se pyrimidinový řetězec váže k purinovému vláknu antiparalelně [55].

Hoogsteenova vodíková vazba je v porovnání s Watson-Crickovou slabší, proto k tvorbě triplexů dochází jen za určitých podmínek. Kromě kyselých podmínek kvůli protonizaci cytosinu v N3 může být stabilita triplexů zvýšena ionty Mg^{2+} , které slouží k neutralizaci nepříznivého odpuzování tří negativně nabitých řetězců nukleové kyseliny [56].

Výskyt triplexů v genomu souvisí s regulací genové exprese, poškozením DNA, a také s genetickou nestabilitou vedoucí k různým poruchám, včetně rakoviny. Předpokládá se, že genetická nestabilita může být vyvolána řadou mechanismů, jako je blokování replikace nebo prodloužení transkripce [57]. Například bylo zjištěno, že existence H-DNA struktur blokuje replikaci *in vitro* vytvořením silné bariéry pro Taq DNA polymerasu [58]. Sekvence bohaté na polypuriny-polypyrimidiny byly lokalizovány hlavně v intronech, promotorech, 5' a 3' nepřekládaných oblastech a ve větší míře se také vyskytovaly v genech souvisejících s buněčnou signalizací a buněčnou komunikací. Také geny obsahující sekvence

polypurinů-polypyrimidinů byly náchylnější k chromozomálním translokacím a byly exprimovány na nižší úrovni v porovnání s jinými geny [59].

3.2.4 Křížové struktury

Křížové struktury se tvoří v palindromatických oblastech DNA a jako celek jsou tvořeny ze dvou delších ramen duplexu a dvou kratších vlásenkových ramen. K vytvoření křížové struktury musí být přerušeny vodíkové vazby mezi jednotlivými komplementárními bázemi a následně mohou vzniknout intramolekulární vodíkové vazby, čímž vzniká rameno s nepárovými bázemi ve špičce. Tvorba těchto struktur ovlivňuje superhelicitu DNA a mohou mít také vliv na umístění nukleozomu, transkripci, replikaci, opravy DNA, mohou poskytovat vazebná místa pro proteiny a mají také pravděpodobně spojitost s methylací DNA [60]. Existují dvě různé konformace křížových struktur, první konformace je symetrická a je tvořena rameny, která svírají úhel přibližně 90°. Druhý typ konformace se vyznačuje ostrými úhly mezi jednotlivými rameny křížové struktury [61].

3.2.5 Z-DNA

Levotočivá DNA neboli Z-DNA je dvouřetězcová šroubovice DNA, která se obtáčí podle „cik-cak“ (zig-zag) vzoru. Díky tomu získala i své pojmenování Z-DNA, když byla roku 1979 objevena [62]. Molekula se otáčí kolem glykosidových vazeb tak, že se báze střídají v syn a anti konformaci, což zajišťuje její klikatý tvar. Změna konformace z B-DNA na Z-DNA způsobí, že si jsou fosfátové skupiny blíže, což způsobuje vyšší elektrostatické odpuzování těchto nabitých skupin. V přítomnosti roztoku s vysokým obsahem soli je však elektrostatické odpuzování značně sníženo a struktura Z-DNA se stává stabilní konformací. Tvorba levotočivé šroubovice je také ovlivněna sekvencí a nejjednodušší se tvoří pokud se purinová báze střídá s pyrimidinovou [63].

Z důvodu vyšší potřeby energie byla zpochybňována existence Z-DNA *in vivo*, ale tato struktura může vznikat i za fyziologických podmínek. Vyskytuje se ve velké míře v blízkosti místa počátku transkripce a předpokládá se, že její funkce souvisí s negativní superhelicitou [64].

3.3 Ligandy interagující s DNA

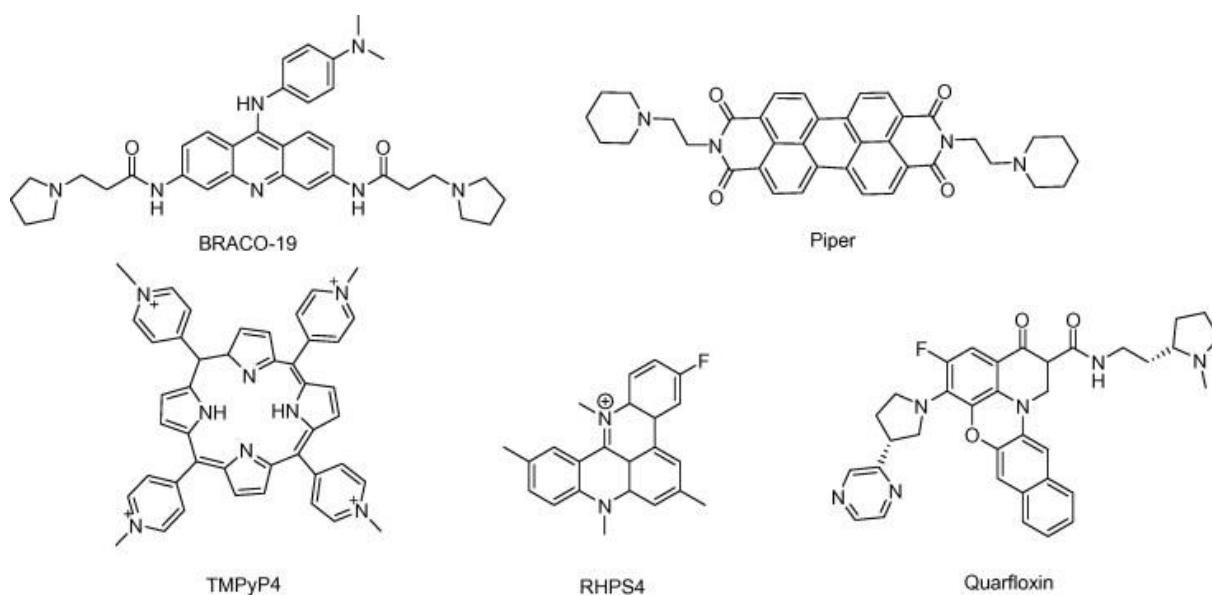
Existuje několik způsobů, kterými se molekuly mohou vázat na dvoušroubovici DNA. Patří mezi ně elektrostatické atrakce s aniontovou cukr-fosfátovou kostrou DNA, interakce s velkým nebo malým žlábkem, interkalace mezi páry bází prostřednictvím velkého nebo malého žlábků a interkalace mezi vlákny. V závislosti na strukturních vlastnostech molekuly a DNA, vykazuje mnoho molekul více než jeden způsob interakce s nukleovou kyselinou. Tyto interakce lze rozdělit do dvou kategorií – interkalace a interakce přes vodíkovou vazbu ve žlábků DNA [65].

Interkalace zahrnující vložení molekuly mezi páry bází DNA má za následek snížení šroubovicového vinutí a prodloužení DNA. Interkalátory se často používají jako protinádorová, antimalarická, antibiotická a antifungální činidla, ne všechny mají genotoxické účinky. Pro genotoxicitu je často nezbytná přítomnost bazických, kationtových nebo elektrofilních funkčních skupin a mezi genotoxické ligandy patří například chinolin [66, 67]. Vazby ve žlábkách DNA, na rozdíl od interkalačních činidel, nevyvolávají výrazné konformační změny. Molekuly mají nejčastěji pŕlměsícový tvar a vážou se do malého žlábků. Podobně jako interkalátory mají prokázané využití jako protinádorová nebo antibakteriální činidla [67].

3.3.1 Ligandy interagující s G-kvadruplexy

G-kvadruplexy kvůli své poloze a nízké četnosti v genomu se staly terapeutickým cílem při léčbě rakoviny. To vedlo k vývoji řady ligandů, které jsou schopny se vázat na G-kvadruplexy a tím ovlivňovat buněčné procesy a ovlivnit tak rozvoj rakoviny [68]. Tyto malé molekuly mohou stabilizovat telomerovou strukturu G-kvadruplexu a inhibovat funkci enzymu telomerasy. Podobně lze ovlivnit stabilitu G-kvadruplexů i v promotorových oblastech onkogenů [69].

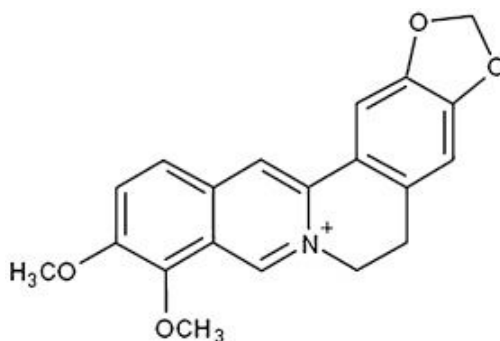
Ligandů již bylo popsáno velké množství a jsou pro ně typické určité charakteristické rysy. Tyto molekuly obsahují planární aromatické chromofory a kladně nabitě postranní řetězce (Obrázek 7) [69]. Při jejich syntéze je důležité, aby byly selektivní pro G-kvadruplexy a jako léčiva proti rakovině by měly mít antiproliferativní účinky na rakovinné buňky, indukovat inhibici telomerasy nebo supresi onkogenů [70].



Obrázek 7 Příklady jednotlivých ligandů interagujících s G-kvadruplexy ukazující jejich planární aromatická jádra (převzato z [71])

Berberin patří mezi přírodní rostlinné isochinolinové alkaloidy a je jedním z ligandů interagujících s G-kvadruplexy. Nachází se v rostlinách jako jsou například dříví ál obecný nebo vlašovičník větší. Izoluje se hlavně z kořenů, oddenků a kmenové kůry. Z chemického hlediska je berberin odvozený od 5,6-dihydrodibenzo[a,g]quinolizinia, jedná se tetrasubstituovaný alkaloid s methylenedioxy skupinou na C2 a C3 a dvěma methoxyskupinami na C9 a C10 (Obrázek 8) [72]. Vykazuje více farmakologických účinků, jako jsou antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé a protinádorové. Berberin je účinný proti gastroenteritidě, průjmu, hyperlipidemii, obezitě, onemocněním jater, hypertenzi, diabetu, metabolickému syndromu, polycystickým vaječníkům a Alzheimerově chorobě. Také byla zkoumána jeho účinnost proti rakovině a různé *in vitro* studie ukázaly, že berberin inhibuje proliferaci a migraci rakovinných buněk a indukuje apoptózu v řadě nádorových buněčných linií [73, 74]. Bylo prokázáno, že indukuje hypomethylaci promotoru *TP53* vedoucí k apoptóze u lidského myelomu U266 [75]. Dále také při experimentech s nádorovou buněčnou linií karcinomu prsu MCF7 a nenádorovou buněčnou linií lidského prsního epitelu MCF-12F bylo zjištěno, že berberin vykazoval výrazný cytotoxický účinek na linii MCF7, bez ovlivnění MCF-12F v koncentraci 25 μ M. Výsledky studie také naznačují, že berberin hraje významnou

pro-apoptotickou roli v rakoviných buňkách [76]. Ačkoliv je berberin slibným přírodním léčivem, různé farmakologické studie ukázaly, že po perorálním podání podléhá složitému metabolismu a jeho koncentrace v cytoplazmě je extrémně nízká. Proto se mnohé studie zaměřují více na metabolity berberinu, které mohou taktéž hrát důležitou roli při léčbě různých onemocnění. V klinické praxi je berberin využíván k léčbě některých onemocnění jako je *diabetes mellitus* druhého typu, neurodegenerativní onemocnění nebo rakovina [73].



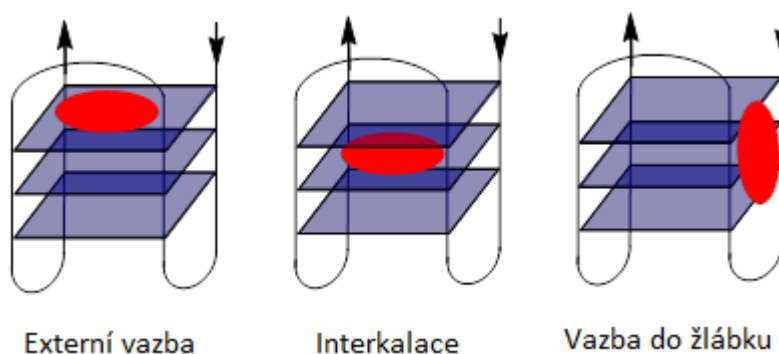
Obrázek 8 Chemická struktura berberinu (převzato z [72])

Příkladem dalšího ligandu, který stabilizuje struktury G-kvadruplexů, je **TMPyP** (5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin). Patří mezi kationtové porfyriny, což jsou aromatické makrocykly odvozené od porfinu. Jsou to tetrapyrolické sloučeniny, které se podílejí na mnoha biologických procesech, jako je přenos kyslíku (ve formě hemu) nebo fotosyntéza (jako chlorofyl). TMPyP je heterocyklická sloučenina obsahující čtyři pyrrolové kruhy spojené čtyřmi methinovými můstky, které jsou nezbytné pro fotochemické reakce a transport elektronů [77]. TMPyP se může vázat na G-kvadruplexy dvěma způsoby. Jedním z nich je interkalační vazba mezi sousedními G-kvartety a druhým je vazba na jeden nebo oba terminální G-kvartety (možnosti vazby ligandů na G-kvadruplexy jsou zobrazeny na Obrázku 9). Porfyrinový kruh TMPyP má podobnou velikost jako G-kvartet, což usnadňuje jejich vazbu [78]. V buňkách se tento ligand hromadí převážně v lysosomech a Golgiho aparátu (organelách bohatých na kyslík), ale při použití ve vysokých koncentracích nebo po jeho fotochemické aktivaci se rychle váže na nukleové kyseliny v jádře buněk. TMPyP lze na základě jeho zajímavých fyzikálně-chemických vlastností využít na řadu aplikací, od léčby rakoviny nebo mikrobiálních infekcí až po vývoj biosenzorů. Terapeutický účinek TMPyP po fotoaktivaci byl popsán proti širokému spektru nádorových buněčných linií včetně rakoviny prsu, děložního čípku, leukémie, plic, tlustého střeva a hrtanu. Normální buňky prokázaly sníženou schopnost akumulovat porfyrin ve srovnání s rakovinnými buňkami, což může být způsobeno jejich pomalejší metabolickou rychlostí [77].

Peryleny představují skupinu ligandů interagujících s G-kvadruplexy, která obsahuje odlišně substituovaný kondenzovaný aromatický kruhový systém (např. ligand PIPER na Obrázku 7). Toto hydrofobní heptacyklické centrální jádro je zodpovědné za vazbu na G-kvartet prostřednictvím $\pi - \pi$ interakcí. Studie na tomto skeletu poukázaly na dva rysy vazby na G-kvadruplexy. Prvním je zásaditost systému, která zabraňuje agregaci sloučeniny a vzdálenost mezi aromatickým centrálním jádrem a dusíkovým zbytkem v postranním řetězci, který moduluje rozpustnost ligandu a ovlivňuje rozpoznávání G-kvadruplexu [79]. **PIPER** (N,N'-bis[2-(1-Piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide; Obrázek 7) je hlavním zástupcem této skupiny ligandů a jedná se o velmi účinný a selektivní G-kvadruplexový ligand. Bylo prokázáno, že dokáže inhibovat DNA polymerasu a telomerasu připojením na G-tetradu

v G-kvadruplexech a dále způsobovat s tím spojené zkracování telomer, snížení buněčné proliferace a indukci senescence [79, 80]. PIPER vykazoval cytotoxický účinek na HeLa buňky, který byl jasně viditelný již po 24 hodinách. Bylo zjištěno, že při nízkých koncentracích ligandu je telomerasa mírně inhibována, zatímco při vyšších koncentracích dochází k úplné inhibici enzymu [81]. Jiné výzkumné studie ukázaly, že perylenové deriváty PIPER a PM2 indukovaly v *in vitro* podmínkách tvorbu G-kvadruplexů jak z telomerické DNA, tak i promotorové oblasti. Dále testy na buněčné linii karcinomu plic ukázaly, že tyto sloučeniny inhibovaly telomerasu a při dlouhodobém vystavení sub-cytotoxických dávek těchto perylenových derivátů bylo pozorováno zkrácení telomer a snížení buněčné proliferace [82]. PIPER vykazuje i antivirovou aktivitu. Bylo prokázáno, že PIPER stabilizoval struktury G-kvadruplexů v *nef* oblasti genomu HIV-1, která je důležitá pro replikaci viru, jeho infekčnost a patogenezi [79].

N,N'-(9-((4-(dimethylamino)phenyl)amino)akridin-3,6-diyl)bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propanamid), neboli **BRACO-19** (Obrázek 7), je dalším z podrobněji prostudovaných ligandů interagujících s G-kvadruplexy. Jedná se o 3,6,9-trisubstituovaný akridinový ligand a představuje jeden z nejúčinnějších inhibitorů lidské telomerasy. Mechanismus vazby na telomerní G-kvadruplexy je zprostředkováván pomocí tří způsobů – externí vazba, interkalace a vazba do žlábků (způsoby vazby ligandů na G-kvadruplexy jsou zobrazeny na Obrázku 9). U lidských nádorových linií způsobuje BRACO-19 inhibici růstu a vyvolává senescenci buněk už při velmi nízkých koncentracích po dnech až týdnech [83, 84]. V další studii byl testován vliv BRACO-19 na funkci telomerasy *in vitro* a *in vivo*. Testy probíhaly na buněčné linii UXF1138L (karcinom dělohy), která má velmi krátké telomery (2,7 kb). U *in vitro* experimentů došlo k výraznému snížení exprese lidské telomerasové reverzní transkriptasy po 24 hodinách a úplné zastavení růstu bylo pozorováno po 15 dnech. Současně došlo ke zkrácení telomer o 0,4 kb. *In vivo* testy, prováděné na myších, ukázaly také výrazný inhibiční účinek na růst nádoru, a to o 96 % v porovnání s kontrolou [40]. Obecně BRACO-19 může ovlivňovat přechod na 3' konci telomer, inhibovat helikasovou aktivitu proteinů a vyvolat rozsáhlé poškození telomer. BRACO-19 vykazuje dobré protinádorové účinky jako samotné nebo v kombinaci s jinými látkami na širokou škálu lidských nádorů. Jeho nevýhodou je jeho špatný průchod přes buněčné membrány [85]. BRACO-19 by také bylo možné využít jako činidlo proti HIV. Při virologických testech bylo prokázáno, že BRACO-19 zastavuje reverzní transkripci viru tak, že ligand pravděpodobně stabilizuje G-kvadruplexy na 3' konci RNA viru, a tím inhibuje proces reverzní transkripce [86].



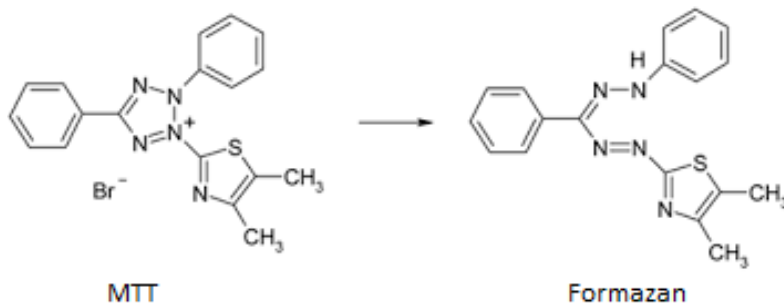
Obrázek 9 Možnosti interakce ligandů s G-kvadruplexy (převzato a upraveno dle [87])

3.4 Testy viability

Životaschopnost (viabilita) buněk je definována jako počet zdravých buněk ve vzorku a způsoby stanovení životaschopnosti buněk se obecně používají pro testování léků. Existuje řada metod, které jsou založeny na různých buněčných funkcích, jako je enzymová aktivita, permeabilita buněčné membrány, buněčná adherence, produkce ATP nebo produkce koenzymů [88]. Jedním z nejjednodušších způsobů je test, který je založen na vylučování barviva trypanové modři. Zatímco živé buňky tuto látku skrze membrány nepřijímají a nebarví se, tak u mrtvých buněk je situace odlišná. Díky porušené integritě membrán mrtvých buněk dochází k pronikání barviva do buněk. Tímto se mrtvé buňky nabarví a je možné je rozlišit od živých buněk. Buňky jsou po obarvení spočítány za využití mikroskopu [89].

3.4.1 Tetrazoliové sloučeniny

Kvantitativní kolorimetrický test s použitím tetrazoliové soli byl poprvé popsán roku 1983 Timem Mossmannem [90]. A dnes patří mezi nejznámější a nejpoužívanější testy životaschopnosti buněk. Tetrazoliová sůl MTT, celým názvem 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid, je nažloutlý vodný roztok, který po redukci dehydrogenasami a redukčními činidly přítomnými v metabolicky aktivních buňkách poskytuje ve vodě nerozpustný fialovomodrý formazan (Obrázek 10). Formazan může být rozpuštěn organickými rozpouštědly a stanoven spektrofotometricky, přičemž se předpokládá, že množství MTT formazanu je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk [91]. Přeměna MTT na formazan je zprostředkována enzymem, který se nachází v mitochondriích a jedná se konkrétně o sukcinátdehydrogenasu [92].



Obrázek 10 Struktura MTT a formazanu a jejich přeměna probíhající v metabolicky aktivních buňkách (převzato a upraveno dle [93])

Ačkoliv je tato metoda široce používána k hodnocení cytotoxicity, nemusí být zcela přesná [94]. Také nebyla zatím objasněna přesná lokalizace redukovaného formazanu v buňkách. Při mikroskopické analýze lokalizace MTT formazanu v HeLa buňkách pomocí selektivních fluorescenčních sond bylo zjištěno, že krystaly formazanu nebyly lokalizovány v mitochondriích, jak se předpokládalo, ale v lipidových kapénkách [91].

Použití MTT je také spojeno s některými nevýhodami, jako je použití velkého množství dimethylsulfoxidu (DMSO), který se používá k rozpouštění krystalků formazanu. DMSO je dráždivý a negativně působí na laboratorní vybavení. Další nevýhodou MTT je, že není metabolizován některými buněčnými liniemi. Tyto důvody vedly k vývoji jiných alternativních metabolicky aktivních barviv, tedy barviv, která se po metabolizaci mění na detekovatelnou barevnou formu. Jedním z nich je XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), který byl poprvé popsán v roce 1988. Na rozdíl od MTT se XTT

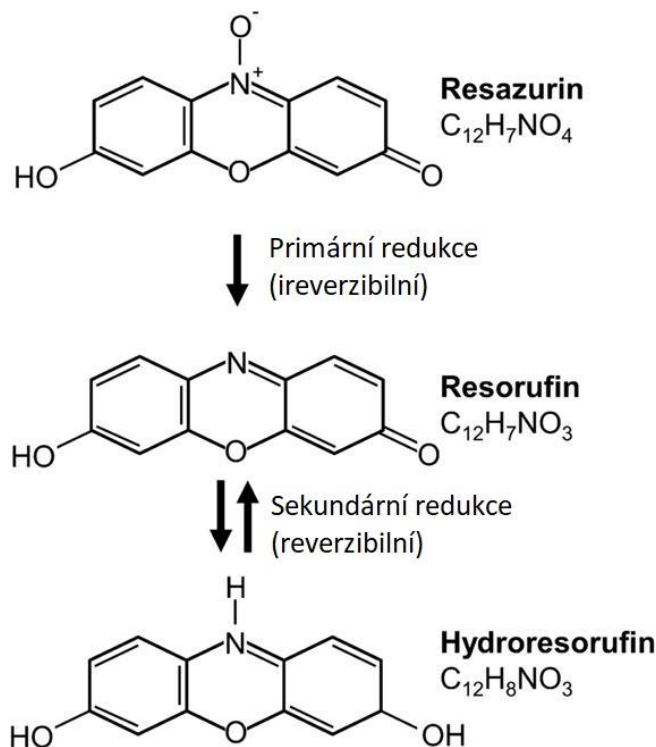
metabolizuje v živých buňkách na ve vodě rozpustný XTT formazan, tím se eliminuje krok solubilizace a je umožněno přímé měření absorbance. Jeho nevýhodou je však jeho omezené použití, protože většina lidských nádorových buněčných linií metabolizovala XTT méně účinně než MTT. Účinnost však může být zvýšena přidáním dalších složek, například fenazin methosulfátem (PMS) [95].

Dalším příkladem tetrazoliové soli používaným k testům viability je MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium). V tomto případě je také z tetrazoliové soli MTS tvořen ve vodě rozpustný odpovídající formazan a odpadá tedy proces solubilizace krystalků. Pro zvýšení účinnosti lze stejně jako u XTT použít intermediární akceptor elektronů PMS, ale v kombinaci s MTS je směs více stabilní a test dává přesnější výsledky [96].

Posledním typem jsou WST deriváty – WST-1 a WST-8. WST-1 (4-[3-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát sodná sůl), který se kromě testů buněčné proliferace používá také jako citlivý chromogenní indikátor NADH. Produktem reakce je ve vodě rozpustný derivát formazanu, který je rozpustný ve vodě v koncentracích vyšších než 0,1 M [97]. V porovnání WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium monosodná sůl) je však považován za citlivější než WST-1 nebo XTT, má nízké hodnoty pozadí a žádný cytotoxický účinek. Oba však kvůli negativním sulfonovaným skupinám vyžadují přítomnost intermediárního akceptoru elektronů PMS [98].

3.4.2 Resazurin

Od roku 1993 je k testům viability možné používat barvivo resazurin prodávané pod jménem Alamar blue (AB). Jedná se o nejrychlejší a nejjednodušší test, který má tu výhodu, že se může měřit kolorimetricky i fluorimetricky, ačkoliv větší citlivosti je dosaženo při fluorimetrickém



Obrázek 11 Kroky přeměny resazurinu na resorufin a hydroresorufin (převzato a upraveno dle [100])

měření. Alamar blue je pro buňky netoxický a pro měření není vyžadováno usmrcení buněk jako u MTT testu a buňky tedy mohou být použity pro další experimenty [99]. Pomocí buněčné aktivity dochází k redukci modrého a nefluorescenčního resazurinu na růžové fluorescenční barvivo resorufin a toto barvivo je uvolňováno z buněk. Tato reakce je zprostředkována intracelulárními enzymy a výsledkem je silný fluorescenční signál. Primární redukce resazurinu na resorufin je ireverzibilní, ale může následně vznikat ještě vedlejší produkt ze sekundární reakce, která vyčerpává resorufin za vzniku bezbarvého a nefluorescenčního hydrorufinu (Obrázek 11). To může způsobit nepřesný výsledek testu [100].

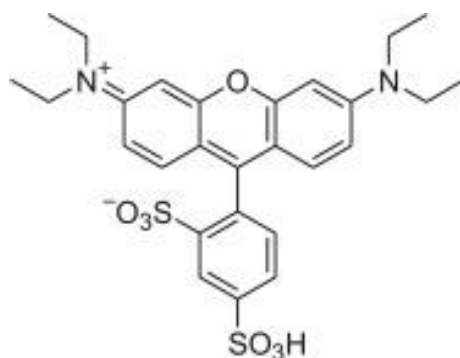
3.4.3 ATP-bioluminiscenční test

Intracelulární obsah ATP je důležitým indikátorem životaschopnosti buněk. Při buněčné smrti je syntéza ATP velmi rychle zastavena, avšak hydrolyza může ještě nějakou dobu pokračovat. Proto intracelulární obsah ATP velmi rychle klesá. Existují různé metody na stanovení koncentrace ATP, ale bioluminiscenční test je považován za nejcitlivější. Jsou založeny na tom, že ATP je nezbytným substrátem enzymu luciferasy světlušek. Enzym luciferasa zajišťuje oxidaci luciferinu v přítomnosti ATP a hořčnatých iontů na oxyluciferin při současné tvorbě pyrofosfátu a AMP. Oxyluciferin je produkován v excitovaném stavu a při přechodu na základní hladinu je emitována energie ve formě světla. Intracelulární ATP je však pro enzym nepřístupný, protože enzym neproniká do buněk a je tedy nutné předem zvýšit permeabilitu nebo indukovat rozrušení buněčné membrány k uvolnění ATP [101].

3.4.4 Sulforhodamine B

V roce 1990 byl vyvinut nový způsob na měření obsahu buněčných proteinů u adherentních nebo suspenzních kultur. Sulforhodamine B (SRB) je růžové aminoxantenové barvivo se dvěma sulfonovými skupinami, které se vážou na bazické aminokyselinové zbytky za mírně kyselých podmínek. Kolorimetrické vyhodnocení poskytuje odhad celkového obsahu proteinů, které souvisí s počtem buněk v kultuře. Citlivost tohoto testu je srovnatelná s fluorescenčními metodami barvení a často nahrazuje testy založené na tetrazoliových sloučeninách. Barvení pomocí SRB (Obrázek 12) se široce používá pro testování toxicity léků proti různým nádorovým i nenádorovým buněčným liniím [102, 103].

Proces barvení pomocí SRB vyžaduje nejprve opatrnou fixaci kultury kyselinou trichloroctovou tak, aby nedošlo k uvolnění buněk předtím, než se zafixují. K následnému barvení se používá SRB v 1% roztoku kyseliny octové k zajištění mírně kyselých podmínek. K solubilizaci se používá Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) [103].



Obrázek 12 Chemická struktura barviva Sulforhodaminu B (převzato z [104])

4 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma diplomové práce
2. Kultivace nádorové a nenádorové buněčné linie
3. Testování viability buněčných linií po působení vybraných chemoterapeutik a ligandů interagujících s G-kvadruplexy
4. Detekce apoptózy a nekrózy
5. Studium lokalizace chemických látek v buňkách pomocí konfokální mikroskopie

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál

5.1.1 Použité chemikálie

Annexin V Apoptosis Detection Kit (Santa Cruz Biotechnology)

DMEM High Glucose (Biosera)

DMSO (Sigma-Aldrich)

Fetální bovinní sérum (Biosera)

Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific)

Kyselina octová (Lachner)

Methanol (Penta)

Penicilin/Streptomycin (PAA Laboratories)

Sulforhodamine B Cell Cytotoxicity Assay Kit (Abcam)

Trypsin-EDTA (Biosera)

5.1.2 Použité roztoky a média

10 x PBS (1 l):

- Složení: 80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g Na₂HPO₄ + 2,4 g KH₂PO₄ + Milli-Q voda
- Příprava pracovní koncentrace (1x): smíchání 100 ml 10x PBS a 900 ml Milli-Q vody

Kultivační médium:

- 500 ml DMEM High Glucose + 50 ml fetálního bovinního séra + 5 ml antibiotik Penicilin/Streptomycin

5.1.3 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy XS105 (METTLER TOLEDO)

Automatické pipety (VWR)

Bürkerova komůrka

ELISA reader Synergy H1 Hybrid Multi-mode Reader (BioTek)

Inverzní fluorescenční mikroskop IX83 (Olympus)

Konfokální mikroskop Leica TCS SP5 (Leica)

Kultivační nádoby o objemu 75 cm² (TPP)

Inkubátor (Mettler)

Inverzní mikroskop AE30 (Motic)

Laminární box (Telstar)

NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Marshall Scientific)

Pipety jednorázové 5, 10, 25 ml (TPP)

Spektrofluorimetr PC1 Photon Counting (ISS)

Spektrofotometr Specord 210 Plus (Analytik Jena)

Třepačka Orbital shaker OS-10 (Biosan)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

8 jamkové destičky (PAA Laboratories)

96 jamkové destičky (TPP)

5.1.4 Buněčné linie

MCF7 – jedná se o nádorovou buněčnou linii karcinomu prsu izolovanou v roce 1970, buněčná linie si zachovává vlastnosti podobné epitelu mléčné žlázy a při nárůstu tvoří monovrstvu buněk, obsahuje estrogenové a progesteronové receptory [105]

HEK293FT – nenádorová buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buněk, buňky byly transfekovány imortalizovaným adenovirem a velkým T antigenem simian viru 40, buněčná linie se používá k produkci mnoha virových vektorů [105]

Buněčné linie MCF7 a HEK293FT byly poskytnuty Biofyzikálním ústavem Akademie věd ČR v Brně.

5.1.5 Chemoterapeutika a ligandy interagující s G-kvadruplexy

Berberin (Sigma-Aldrich)

BRACO-19 (Sigma-Aldrich)

Cisplatina (Sigma-Aldrich)

Doxorubicin (Sigma-Aldrich)

PIPER (EMD Millipore)

Roskovitin (Sigma-Aldrich)

TMPyP (Sigma-Aldrich)

5-Fluorouracil (Duchefa Biochemie)

5.2 Metody

5.2.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie MCF7 a HEK293FT byly kultivovány v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). Přibližně jednou týdně probíhalo pasážování buněk v závislosti na typu buněčné linie a rychlosti jejího růstu. Během pasážování se nejprve z kultivační láhve odsálo staré médium a buňky přichycené na dně kultivační nádoby byly opláchnuty roztokem PBS. Následně bylo PBS odsáto a do kultivační nádoby byl přidán trypsin, který buňky uvolnil od povrchu kultivační nádoby. Trypsin se nechal působit 5 minut a jeho působení bylo následně zastaveno přidáním kultivačního média DMEM High Glucose obohaceného o fetální bovinní sérum a antibiotika penicilin a streptomycin. Poté byly buňky s médiem přeneseny do falkony a 5 µl suspenze se nanalo na Bürkerovu komůrku. Bürkerova komůrka je speciální podložní sklíčko obsahující mřížku tvořící políčka s definovanou velikostí. Pomocí Bürkerovy komůrky se počítala koncentrace buněk v médiu a z tohoto zjištěného údaje se počítal potřebný objem pro vysetí dostatečného počtu buněk do čerstvého média. Komůrka se suspenzí a přikrytá krycím sklíčkem se umístila na inverzní mikroskop a počítal se počet buněk v deseti čtvercích včetně buněk dotýkajících se horní a levé strany čtverce (nebo dolní a pravé strany). Z průměrné koncentrace buněk v jednom čtverci byla vypočtena koncentrace buněk v 1 ml suspenze, kdy jedna buňka ve čtverci odpovídá 250 000 buněk/1 ml suspenze. Následně bylo odpovídající množství vyseto do nové kultivační nádoby obsahující 10 ml čerstvého kultivačního média.

Tabulka 1 Příprava vybraných koncentrací cytostatik pro testy viability

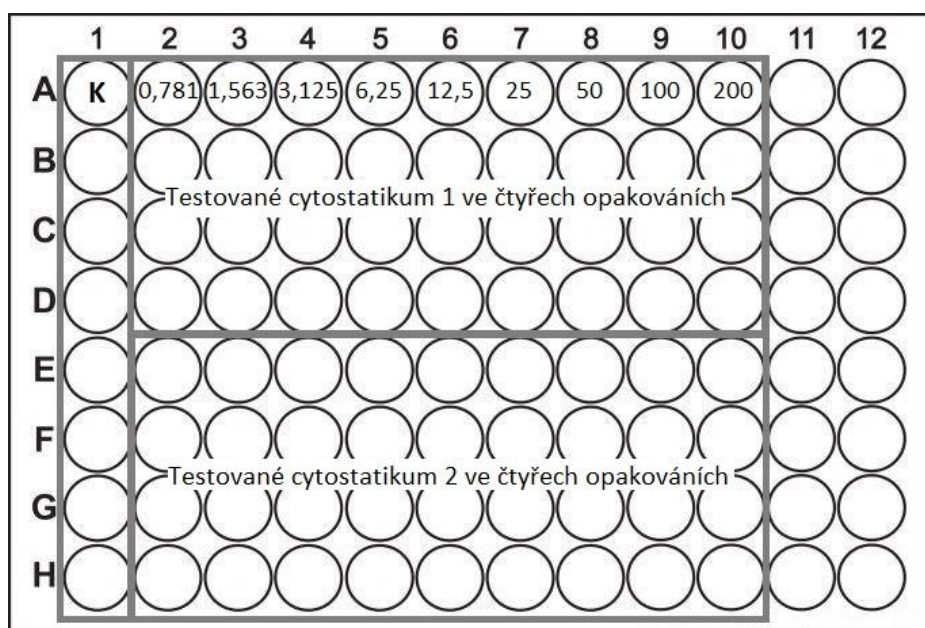
Pozice na 96 jamkové destičce	Ředění		Koncentrace zásobního roztoku (mM)	Koncentrace cytostatika v jamce (μM)
	Cytostatikum (μl)	Rozpouštědlo (μl)		
1	0	20	0	0
2	20 (↓)	20	0,039	0,781
3	20 (↓)	20	0,078	1,563
4	20 (↓)	20	0,156	3,125
5	20 (↓)	20	0,313	6,250
6	20 (↓)	20	0,625	12,500
7	20 (↓)	20	1,250	25,000
8	20 (↓)	20	2,500	50,000
9	20 (↓)	20	5,000	100,000
10	40	0	10,000	200,000

5.2.2 Testy viability

Pro testy viability byla použita 96 jamková destička, na kterou bylo vyseto potřebné množství buněk ve 200 μl kultivačního média. Potřebný počet buněk byl zjištěn pomocí Bürkerovy komůrky a pro buněčnou linii MCF7 bylo vyseto 20 000 buněk na jamku a 5 000 buněk na jamku pro linii HEK293FT. Po vysetí buněk se nechala destička 24 hodin v inkubátoru za standardních podmínek. Po uplynutí této doby byly do jamek přidány 4 μl zásobní koncentrace cytostatika (0,039-10mM), a tím byla dosažena konečná koncentrace cytostatika v jamce 0,781-200μM. Použité koncentrace cytostatik jsou zobrazeny v Tabulce 1 a pipetovací schéma na Obrázku 13. Na testy viability byla použita čtyři chemoterapeutika (5-fluorouracil, roskovitín, doxorubicin, cisplatina) a čtyři ligandy interagující s G-kvadruplexy (berberin, TMPyP4, PIPER, BRACO-19). Souhrn rozpouštědel k jednotlivým cytostatikům je shrnut v Tabulce 2. Doba působení cytostatika byla 48 hodin, během které byla kultivační destička umístěna v inkubátoru, a poté proběhlo vyhodnocení testu pomocí kitu využívajícího sulforhodaminu B. Nejprve bylo přidáno 50 μl fixačního roztoku, aniž by se předem odstranilo z jamek médium. Poté se destička nechala kultivovat jednu hodinu při 4 °C. Následně se odstranil obsah buněk a třikrát se jamky promyly 200 μl destilované vody. Obarvení buněk bylo provedeno pomocí SRB roztoku, jehož působení probíhalo po dobu 15 minut, ve tmě a při pokojové teplotě. Následně se barvivo odstranilo a buňky byly čtyřikrát promyty pomocí 200 μl Promývacího roztoku. Nakonec bylo přidáno do každé jamky stejné množství Solubilizačního roztoku a destička byla umístěna na třepáčku po dobu 10 minut. Absorbance byla změřena na ELISA readeru při 565 nm. Výsledky byly následně zpracovány v softwaru GraphPad Prism, ve kterém byla vypočtena i hodnota střední inhibiční koncentrace (IC₅₀).

5.2.3 Měření absorpčních a emisních spekter

Měření absorpčních a emisních spekter bylo provedeno u ligandů interagujících s G-kvadruplexy – berberin, TMPyP, PIPER a BRACO-19. Zkoumaná látka byla nejprve naředěna a následně byla změřena její absorbance na spektrofotometru. Tím byla zjištěna



Obrázek 13 Systém nanášení dvou různých cytostatik na kultivační destičku; K – kontrola (rozpuštědlo dle zvoleného cytostatika); sloupce 2-10 – koncentrace cytostatik uvedené v μM připravené podle Tabulky 1; (templát 96 jamkové destičky byl převzat a upraven dle [123])

Tabulka 2 Shrnutí použitých rozpouštědel k přípravě jednotlivých cytostatik

Chemoterapeutikum	Rozpouštědlo
5-Fluorouracil	100% DMSO
Roskovitin	100% DMSO
Doxorubicin	100% DMSO
Cisplatina	0,1 M chloristan sodný
G4 ligand	Rozpouštědlo
Berberin	100% methanol
TMPyP	destilovaná voda
PIPER	5% kyselina octová
BRACO-19	destilovaná voda

excitační vlnová délka potřebná pro změření emisního spektra. Následně byl s pomocí nanodropu ligand opětovně naředěn tak, aby jeho absorbance v bodě maxima byla nižší než 0,01. Poté mohlo být změřeno emisní spektrum ligandu na spektrofotometru. Spektra byla porovnávána se spektry barviv Hoechst 33342, annexin V (FITC) a propidium jodid, aby se zjistilo, zda je možné použít tyto ligandy k detekci apoptózy a nekrózy a k lokalizaci ligandu interagujícího s G-kvadruplexy v buňkách. Spektra barviv byla zjištěna na stránkách Thermo Fisher Scientific.

5.2.4 Detekce apoptózy a nekrózy

K detekci apoptózy a nekrózy byla použita 96 jamková destička a příprava experimentu byla stejná jako u testů viability. Na destičku byly vysety buňky (20 000 pro linii MCF7, 5 000 buněk pro linii HEK293FT) ve 200 μl kultivačního média. Destička se nechala kultivovat po dobu 24 hodin v inkubátoru a následně proběhlo ošetření pomocí ligandů interagujících

s G-kvadrupelexy (TMPyP, BRACO-19) a chemoterapeutika roskovitin. Použité koncentrace a způsob nanášení na kultivační destičku je popsán v Kapitole 5.2.2. Ligandy se nechaly působit po dobu 48 hodin, během kterých byla destička umístěna v inkubátoru. Po uplynutí této doby proběhlo vyhodnocení pomocí kitu na detekci apoptózy a barviva Hoechst 33342. Annexin V Apoptosis Detection Kit obsahuje propidium jodid pro obarvení nekrotických buněk a annexin V pro obarvení apoptických buněk a barvivo Hoechst je schopné obarvit jádra ve všech buňkách, tedy živých, apoptických i nekrotických. Vyhodnocení probíhalo tak, že nejprve bylo odsáto médium z jamek a buňky byly propláchnuty v PBS a následně pomocí roztoku Assay Buffer. Poté bylo do každé jamky přidáno 200 μ l Assay Bufferu. Následně byla do každé jamky postupně napipetována tři zmíněná fluorescenční barviva, a to v objemech - 50 μ l pro Hoechst (připraven ze zásobního roztoku 291 μ l/14 ml PBS), 10 μ l pro propidium jodid a 1 μ l annexinu V. Nakonec se destička nechala inkubovat 15 minut ve tmě při pokojové teplotě a následně byla pozorována pod fluorescenčním mikroskopem.

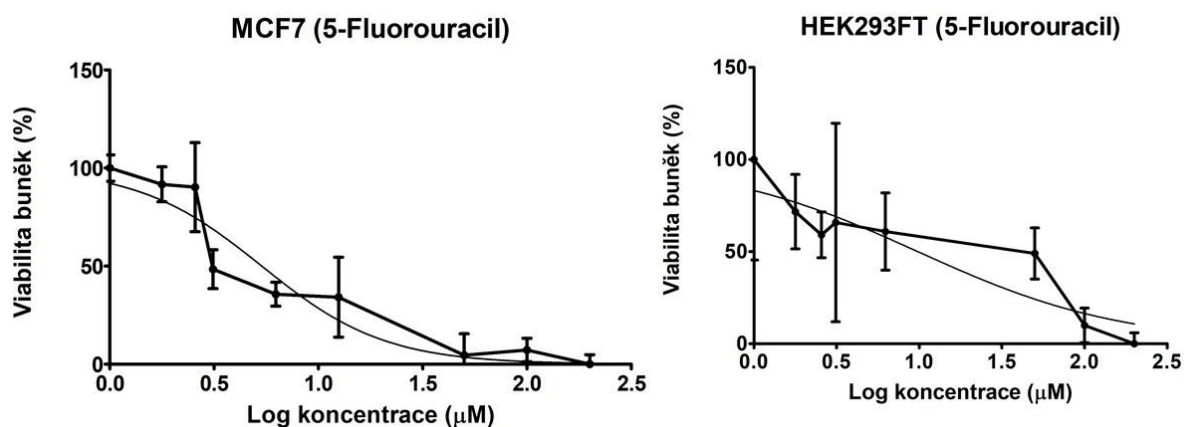
5.2.5 Studium lokalizace cytostatika v buňkách

Pro studium lokalizace cytostatika v buňkách byly použity 8 jamkové destičky. Na destičku byly vysety buňky buněčné linie MCF7, a to v koncentraci 30 000 buněk na jamku v 300 μ l kultivačního média. Destička s vysetými buňkami se nechala kultivovat 24 hodin a následně proběhlo ošetření pomocí ligandů interagujících s G-kvadrupelexy – berberin, TMPyP, PIPER, BRACO-19. Každá testovaná látka byla přidána do jamek v koncentracích odpovídajících IC_{10} , IC_{50} , IC_{90} naměřených při testech viability pro berberin v předchozím experimentu a konečné koncentrace cytostatika v jamce byly tedy 1,5 μ M, 12,5 μ M, 50 μ M. Jedna jamka v každé řadě sloužila jako kontrola, ke které se přidalo pouze rozpouštědlo. Po ošetření ligandy se destička nechala kultivovat v inkubátoru a pod konfokálním mikroskopem byla pozorována po 24 a 48 hodinách. Pro lepší zobrazení byla jádra buněk před pozorováním obarvena pomocí barviva Hoechst 33342, kterého se po naředění v PBS (291 μ l Hoechst/14 ml PBS) přidalo 50 μ l na jamku.

6 VÝSLEDKY

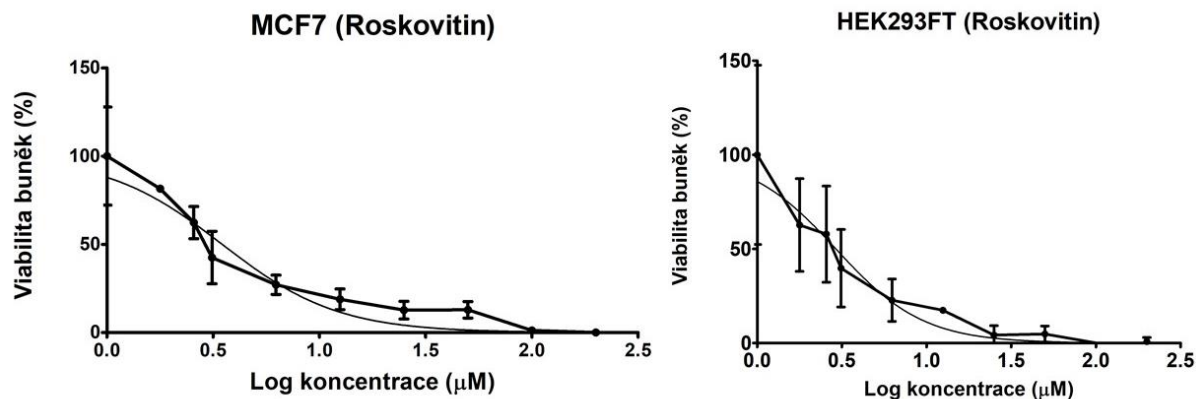
6.1 Testování viability a stanovení IC₅₀

K testům viability byla použita komerční a prostudovaná chemoterapeutika (5-fluorouracil, roskovitin, doxorubicin, cisplatina) a jejich cytotoxicita byla porovnána s cytotoxicitou ligandů interagujících s G-kvadruplexy (berberin, TMPyP, PIPER, BRACO-19). Na testování cytotoxicity byla použita nádorová buněčná linie MCF7 a nenádorová buněčná linie HEK293FT. Použité koncentrace chemoterapeutik a ligandů jsou uvedené v tabulce v kapitole 5.2.2. Testování bylo provedeno ve čtyřech opakováních. Stanovení cytotoxicity bylo provedeno po 48 hodinách pomocí kitu využívajícího Sulforhodamine B. Zpracování dat včetně zjištění hodnoty IC₅₀ bylo provedeno pomocí softwaru GraphPad Prism. Na následujících obrázcích je graficky znázorněno působení jednotlivých chemoterapeutik (Obrázky 14-17) a ligandů interagujících s G-kvadruplexy (Obrázky 18-21).



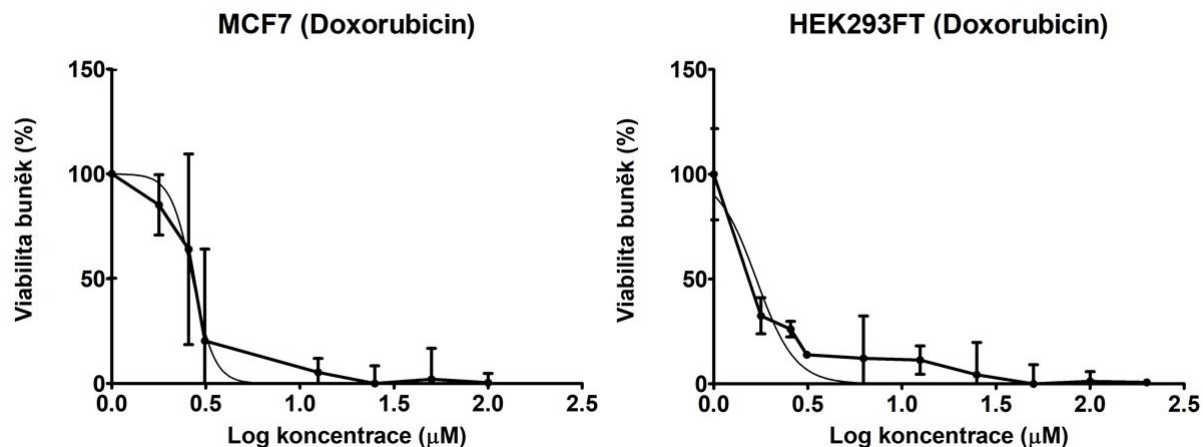
Obrázek 14 Graf znázorňující působení 5-fluorouracilu na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

Na Obrázku 14 je zobrazen vliv chemoterapeutika 5-fluorouracilu na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo). Z grafů je vidět, že na buněčnou linii MCF7 5-fluorouracil má cytotoxický účinek i při nižších koncentracích, kdežto u buněčné linie HEK293FT je silnější cytotoxický efekt pozorován až ve vyšší koncentraci testované látky.



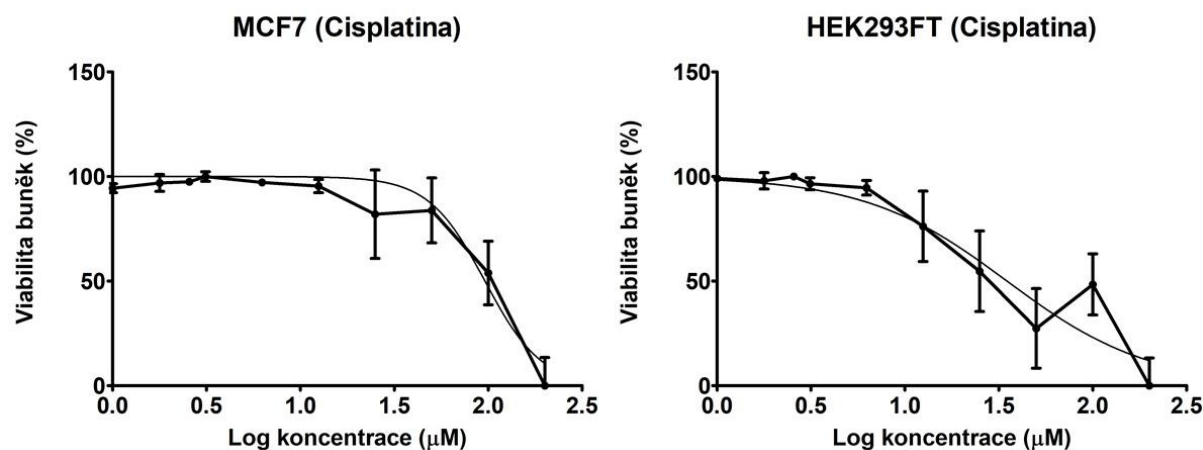
Obrázek 15 Graf znázorňující působení roskovitinu na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

Působení chemoterapeutika roskovitinu na buněčné linie MCF7 a HEK293FT je zobrazeno na Obrázku 15. Z grafů není patrné, na kterou buněčnou linii má roskovitin větší cytotoxické účinky, ale podle hodnot IC_{50} zobrazených v Tabulce 3 měl roskovitin mírně větší cytotoxické účinky na nenádorovou buněčnou linii.



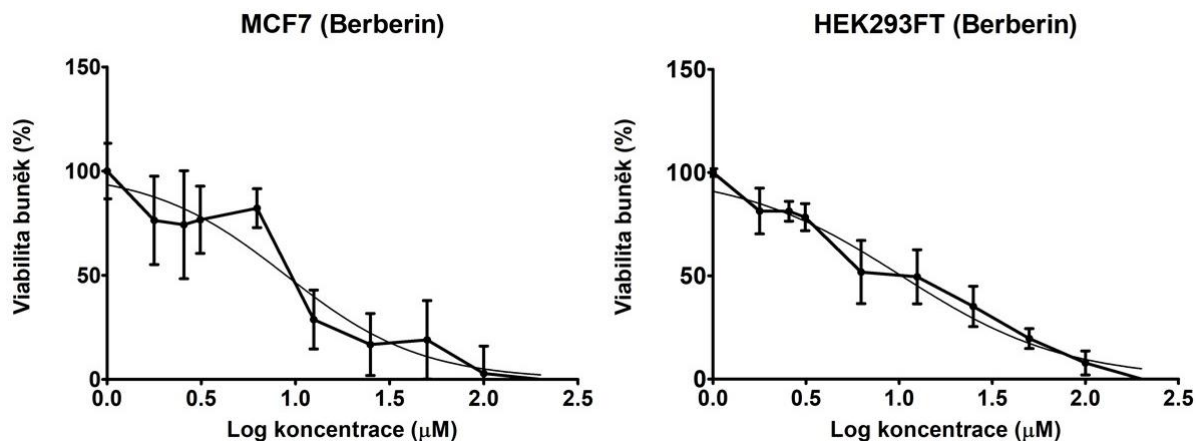
Obrázek 16 Graf znázorňující působení doxorubicinu na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

Doxorubicin a jeho vliv na vybrané buněčné linie je zobrazen na Obrázku 16. Z grafů je patrné, že doxorubicin má mírně větší cytotoxické účinky na buněčnou linii HEK293FT, kdy jeho cytotoxický účinek lze pozorovat již při koncentraci $0,781\mu\text{M}$, tedy nejnižší testované koncentraci.



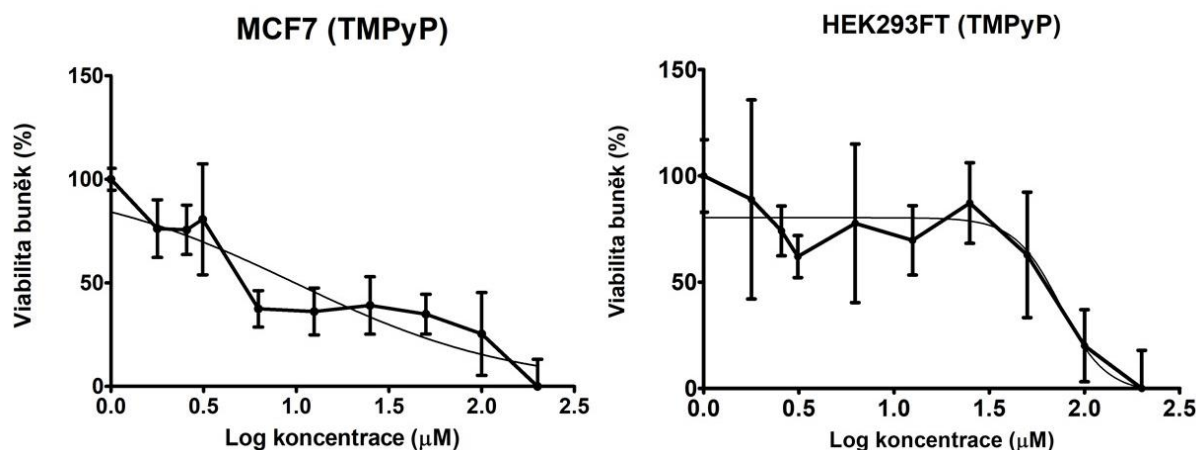
Obrázek 17 Graf znázorňující působení cisplatiny na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

Posledním studovaným chemoterapeutikem byla cisplatina. Její působení na nádorovou a nenádorovou buněčnou linii je zobrazeno na Obrázku 17. Z grafů vyplývá, že cisplatina má z vybraných chemoterapeutik nejmenší cytotoxické účinky (Obrázky 14-17). Mezi viabilitou buněk u buněčných linií po ošetření cisplatinou není vidět rozdíl u nízkých koncentrací chemoterapeutika, u vyšších koncentracích však cisplatina působila více cytotoxicky na buněčnou linii HEK293FT.



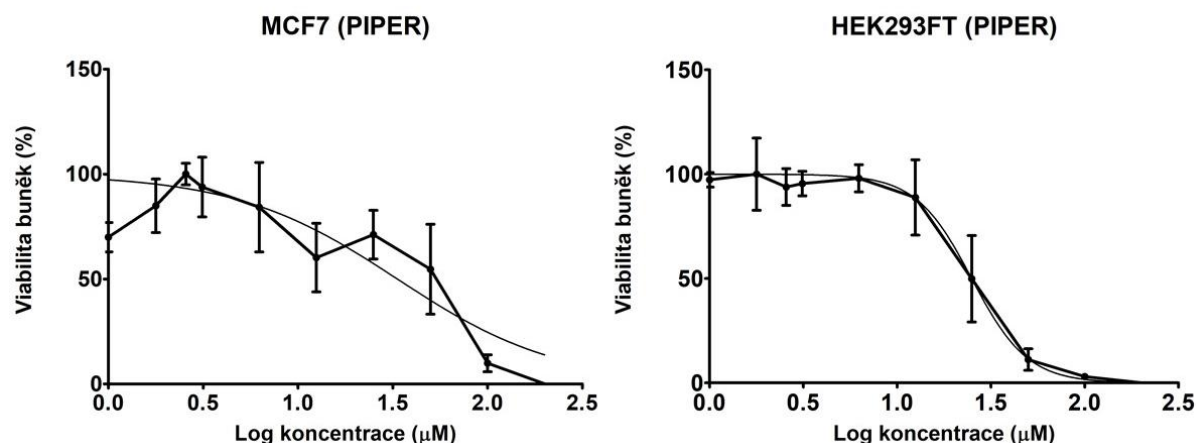
Obrázek 18 Graf znázorňující působení G4 ligandu berberinu na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

Na Obrázku 18 je zobrazen vliv ligandu berberinu na buněčné linie MCF7 a HEK293FT. Z výsledků není patrné, na kterou linii bylo působení tohoto ligandu výraznější, ale podle hodnot IC_{50} shrnutých v Tabulce 3 vyplývá, že berberin měl mírně výraznější inhibiční účinek na nádorovou buněčnou linii MCF7.



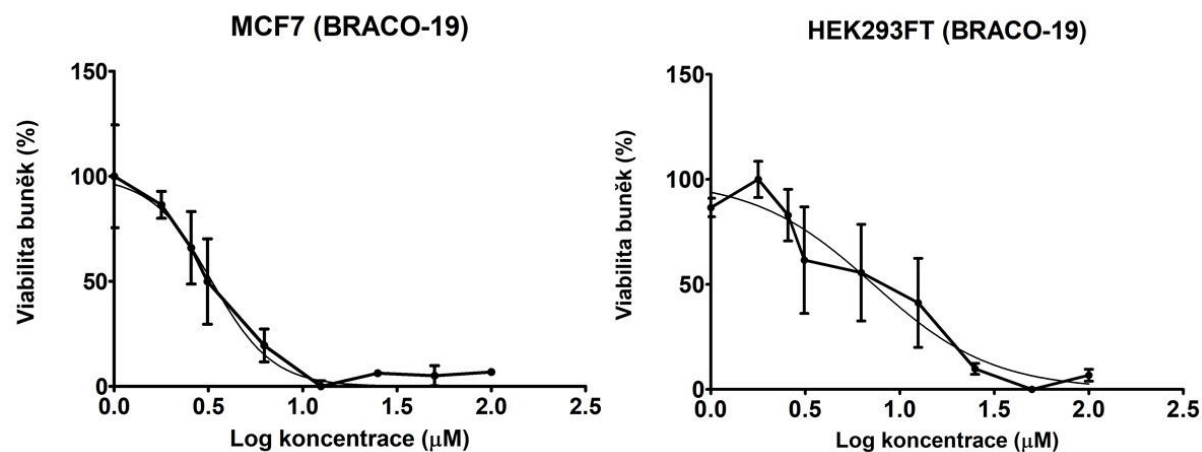
Obrázek 19 Graf znázorňující působení G4 ligandu TMPyP na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

Dalším testovaným ligandem interagujícím s G-kvadruplexy byl TMPyP, jehož vliv na buněčné linie je zobrazen na Obrázku 19. Z grafů vyplývá, že tento ligand měl větší inhibiční účinek na nádorovou linii MCF7 a viabilita buněk se snižovala již od nejnižších koncentrací TMPyP. U nenádorové buněčné linie lze pozorovat snižování viability buněk až u vyšších koncentrací ligandu, přibližně od koncentrace $25\mu\text{M}$.



Obrázek 20 Graf znázorňující působení G4 ligandu PIPER na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

PIPER byl dalším testovaným ligandem interagujícím s G-kvadruplexy a jeho vliv na vybrané buněčné linie je zobrazen na Obrázku 20. Z hodnot lze zjistit, že jeho cytotoxický účinek byl menší v porovnání s ostatními použitými ligandy. Rozdíl v působení tohoto ligandu na jednotlivé buněčné linie není výrazný, ale mírně větší inhibiční vliv měl na nádorovou buněčnou linii MCF7.



Obrázek 21 Graf znázorňující působení G4 ligandu BRACO-19 na nádorovou buněčnou linii MCF7 (vlevo) a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT (vpravo)

Na Obrázku 21 je zobrazeno působení posledního testovaného ligandu interagujícího s G-kvadruplexy BRACO 19. Z výsledků je patrné, že tento ligand má větší cytotoxický účinek na nádorovou buněčnou linii MCF7, kdy už při jeho koncentraci 12,5 μ M je viabilita buněk téměř nulová. Z výsledků také vyplývá, že působil ze všech zkoumaných ligandů interagujících s G-kvadruplexy na buňky nejvíce cytotoxicky.

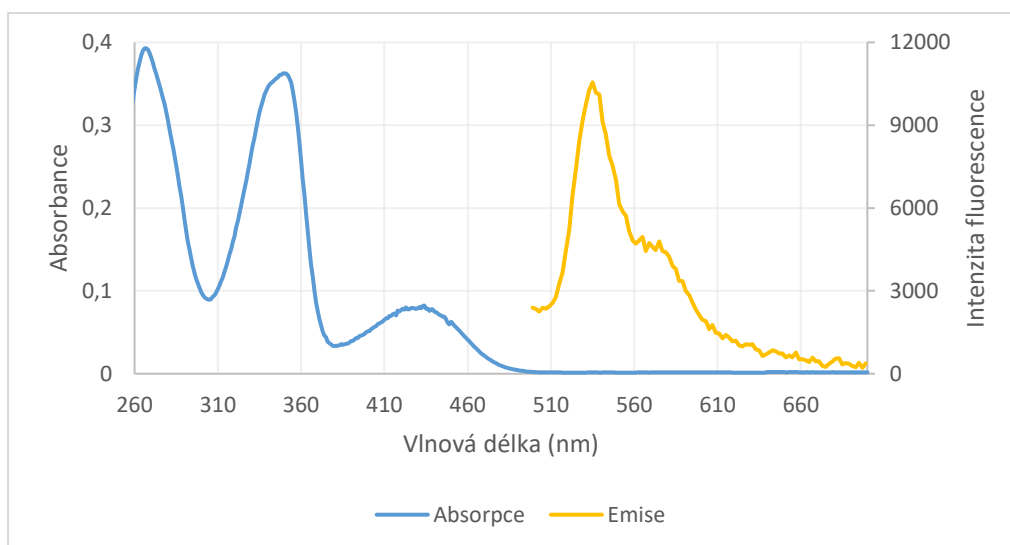
Tabulka 3 Shrnutí středních inhibičních koncentrací vybraných chemoterapeutik a ligandů interagujících s G-kvadruplexy

Chemoterapeutikum	IC ₅₀ (μM)	
	MCF7	HEK293FT
5-Fluorouracil	5,356	9,808
Roskovitin	3,486	2,916
Doxorubicin	2,690	0,684
Cisplatina	96,050	34,990
G4 ligand		
Berberin	8,907	10,280
TmPyP	9,812	35,840
PIPER	33,460	24,970
BRACO-19	3,294	7,246

V Tabulce 3 je zobrazeno shrnutí hodnot IC₅₀ všech zkoumaných látek. Ze čtyř testovaných chemoterapeutik měl největší cytotoxické účinky na buněčné linie doxorubicin a nejnižší cisplatina, u které byl také pozorován výrazný rozdíl mezi vlivem na nádorovou a nenádorovou buněčnou linii. Zároveň však jediným chemoterapeutikem, které mělo po 48 hodinách působení větší cytotoxický vliv na nádorovou buněčnou linii než na nenádorovou linii, byl 5-fluorouracil. U ligandů interagujících s G-kvadruplexy bylo nejvíce cytotoxické BRACO-19 a nejmenší cytotoxicita byla pozorována u látky PIPER. Oproti testovaným chemoterapeutikům měly tři ze čtyř ligandů větší inhibiční účinek na nádorovou buněčnou linii než na nenádorovou, jediný PIPER působil méně cytotoxicky na buňky MCF7. Přičemž u látky TMPyP byl tento rozdíl mezi buněčnými liniemi nejvýraznější. Mezi chemoterapeutiky a ligandy interagující s G-kvadruplexy není vidět výrazný rozdíl při porovnání hodnot IC₅₀ a hodnoty střední inhibiční koncentrace všech testovaných ligandů se pohybují mezi nejúčinnějším a nejméně účinným chemoterapeutikem.

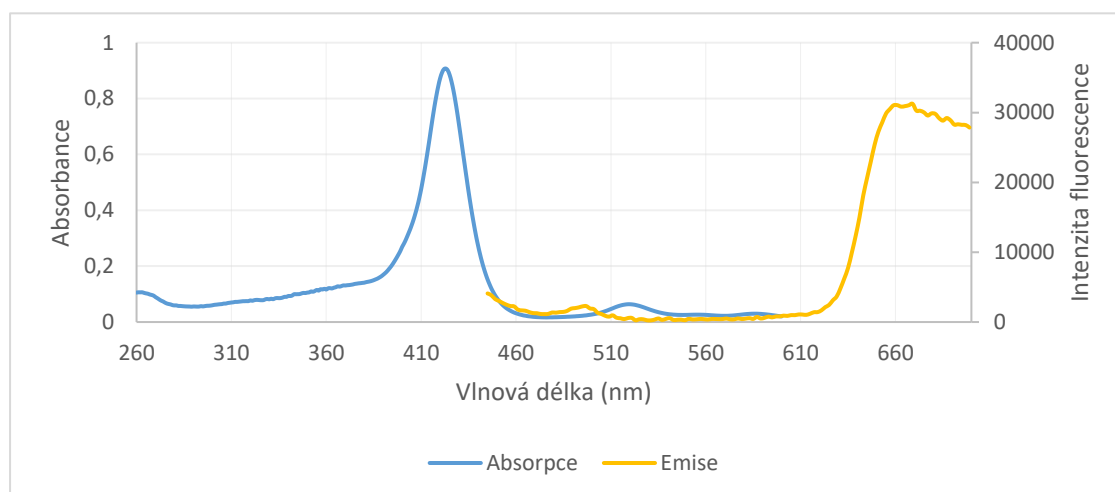
6.2 Absorpční a emisní spektra ligandů interagujících s G-kvadruplexy

U všech ligandů interagujících s G-kvadruplexy byla změřena absorpční a emisní spektra. Absorpční spektra byla změřena na spektrofotometru a díky nim byla zjištěna excitační vlnová délka potřebná ke změření emisních spekter. Ta byla následně změřena na spektrofluorimetru. Grafy kombinující absorpční a emisní spektra jednotlivých ligandů jsou zobrazeny na Obrázcích 22-25. Následně byla spektra porovnána se spektry barviv Hoechst 33342, annexin V (FITC) a propidium jodid, aby nedocházelo k překryvu při použití na jednom vzorku.



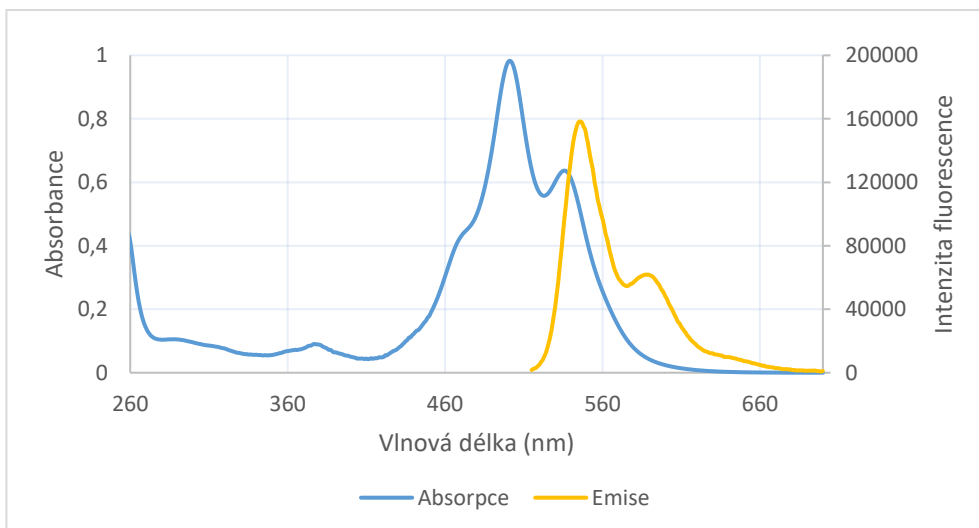
Obrázek 22 Absorpční spektrum (modrá) a emisní spektrum (žlutá) G4 ligandu berberinu

Z absorpčního a emisního spektra berberinu (Obrázek 22) bylo zjištěno, že tento ligand není vhodný pro detekci apoptózy a nekrózy z důvodu překryvu jeho spektra s barvivem sloužícím k obarvení apoptických buněk (Annexin V FITC). Lokalizace tohoto ligandu v buňkách pomocí konfokálního mikroskopu však byla možná, včetně použití barviva Hoechst 33342.



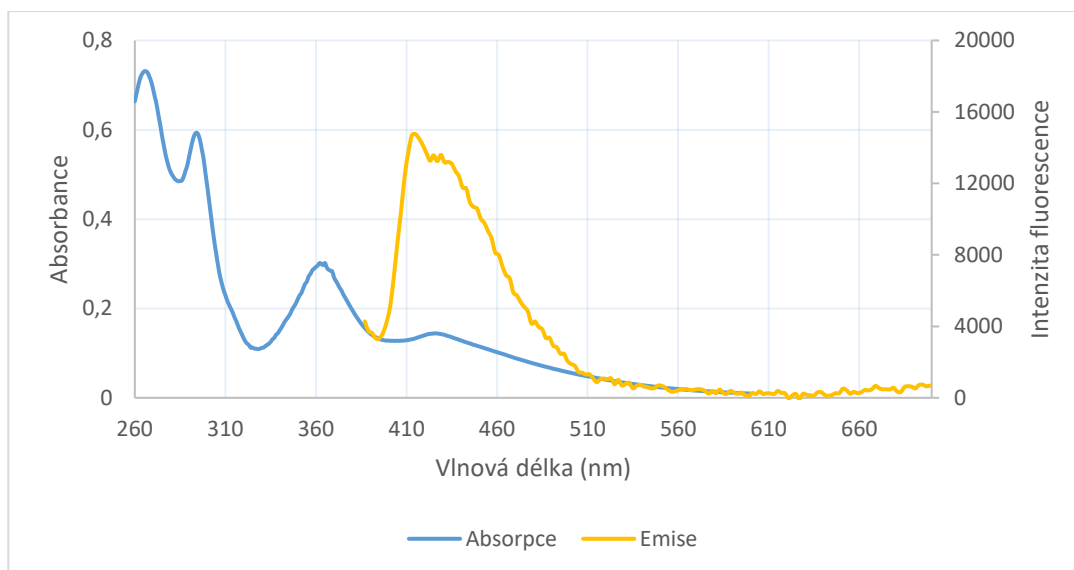
Obrázek 23 Absorpční spektrum (modrá) a emisní spektrum (žlutá) G4 ligandu TMPyP

Spektrum dalšího ligandu, interagujícího s G-kvadruplexy, TMPyP je zobrazeno na Obrázku 23. Tento ligand je vhodný pro testování detekce apoptózy a nekrózy i k lokalizaci ligandu v buňkách pomocí konfokálního mikroskopu, avšak bez použití barviva Hoechst kvůli překryvu absorpčního a emisního spektra.



Obrázek 24 Absorpční spektrum (modrá) a emisní spektrum (žlutá) G4 ligandu PIPER

Absorpční a emisní spektrum ligandu PIPER je zobrazeno na Obrázku 24. Spektrum se však překrývá se spektrem propidium jodidu, který slouží k obarvení nekrotických buněk. Proto tento ligand není vhodný na detekci apoptózy a nekrózy založené na použití tohoto barviva. Je však možné použít PIPER k testům jeho lokalizace v buňkách, a to zároveň s barvivem Hoechst.



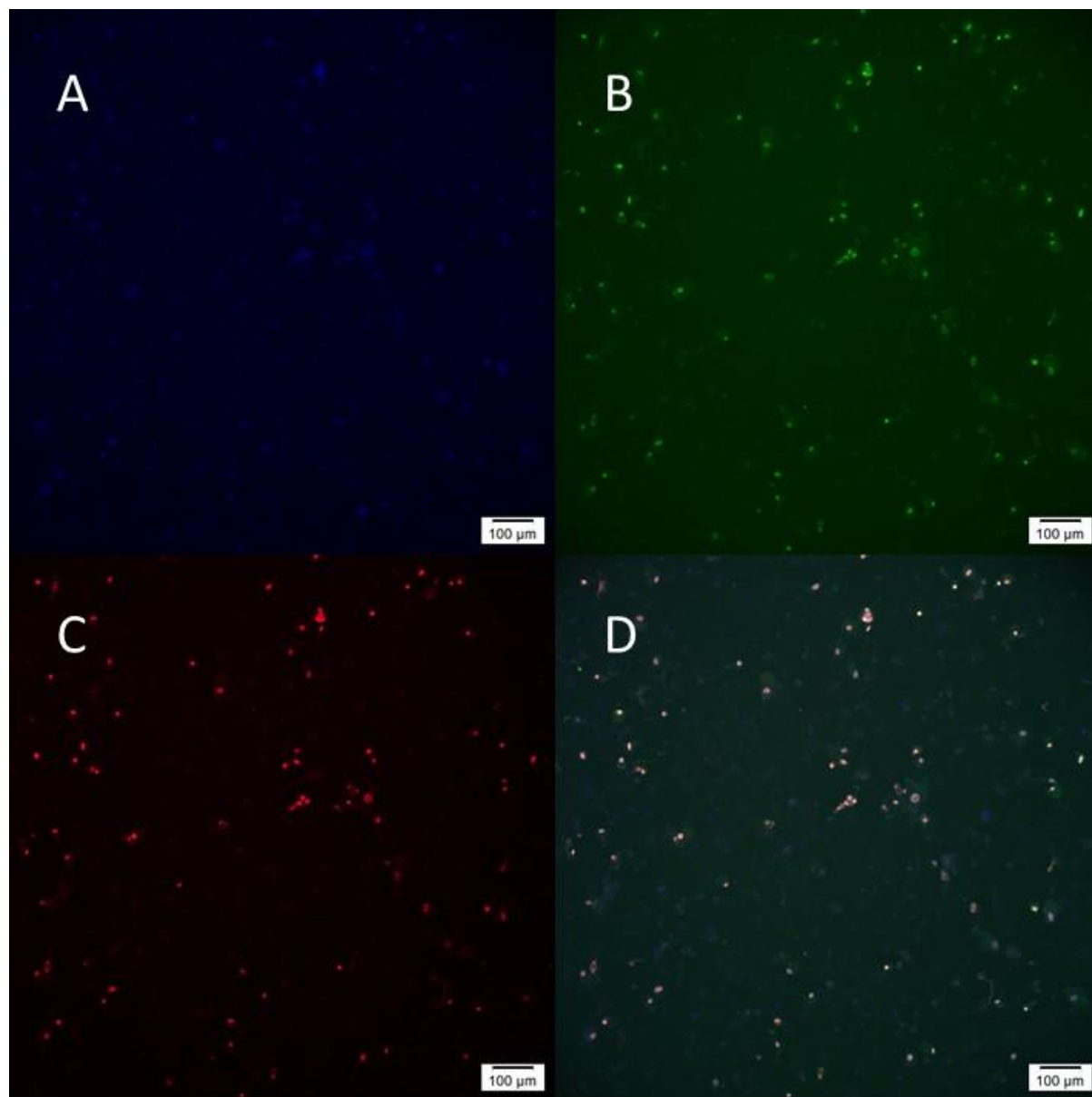
Obrázek 25 Absorpční spektrum (modrá) a emisní spektrum (žlutá) G4 ligandu BRACO-19

Na Obrázku 25 je zobrazeno absorpční a emisní spektrum látky BRACO-19, ligandu interagujícího s G-kvadruplexy. Z něj vyplývá, že je možné použít tento ligand k testům detekce apoptózy a nekrózy i k lokalizaci tohoto ligandu v buňkách. Avšak není možné obarvit jádra buněk barvivem Hoechst z důvodu překryvu jejich spekter.

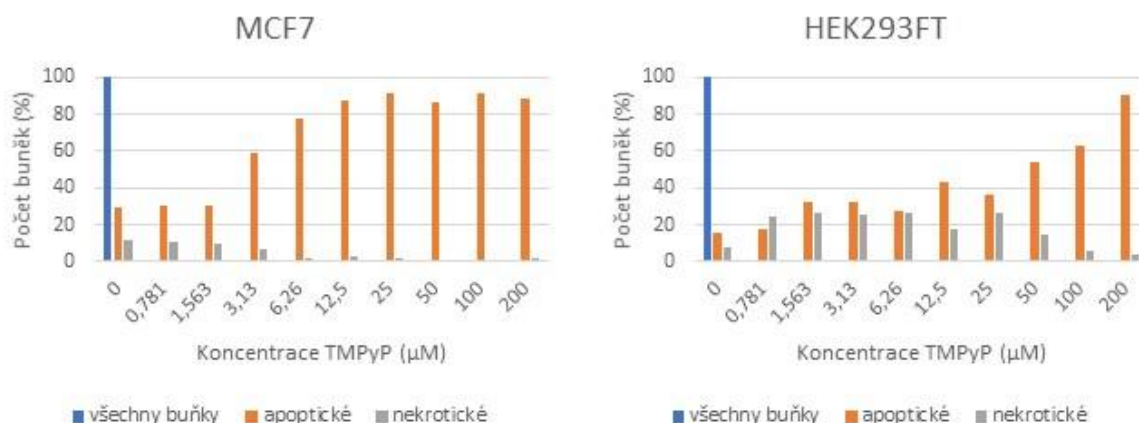
6.3 Detekce apoptózy a nekrózy

K detekci apoptózy a nekrózy byly použity ligandy interagující s G-kvadruplexy TMPyP4 a BRACO-19 a pro porovnání chemoterapeutikům roskovitín. Testy probíhaly na nádorové buněčné linii MCF7 a nenádorové buněčné linii HEK293FT. Doba působení ligandu

na buněčné linie byla 48 hodin a po uplynutí této doby byla použita tři fluorescenční barviva k detekci apoptózy a nekrózy. Annexin V byl využit k obarvení apoptických buněk, pomocí propidium jodidu byla odlišena populace nekrotických buněk a Hoechst 33342, který se váže na DNA živých, apoptických i nekrotických buněk. Vyhodnocení probíhalo pomocí fluorescenčního mikroskopu a ukázka je zobrazena na Obrázku 26 (konkrétně se jedná o buňky MCF7 ošetřené ligandem TMPyP o koncentraci 6,25 μM). Na následujících grafech (Obrázek 27-29) je znázorněno působení TMPyP, BRACO-19 a roskovitinu na buněčné linie.

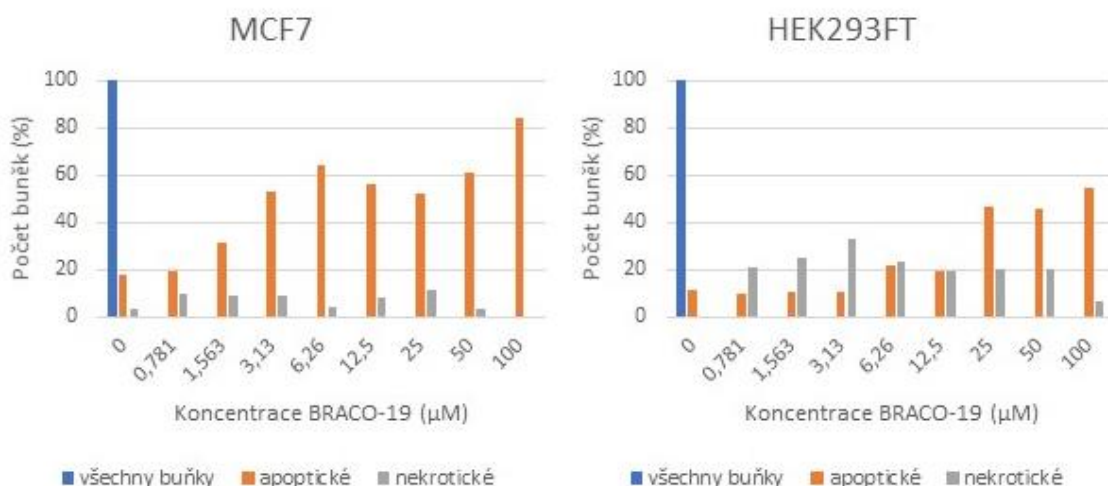


Obrázek 26 Ukázka buněk z fluorescenčního mikroskopu; zvětšené 10x; (A) všechny buňky obarvené Hoechst; (B) apoptické buňky obarvené annexinem V; (C) nekrotické buňky obarvené propidium jodidem; (D) překryv živých, apoptických a nekrotických buněk



Obrázek 27 Graf znázorňuje působení G4 ligandu TMPyP v různých koncentracích na buněčné linie MCF7 (vlevo) a HEK293FT (vpravo); modrá barva znázorňuje všechny buňky, oranžová barva apoptické a šedá barva nekrotické

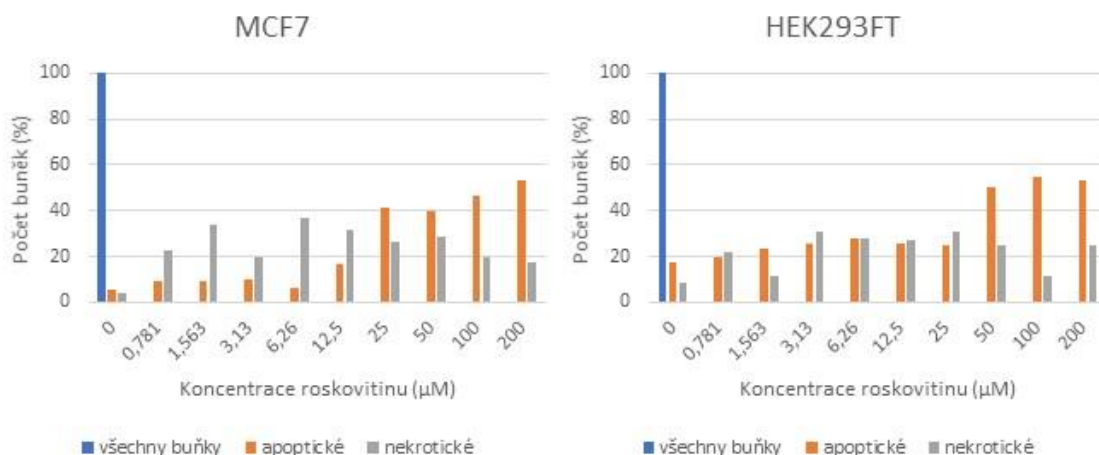
Na Obrázku 27 je znázorněno působení TMPyP na buněčné linie. Z grafů je patrné, že tento ligand interagující s G-kvadruplexy indukoval apoptózu u většího množství buněk buněčné linie MCF7 než u linie HEK293FT. Nárůst apoptických buněk byl závislý na koncentraci TMPyP a s rostoucí koncentrací docházelo k nárůstu procenta apoptických buněk u obou buněčných linií. Počet nekrotických buněk měl u nádorové buněčné linie klesající tendenci se zvyšující se koncentrací TMPyP. U nenádorové buněčné linie bylo však procento nekrotických buněk vyšší a není zde patrná závislost na koncentraci ligandu. Výraznější vliv TMPyP na nádorovou buněčnou linii odpovídá výsledkům získaným pomocí testů viability (Tabulka 3).



Obrázek 28 Graf znázorňuje působení G4 ligandu BRACO-19 v různých koncentracích na buněčné linie MCF7 (vlevo) a HEK293FT (vpravo); modrá barva znázorňuje všechny buňky, oranžová barva apoptické a šedá barva nekrotické

Na Obrázku 28 je zobrazeno grafické znázornění vlivu ligandu BRACO-19 na buněčné linie MCF7 a HEK293FT. U linie MCF7 byl stejně jako u TMPyP výrazný nárůst počtu apoptických buněk v závislosti na zvyšující se koncentraci ligandu, kdežto u nenádorové buněčné linie se počet apoptických buněk zvyšoval až při vyšších koncentracích. Také procento nekrotických buněk bylo vyšší u nenádorové buněčné linie, avšak u obou buněčných linií nebyla patrná závislost počtu nekrotických buněk na koncentraci ligandu BRACO-19. Výraznější nárůst

apoptických buněk i v nižších koncentracích u nádorové buněčné linie odpovídá výsledkům z testů viability (Tabulka 3).



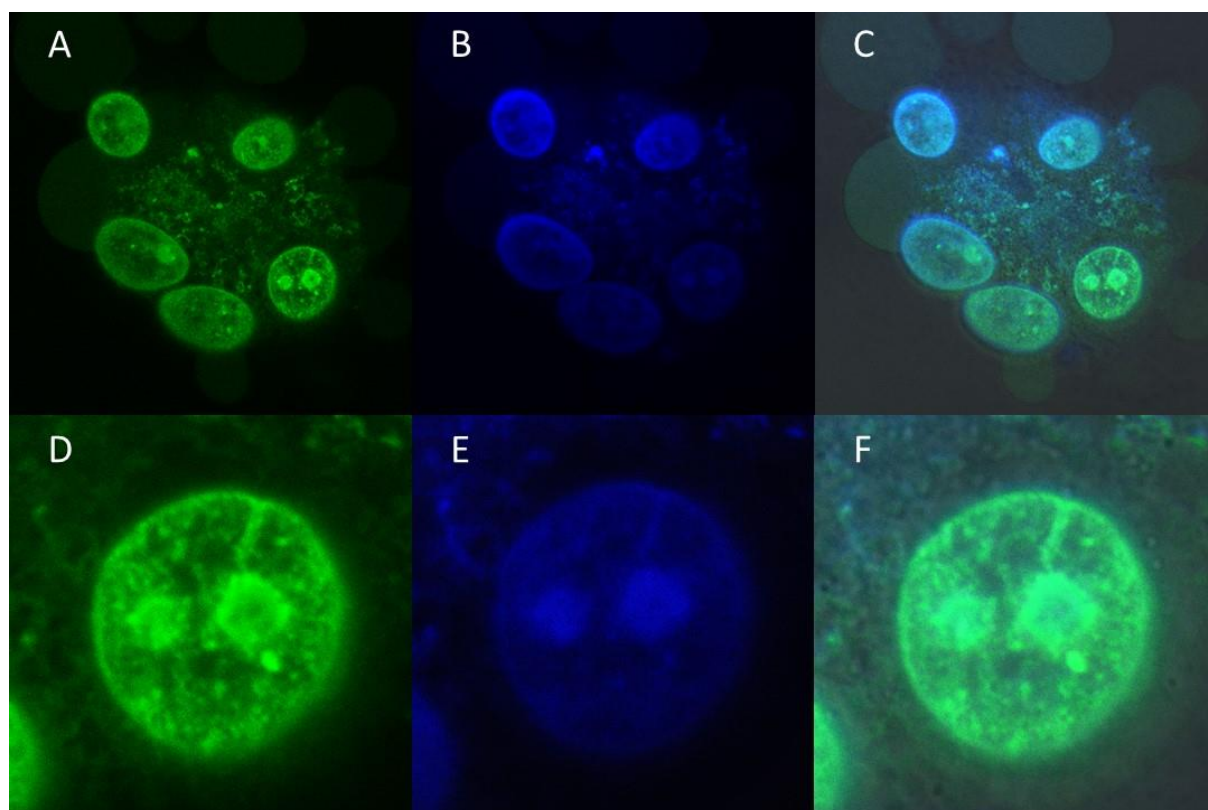
Obrázek 29 Graf znázorňuje působení chemoterapeutika roskovitinu v různých koncentracích na buněčné linie MCF7 (vlevo) a HEK293FT (vpravo); modrá barva znázorňuje všechny buňky, oranžová barva apoptické a šedá barva nekrotické

Na Obrázku 29 jsou zobrazeny grafy znázorňující působení chemoterapeutika roskovitinu na buněčné linie. U obou grafů je patrné, že množství apoptických buněk se zvyšuje s rostoucí koncentrací chemoterapeutika, kdežto procento nekrotických buněk na koncentraci závislé není. Množství apoptických buněk u linie MCF7 se však zvyšuje v porovnání s nenádorovou buněčnou linií až ve vyšších koncentracích, což je v souladu s výsledky naměřenými při testech viability (Tabulka 3).

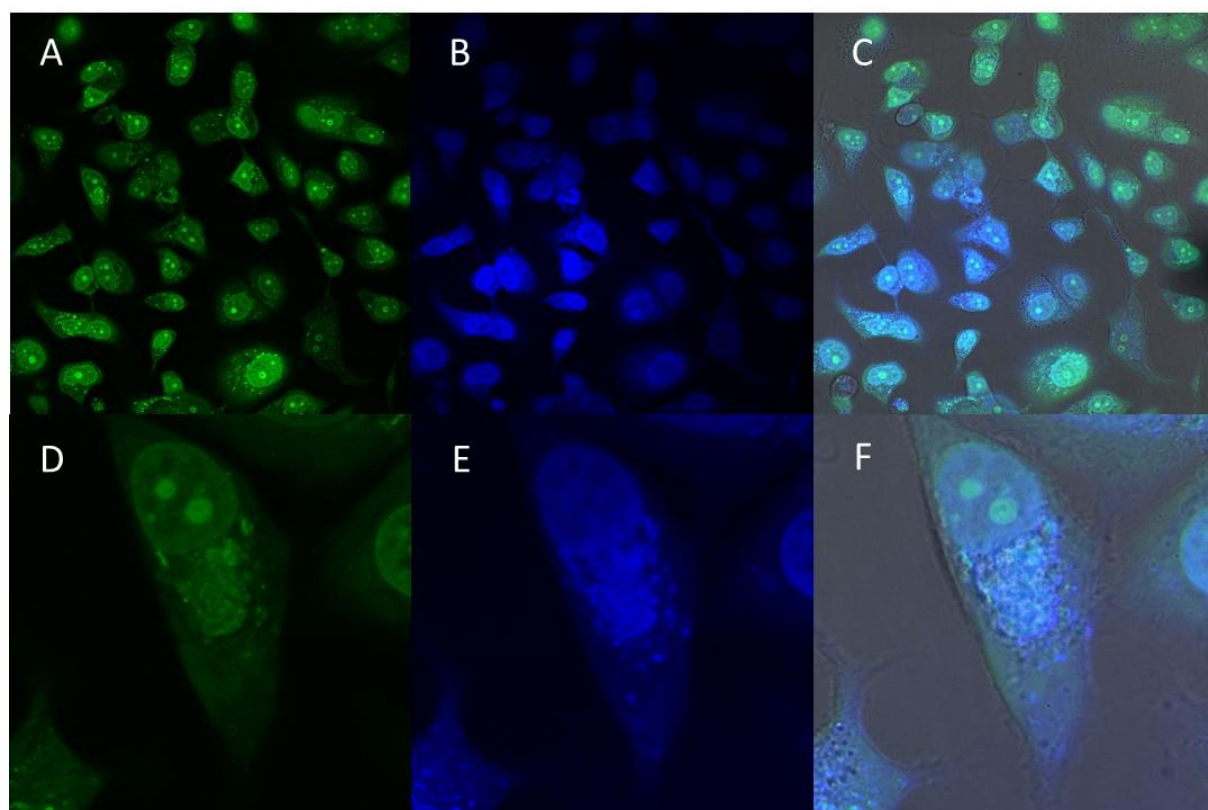
Při porovnání výsledků detekce apoptózy a nekrózy u ligandů interagujících s G-kvadruplexy a chemoterapeutika roskovitinu je patrné, že roskovitin u buněk nádorové buněčné linie více vyvolával nekrózu než ligandy interagující s G-kvadruplexy. Oproti tomu u buněk linie MCF7 ošetřené ligandy interagujícími s G-kvadruplexy docházelo k apoptóze i při nižších koncentracích. U nenádorové buněčné linie není patrný žádný výrazný rozdíl mezi jednotlivými grafy.

6.4 Lokalizace ligandů interagujících s G-kvadruplexy v buňkách

Ke stanovení lokalizace ligandů interagujících s G-kvadruplexy byl použit konfokální mikroskop. K testům byly použity ligandy berberin, TMPyP, PIPER a BRACO-19, které byly použity v koncentracích 1,5 μM, 12,5 μM a 50 μM. K ligandům berberin a PIPER se přidalo těsně před pozorováním fluorescenční barvivo Hoechst 33342 na obarvení buněčných jader. Toto barvení nebylo možné provést u ligandů TMPyP a BRACO-19 z důvodu překrývajících se absorpčních a emisních spekter se zkoumanou látkou. Testy byly provedeny s nádorovou buněčnou linií MCF7 a pozorování probíhalo po 24 a 48 hodinách působení testované látky. Na Obrázcích 30-35 jsou zobrazeny fotky z konfokálního mikroskopu, které jsou pro lepší zobrazení doplněné o překryv s fotkou využívající mikroskopii ve světlém poli (BF).



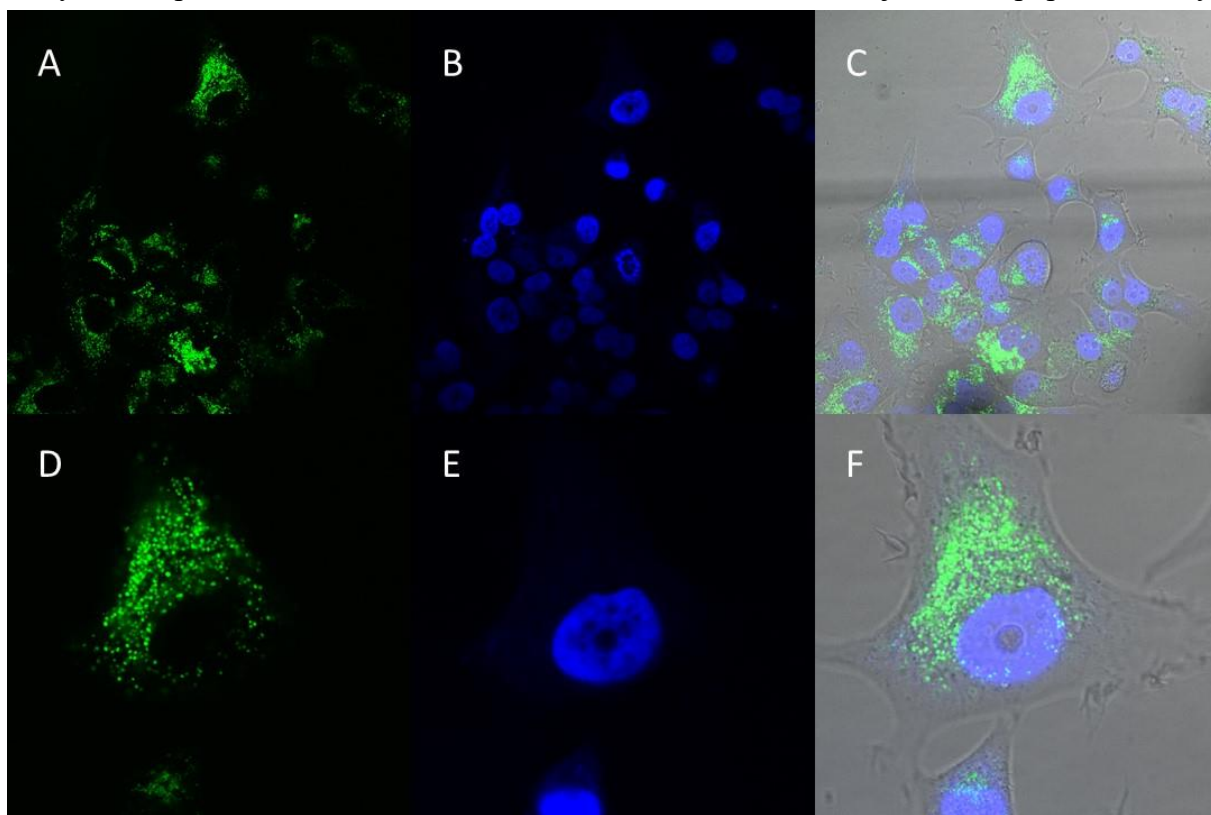
Obrázek 30 Lokalizace berberinu v buňkách MCF7 po 24 hodinách působení testované látky v koncentraci 50 μ M; (A, D) berberin zobrazen zelenou barvou; (B, E) modrou barvou je značeno jádro (Hoechst); (C, F) překryv (berberin, Hoechst, BF)



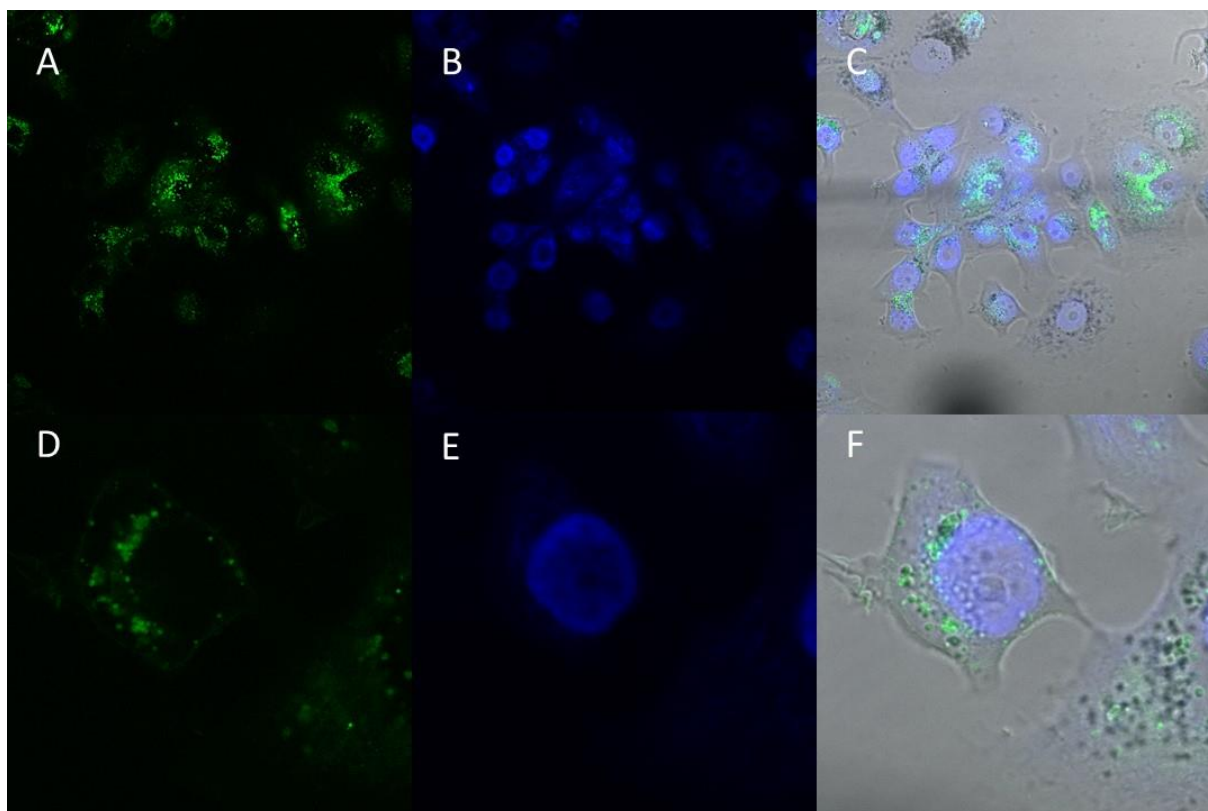
Obrázek 31 Lokalizace berberinu v buňkách MCF7 po 48 hodinách působení testované látky v koncentraci 50 μ M; (A, D) berberin zobrazen zelenou barvou; (B, E) modrou barvou je značeno jádro (Hoechst); (C, F) překryv (berberin, Hoechst, BF)

Obrázek 30 a 31 znázorňuje působení ligandu berberinu po 24 a 48 hodinách působení testované látky. V obou případech jsou zobrazeny buňky, které byly ošetřeny berberinem o 50 μ M koncentraci. Jádra, obarvená pomocí barviva Hoechst (modrá), se z velké části překrývají se zeleně zobrazeným ligandem. Z toho se dá usuzovat, že tento ligand je v buňkách převážně koncentrován v jádře. Po 48 hodinách působení berberinu lze na Obrázku 30 vidět, že modře zbarvená jádra nemají již pravidelný tvar a modře zbarvená je skoro celá buňka. Stejně tak zeleně zbarvený berberin se nenachází pouze v jádře jako to bylo u pozorování provedeném po 24 hodinách. To může být způsobeno tím, že u buněk z důvodu cytotoxicity použitého berberinu dochází ke změně permeability jaderné membrány, následně k rozdílné distribuci materiálu v rámci umírající nebo apoptické buňky.

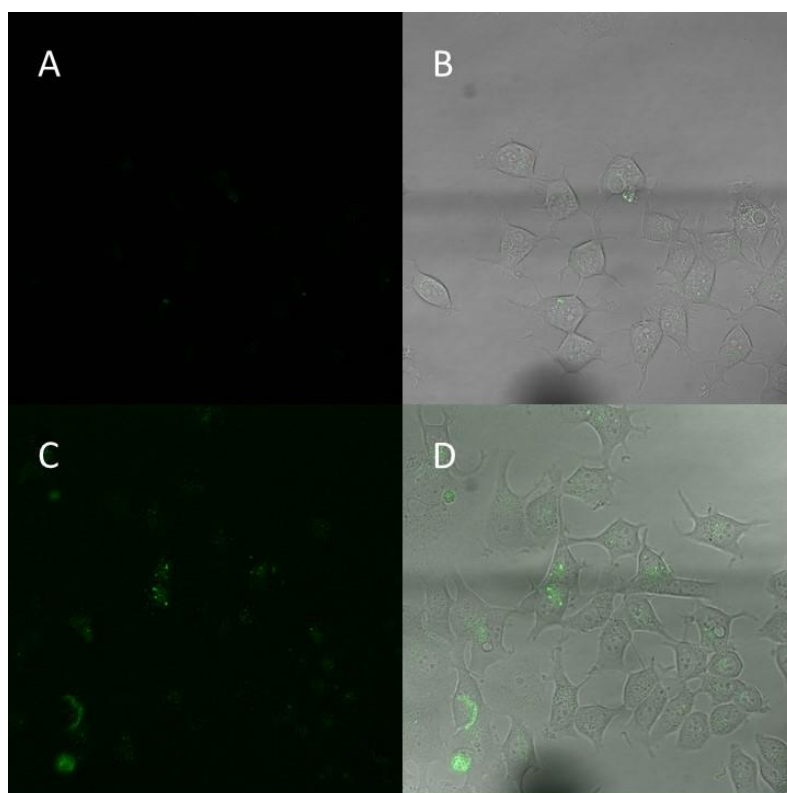
Dalším pozorovaným ligandem interagujícím s G-kvadruplexy byl PIPER. Ten je zobrazen na Obrázcích 32 a 33, které znázorňují působení tohoto ligandu po 24 a 48 hodinách. Z obrázků je patrné, že tento ligand, který je na fotce zbarven zeleně, se nenachází v jádře (znázorněno modře). Na Obrázku 32 na snímcích D-F je dobře vidět, že PIPER vstupuje do buněk, ale do jádra se již nedostává. Ani po 48 hodinách působení ligandu nebylo pozorováno, že by delší doba působení ovlivnila vstup testované látky do jádra buněk. Při pozorování buněk ošetřených ligandem PIPER bylo také pozorováno ve snímcích ve světlém poli výrazné množství shluků v cytoplazmě buněk, které korelovaly se zeleně zbarveným ligandem. Tvorba shluků v cytoplazmě tedy může souviset s tím, že ligand nemůže vstoupit do jádra. To, že nevstupuje do jader buněk, může ovlivňovat jeho nižší cytotoxicitu a vyšší IC₅₀ naměřené při testech viability (Tabulka 3). Po 48 hodinách působení testovaného ligandu lze na Obrázku 33 pozorovat, že jádra některých buněk netvoří pravidelný tvar, což může souviset s cytotoxicitou látky, a tím způsobenou rozdílnou distribucí materiálu v rámci umírající nebo apoptické buňky.



Obrázek 32 Lokalizace PIPER v buňkách MCF7 po 24 hodinách působení testované látky v koncentraci 1,5 μ M; (A, D) PIPER zobrazen zelenou barvou; (B, E) modrou barvou je značeno jádro (Hoechst); (C, F) překryv (PIPER, Hoechst, BF)

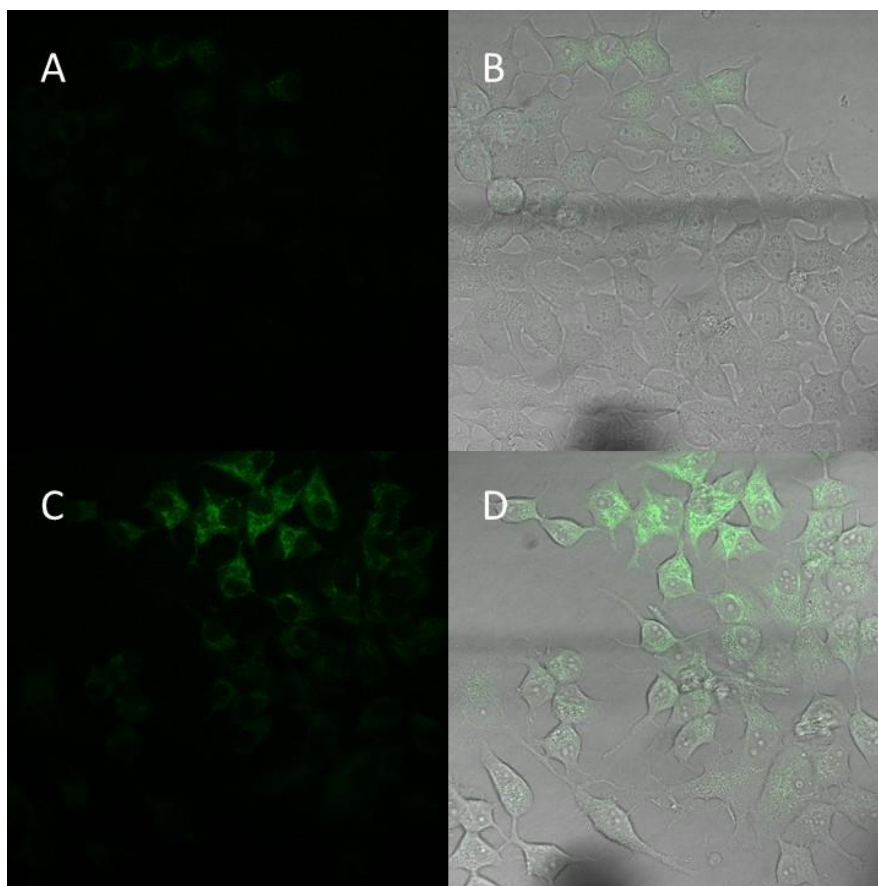


Obrázek 33 Lokalizace PIPER v buňkách MCF7 po 48 hodinách působení testované látky v koncentraci $12,5\mu\text{M}$; (A, D) PIPER zobrazen zelenou barvou; (B, E) modrou barvou je značeno jádro (Hoechst); (C, F) překryv (PIPER, Hoechst, BF)



Obrázek 34 Lokalizace TMPyP v buňkách MCF7 po 48 hodinách působení testované látky v koncentraci $0\mu\text{M}$ sloužící jako kontrola (A, B) a $12,5\text{ M}$ (C, D); (A, C) TMPyP zobrazen zelenou barvou; (B, D) překryv (TMPyP a BF)

Na Obrázku 34 a 35 jsou zobrazeny ligandy TMPyP a BRACO-19. Tyto ligandy byly po změření absorpčních a emisních spekter excitovány laserem o vlnové délce 355 nm. Jelikož byl pozorován slabý fluorescenční signál i v kontrolním vzorku bez přidaného ligandu interagujícího s G-kvadruplexy, lze předpokládat, že vlnová délka 355 nm excituje i jiné látky obsažené v buňkách linie MCF7 a způsobuje autofluorescenci. Nelze tedy vyhodnotit lokalizaci TMPyP a BRACO-19 v buňkách s použitím laseru o této vlnové délce.



Obrázek 35 Lokalizace BRACO-19 v buňkách MCF7 po 48 hodinách působení testované látky v koncentraci $0\mu\text{M}$ sloužící jako kontrola (A, B) a $1,5\mu\text{M}$ (C, D); (A, C) BRACO-19 zobrazeno zelenou barvou; (B, D) překryv (BRACO-19 a BF)

7 DISKUZE

V rámci experimentální části byl v první řadě testován vliv vybraných chemoterapeutik a ligandů interagujících s G-kvadruplexy na nádorovou buněčnou linii MCF7 a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT. Doba působení testovaných látek na buněčné linie byla 48 hodin a cílem bylo zjištění střední inhibiční koncentrace a porovnání získaných výsledků mezi sebou. Naměřené výsledky se blíží středním inhibičním koncentracím získaným v jiných publikacích. Například 5-fluorouracil měl naměřenou hodnotu IC_{50} $5,356\mu M$ u buněčné linie MCF7 (podle [106] byla tato hodnota $10\mu M$ po 24 hodinách). Naměřená hodnota IC_{50} roskovitinu u linie MCF7 byla $3,486\mu M$, publikace udávají hodnotu $16,7\mu M$ u stejné buněčné linie s rozdílnými podmínkami inkubace (24 hodin v médiu obsahující roskovitin, následně 24 hodin v čerstvém médiu bez cytostatika) [107]. U doxorubicinu byla naměřena hodnota IC_{50} $2,69\mu M$ (pro porovnání podle [108] byla hodnota IC_{50} doxorubicinu $1.2009\mu M$ po 24 hodinách). Střední inhibiční koncentrace cisplatiny byla $96,05\mu M$ pro MCF7 a $34,99\mu M$ pro HEK293FT, což nekoreluje s výsledky podle [109], kde získané hodnoty byly výrazně nižší. To mohlo být způsobeno špatným rozpuštěním tohoto chemoterapeutika v použitém rozpouštědlu. U berberinu, ligandu interagujícího s G-kvadruplexy, byla naměřena hodnota IC_{50} $8,907\mu M$ ($25\mu M$ podle [110] u stejné buněčné linie). Podle [111] byla naměřena střední inhibiční koncentrace TMPyP v rozmezí $1,49-19,1\mu M$ u různých buněčných linií, kam spadá i hodnota naměřená v této práci. Při porovnání naměřených výsledků lze usuzovat, že ligandy interagující s G-kvadruplexy mají podobnou cytotoxickou aktivitu v porovnání s použitými chemoterapeutiky. Ligandy berberin, TMPyP a BRACO-19 také měly větší cytotoxický účinek na linii MCF7 než na linii HEK293FT. Jediným ligandem, který působil více cytotoxicky na nenádorovou buněčnou linii byl tedy PIPER. U chemoterapeutik to bylo naopak a pouze 5-fluorouracil měl větší inhibiční účinek na nádorovou buněčnou linii.

Další část experimentální práce se zabývala změřením absorpčních a emisních spekter ligandů interagujících s G-kvadruplexy. To bylo nezbytné, aby se zjistilo, zda se spektra těchto látek nepřekrývají se spektry barviv použitých pro detekci apoptózy a nekrózy. Kvůli tomu nemohl být proveden test detekce apoptózy a nekrózy u ligandů berberin a PIPER a při testech lokalizace ligandů v buňkách buněčné linie MCF7 nemohlo být použito barvivo Hoechst 33342 k obarvení jader buněk. Naměřené spektrum berberinu odpovídá spektru dostupnému v literatuře [112].

Následujícím experimentem byla detekce apoptózy a nekrózy v buňkách nádorové a nenádorové buněčné linie. Byly testovány ligandy interagující s G-kvadruplexy TMPyP a BRACO-19. K porovnání byl tento test proveden i s chemoterapeutikem roskovitin. U buněčné linie MCF7 bylo naměřeno po působení roskovitinu vyšší procento nekrotických buněk v porovnání s ligandy, které indukovaly ve větší míře zase apoptózu. U buněčné linie HEK293FT nebyly vidět výrazné rozdíly mezi těmito třemi testovanými látky, což nekoreluje s výsledky testů viability z předchozí části experimentu. Pro lepší vyhodnocení by tedy bylo vhodné zkusit použít jiné metody detekce, například průtokovou cytometrii, která by mohla poskytnout přesnější výsledky než fluorescenční mikroskop.

Poslední částí experimentu byla lokalizace ligandů interagujících s G-kvadruplexy v buňkách MCF7 pomocí konfokální mikroskopie. K testům byly použity ligandy berberin, TMPyP, PIPER a BRACO-19. Při studiu berberinu a PIPER mohly být jádra buněk pro lepší vizualizaci obarveny barvivem Hoechst 33342. Pozorování probíhalo po 24 a 48 hodinách. U ligandu berberinu bylo pozorováno, že látka vstupuje do jader buněk. Po 48 hodinách se

nacházel berberin v menší míře i kolem jádra, což mohlo souviset s jeho cytotoxicitou. Avšak ve studii [113] zjistili, že berberin u tří různých buněčných linií byl lokalizován převážně v cytoplazmě. Jiná studie však uvádí, že berberin vstupuje do jader již po 30 minutách podání ligandu [114]. Dalším pozorovaným ligandem byl PIPER, bylo zjištěno, že tento ligand nevstupuje do jader buněk a koncentruje se v cytoplazmě, což může souviset s jeho nižší cytotoxickou aktivitou oproti jiným testovaným ligandům v rámci této práce. Poslední dva pozorované ligandy, TMPyP a BRACO-19, byly při studiu pomocí konfokálního mikroskopu excitovány laserem o vlnové délce 355 nm. Avšak u kontrolního vzorku neobsahujícího ligand byla pozorována slabá autofluorescence, a proto není možné určit lokalizaci této látky v buňkách. Autofluorescence mohla být způsobena látkami přítomnými v buňkách, jako jsou NADH a FAD [115, 116]. TMPyP se podle publikací nachází v lysozomech, Golgiho aparátu a při vyšších koncentracích v jádrech [77, 117]. Ligand BRACO-19 by měl být lokalizován v jádře buněk [118].

8 ZÁVĚR

Teoretická část této diplomové práce se zabývá charakterizací chemoterapeutik a konkrétním popisem vybraných chemoterapeutik testovaných v experimentální části práce. Následně jsou rozebrány alternativní struktury DNA, zejména G-kvadruplexy a ligandy, které se na tyto struktury vážou. Pozornost je věnována převážně ligandům použitých v experimentální části. V poslední kapitole teoretické části jsou popsány testy viability.

Experimentální část diplomové práce se nejprve zabývá působením vybraných chemoterapeutik a ligandů interagujících s G-kvadruplexy na nádorovou buněčnou linii MCF7 a nenádorovou buněčnou linii HEK293FT. Viabilita buněk byla vyhodnocena pomocí testů využívajících Sulforhodamin B a z výsledků byla zjištěna hodnota střední inhibiční koncentrace, která byla porovnána mezi jednotlivými testovanými látkami. Bylo zjištěno, že ligandy interagující s G-kvadruplexy mají po 48 hodinách působení podobný cytotoxický efekt jako komerčně dostupná chemoterapeutika. Zároveň tři ze čtyř testovaných ligandů (berberin, TMPyP, BRACO-19) vykazovaly vyšší cytotoxicitu u buněčné linie MCF7 než HEK293FT.

Dalším provedeným experimentem byla detekce apoptózy a nekrózy po působení chemoterapeutika roskovitin a ligandů interagujících s G-kvadruplexy TMPyP a BRACO-19 u buněčných linií. V této části bylo pozorováno, že působení ligandů u nádorových buněk výrazněji indukovalo apoptózu než chemoterapeutikum roskovitin, jehož působení vedlo k nekróze u většího procenta buněk nádorové buněčné linie oproti ligandům.

Poslední část se zabývala lokalizací ligandů interagujících s G-kvadruplexy v buňkách buněčné linie MCF7 pomocí konfokální mikroskopie. Ligand berberin byl lokalizován v jádrech buněk, která byla pro lepší vizualizaci a hodnocení obarvena barvivem Hoechst 33342. Ligand PIPER se nacházel v buňkách, ale do jader nevstupoval ani po 48 hodinách působení. Poslední dva ligandy TMPyP a BRACO-19, excitované laserem o vlnové délce 355 nm, nešlo zhodnotit kvůli pozorované autofluorescenci v buňkách.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BRAY, Freddie, Jacques FERLAY, Isabelle SOERJOMATARAM, Rebecca SIEGEL, Lindsey TORRE a Ahmedin JEMAL. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2018, **68**(6), 394-424 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.3322/caac.21492. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
- [2] KHAN, Tabassum, Amrita DATE, Hardik CHAWDA a Krina PATEL. Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **210**, 412-428 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.064. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861719300839>
- [3] GARY, Cyril, Michael HAJEK, Asel BIKTASOVA, Gary BELLINGER, Wendell YARBROUGH a Natalia ISSAEVA. Selective antitumor activity of roscovitine in head and neck cancer. *Oncotarget* [online]. 2016, **7**(25) [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.18632/oncotarget.9560. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/9560>
- [4] FINCH, Roger, David GREENWOOD, S. NORRBY a Richard WHITLEY. *Antibiotic and Chemotherapy*. 9th Edition. Saunders, 2011. ISBN 978-0-7020-4064-1.
- [5] HUITEMA, Alwin, Karen SMITS, Ron MATHÔT, Jan SCHELLENS, Sjoerd RODENHUIS a Jos BEIJNEN. The clinical pharmacology of alkylating agents in high-dose chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs* [online]. 2000, **11**(7), 515-533 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1097/00001813-200008000-00002. ISSN 0959-4973. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001813-200008000-00002>
- [6] MIHLON, Frank, Charles RAY a Wells MESSERSMITH. Chemotherapy Agents: A Primer for the Interventional Radiologist. *Seminars in Interventional Radiology* [online]. 2010, **27**(04), 384-390 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1055/s-0030-1267852. ISSN 0739-9529. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1267852>
- [7] HEIDELBERGER, CHARLES, N. CHAUDHURI, PETER DANNEBERG et al. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* [online]. 1957, **179**(4561), 663-666 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1038/179663a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/179663a0>
- [8] LONGLEY, Daniel, D. HARKIN a Patrick JOHNSTON. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2003, **3**(5), 330-338 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1038/nrc1074. ISSN 1474-175X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrc1074>
- [9] BERTINO (MODERATOR), Joseph, Martin FLEISHER (MODERATOR), Jan BEUMER et al. Highlights from: 5-Fluorouracil Drug Management Pharmacokinetics and Pharmacogenomics Workshop; Orlando, Florida; January 2007. *Clinical Colorectal Cancer* [online]. 2007, **6**(6), 407-422 [cit. 2019-02-27].

- DOI: 10.1016/S1533-0028(11)70480-7. ISSN 15330028. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1533002811704807>
- [10] GAMELIN, E, M BOISDRON-CELLE, R DELVA et al. Long-term weekly treatment of colorectal metastatic cancer with fluorouracil and leucovorin: results of a multicentric prospective trial of fluorouracil dosage optimization by pharmacokinetic monitoring in 152 patients. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 1998, **16**(4) [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.4.1470. ISSN 0732-183X.
 - [11] MEIJER, Laurent, Annie BORGNE, Odile MULNER, James CHONG, J. BLOW, Naoyuki INAGAKI, Masaki INAGAKI a DELCROS. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1997, **243**(1-2) [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00527.x. ISSN 0014-2956.
 - [12] MACCALLUM, David, Jean MELVILLE, Sheelagh FRAME, Kathryn WATT, Sian ANDERSON, Athos GIANELLA-BORRADORI, David LANE a Simon GREEN. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II–Dependent Transcription and Down-regulation of Mcl-1. *Cancer Research* [online]. 2005, **65**(12), 5399-5407 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0233. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-0233>
 - [13] National Center for Biotechnology Information. *PubChem Database*. [online]. National Institutes of Health, 2004 [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160355>
 - [14] MEIJER, Laurent, Deborah NELSON, Vladimir RIAZANSKI, Aida GABDOULKHAKOVA, Geneviève HERY-ARNAUD a Rozenn LE BERRE. *Journal of Innate Immunity* [online]. 2016, **8**(4) [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1159/000444256. ISSN 1662-811X.
 - [15] LICHOTA, Anna a Krzysztof GWOZDZINSKI. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(11) [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.3390/ijms19113533. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3533>
 - [16] LE TOURNEAU, Christophe, Sandrine FAIVRE, Valérie LAURENCE et al. Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *European Journal of Cancer* [online]. 2010, **46**(18), 3243-3250 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.08.001. ISSN 09598049. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804910007823>
 - [17] ARCAMONE, F., G. CASSINELLI, G. FANTINI, A. GREIN, P. OREZZI a C. POL. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1969, **11**(6), 704-713 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1002/bit.260110607. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260110607>
 - [18] CAGEL, Maximiliano, Estefanía GROTZ, Ezequiel BERNABEU, Marcela MORETTON a CHIAPPETTA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from

- bench to bedside. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, **22**(2), 270-281 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.11.005. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644616304214#bib0590>
- [19] MOHAN, Praveena a Natalya RAPOPORT. Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2010, **7**(6), 1959-1973 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1021/mp100269f. ISSN 1543-8384. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp100269f>
- [20] SILVA, E., R. BAZONI, E. RAMOS a M. ROCHA. DNA-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities. *Biopolymers* [online]. 2017, **107**(3) [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1002/bip.22998. ISSN 00063525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.22998>
- [21] DASARI, Shaloam a Paul BERNARD TCHOUNWOU. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2014, **740**, 364-378 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299914005627>
- [22] ROSENBERG, BARNETT, LORETTA VAN CAMP a THOMAS KRIGAS. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* [online]. 1965, **205**(4972), 698-699 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1038/205698a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/205698a0>
- [23] KELLAND, Lloyd. Preclinical Perspectives on Platinum Resistance. *Drugs* [online]. 2000, **59**(4), 1-8 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.2165/00003495-200059004-00001. ISSN 0012-6667. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200059004-00001>
- [24] GALLUZZI, L, L SENOVILLA, I VITALE a J MICHELS. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* [online]. 2012, **31**(15), 1869–1883 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1038/onc.2011.384. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/onc2011384#mechanisms-of-pretarget-resistance>
- [25] RANCOULE, Chloé, Jean-Baptiste GUY, Alexis VALLARD, Majed BEN MRAD, Amel REHAILIA a Nicolas MAGNÉ. Les 50 ans du cisplatine. *Bulletin du Cancer* [online]. 2017, **104**(2), 167-176 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.bulcan.2016.11.011. ISSN 00074551. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007455116303472>
- [26] GIETEMA, JA, MT MEINARDI, J MESSERSCHMIDT, T GELEVERT, F ALT, DRA UGES a D TH SLEIJFER. Circulating plasma platinum more than 10 years after cisplatin treatment for testicular cancer. *The Lancet* [online]. 2000, **355**(9209), 1075-1076 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02044-4. ISSN 01406736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600020444>
- [27] RUGGIERO, Antonio, Giovanna TROMBATORE, Silvia TRIARICO, Roberta ARENA, Pietro FERRARA, Maria SCALZONE, Filomena PIERRI a Riccardo

- RICCARDI. Platinum compounds in children with cancer. *Anti-Cancer Drugs* [online]. 2013, **24**(10), 1007-1019 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1097/CAD.0b013e3283650bda. ISSN 0959-4973.
- [28] WATSON, J. a F. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. 1953, **171**(4356), 737-738 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1038/171737a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/171737a0>
- [29] SINDEN, Richard. *DNA structure and function*. 1st Edition. San Diego: Academic Press, 1994. ISBN 978-012-6457-506.
- [30] TRAVERS, Andrew a Georgi MUSKHELISHVILI. DNA structure and function. *FEBS Journal* [online]. 2015, **282**(12), 2279-2295 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1111/febs.13307. ISSN 1742464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13307>
- [31] SIMONE, Roberto, Pietro FRATTA, Stephen NEIDLE a PARKINSON. G-quadruplexes: Emerging roles in neurodegenerative diseases and the non-coding transcriptome. *FEBS Letters* [online]. 2015, **589**(14), 1653-1668 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.003. ISSN 00145793. Dostupné z: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2015.05.003>
- [32] GARANT, Jean-Michel, Jean-Pierre PERREAULT, Michelle SCOTT a John HANCOCK. Motif independent identification of potential RNA G-quadruplexes by G4RNA screener. *Bioinformatics* [online]. 2017, **33**(22), 3532–3537 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx498. ISSN 1367-4803. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5870565/>
- [33] GELLERT, M., M. LIPSETT a D. DAVIES. HELIX FORMATION BY GUANYLIC ACID. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1962, **48**(12), 2013-2018 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1073/pnas.48.12.2013. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.48.12.2013>
- [34] SEN, Dipankar a Walter GILBERT. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* [online]. 1988, **334**(6180), 364-366 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1038/334364a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/334364a0>
- [35] SCHAFFITZEL, C., I. BERGER, J. POSTBERG, J. HANES, H. LIPPS a A. PLUCKTHUN. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(15), 8572-8577 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1073/pnas.141229498. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.141229498>
- [36] LANE, A., J. CHAIRES, R. GRAY a J. TRENT. Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(17), 5482-5515 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1093/nar/gkn517. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn517>
- [37] FUJII, Taiga, Peter PODBEVŠEK, Janez PLAVEC a Naoki SUGIMOTO. Effects of metal ions and cosolutes on G-quadruplex topology. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 2017, **166**, 190-198 [cit. 2019-03-26]. DOI:

- 10.1016/j.jinorgbio.2016.09.001. ISSN 01620134. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013416302471>
- [38] ASAMITSU, Sefan, Toshikazu BANDO a Hiroshi SUGIYAMA. Ligand Design to Acquire Specificity to Intended G-Quadruplex Structures. *Chemistry - A European Journal* [online]. 2019, **25**(2), 417-430 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1002/chem.201802691. ISSN 09476539. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201802691>
- [39] RHODES, Daniela a Hans LIPPS. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, **43**(18), 8627-8637 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1093/nar/gkv862. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv862>
- [40] BURGER, Angelika, Fangping DAI, Christoph SCHULTES, Anthony RESZKA, Michael MOORE, John DOUBLE a Stephen NEIDLE. The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Research* [online]. 2005, **65**(4), 1489-1496 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2910. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-2910>
- [41] GRANOTIER, C. Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(13), 4182-4190 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1093/nar/gki722. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki722>
- [42] O'SULLIVAN, Roderick a Jan KARLSEDER. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2010, **11**(3), 171-181 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1038/nrm2848. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrm2848>
- [43] XIN, Huawei, Dan LIU a Zhou SONGYANG. The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biology* [online]. 2008, **9**(9), 232 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1186/gb-2008-9-9-232. ISSN 1465-6906. Dostupné z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-9-232>
- [44] LIPPS, Hans a Daniela RHODES. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in Cell Biology* [online]. 2009, **19**(8), 414-422 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.05.002. ISSN 09628924. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892409001238>
- [45] MILLEVOI, Stefania, Hervé MOINE a Stéphan VAGNER. G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* [online]. 2012, **3**(4), 495-507 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1002/wrna.1113. ISSN 17577004. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/wrna.1113>
- [46] ADHIKARY, Sovana a Martin EILERS. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2005, **6**(8), 635-645 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1038/nrm1703. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrm1703>
- [47] ASAMITSU, Sefan, Shunsuke OBATA, Zutao YU, Toshikazu BANDO a Hiroshi SUGIYAMA. Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands

- Toward Cancer Therapy. *Molecules* [online]. 2019, **24**(3), 429 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.3390/molecules24030429. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/3/429>
- [48] GEHRING, Kalle, Jean-Louis LEROY a Maurice GUÉRON. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* [online]. 1993, **363**(6429), 561-565 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1038/363561a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/363561a0>
- [49] ABOU ASSI, Hala, Miguel GARAVÍS, Carlos GONZÁLEZ a Masad DAMHA. I-Motif DNA: structural features and significance to cell biology. *Nucleic Acids Research* [online]. 2018, **46**(16), 8038-8056 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1093/nar/gky735. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/46/16/8038/5075032>
- [50] GUÉRON, Maurice a Jean-Louis LEROY. The i-motif in nucleic acids. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2000, **10**(3), 326-331 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00091-9. ISSN 0959440X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X00000919>
- [51] WRIGHT, Elisé, Julian HUPPERT a Zoë A. E. WALLER. Identification of multiple genomic DNA sequences which form i-motif structures at neutral pH. *Nucleic Acids Research* [online]. 2017, **45**(6), 2951-2959 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1093/nar/gkx090. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <http://academic.oup.com/nar/article/45/6/2951/2979313>
- [52] ZERAATI, Mahdi, David LANGLEY, Peter SCHOFIELD et al. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nature Chemistry* [online]. 2018, **10**(6), 631-637 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1038/s41557-018-0046-3. ISSN 1755-4330. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41557-018-0046-3>
- [53] FELSENFELD, Gary a Alexander RICH. Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 1957, **26**(3), 457-468 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1016/0006-3002(57)90091-4. ISSN 00063002. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006300257900914>
- [54] HU, Yuwei, Alessandro CECCONELLO, Andrea IDILI, Francesco RICCI a Itamar WILLNER. Triplex DNA Nanostructures: From Basic Properties to Applications. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2017, **56**(48), 15210-15233 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1002/anie.201701868. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201701868>
- [55] JAIN, Aklank, Guliang WANG a Karen VASQUEZ. DNA triple helices: Biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie* [online]. 2008, **90**(8), 1117-1130 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.02.011. ISSN 03009084. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030090840800045X>
- [56] LI, Yue, Junetha SYED a Hiroshi SUGIYAMA. RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs. *Cell Chemical Biology* [online]. 2016, **23**(11), 1325-1333 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.09.011. ISSN 24519456. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2451945616303464>

- [57] BACOLLA, Albino, Guliang WANG, Karen VASQUEZ a Gregory BARSH. New Perspectives on DNA and RNA Triplexes As Effectors of Biological Activity. *PLOS Genetics* [online]. 2015, **11**(12), 1005696 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005696. ISSN 1553-7404. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005696>
- [58] HOYNE, Paula a L.James MAHER. Functional Studies of Potential Intrastrand Triplex Elements in the Escherichia coli Genome. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2002, **318**(2), 373-386 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00041-4. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283602000414>
- [59] BACOLLA, A., J. COLLINS, B. GOLD et al. Long homopurine*homopyrimidine sequences are characteristic of genes expressed in brain and the pseudoautosomal region. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(9), 2663-2675 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1093/nar/gkl354. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl354>
- [60] GENTRY, Matthew a Lars HENNIG. A Structural Bisulfite Assay to Identify DNA Cruciforms. *Molecular Plant* [online]. 2016, **9**(9), 1328-1336 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1016/j.molp.2016.06.003. ISSN 16742052. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205216300922>
- [61] SHLYAKHTENKO, Luda, Vladimir POTAMAN, Richard SINDEN a Yuri LYUBCHENKO. Structure and dynamics of supercoil-stabilized DNA cruciforms. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1998, **280**(1), 61-72 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1855. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283698918551>
- [62] WANG, Andrew, Gary QUIGLEY, Francis KOLPAK, James CRAWFORD, Jacques VAN BOOM, Gijs VAN DER MAREL a Alexander RICH. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* [online]. 1979, **282**(5740), 680–686 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1038/282680a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/282680a0>
- [63] RICH, Alexander a Shuguang ZHANG. Z-DNA: the long road to biological function. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2003, **4**(7), 566-572 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1038/nrg1115. ISSN 1471-0056. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrg1115>
- [64] WANG, Guliang. Z-DNA, an active element in the genome. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2007, **12**(8-12), 4424 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.2741/2399. ISSN 10939946. Dostupné z: <http://www.bioscience.org/2007/v12/af/2399/list.htm>
- [65] STREKOWSKI, Lucjan a Beth WILSON. Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 2007, **623**(1-2), 3-13 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2007.03.008. ISSN 00275107. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510707001480>
- [66] SNYDER, R.D., J. MCNULTY, G. ZAIROV, D.E. EWING a L.B. HENDRY. The influence of N-dialkyl and other cationic substituents on DNA intercalation and genotoxicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of*

- Mutagenesis* [online]. 2005, **578**(1-2), 88-99 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.022. ISSN 00275107. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510705001557>
- [67] PALCHAUDHURI, Rahul a Paul HERGENROTHER. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2007, **18**(6), 497-503 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.09.006. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166907001188>
- [68] MA, Dik-Lung, Victor MA, Daniel CHAN, Ka-Ho LEUNG, Hai-Jing ZHONG a Chung-Hang LEUNG. In silico screening of quadruplex-binding ligands. *Methods* [online]. 2012, **57**(1), 106-114 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2012.02.001. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202312000254>
- [69] HAIDER, Shozeb, Stephen NEIDLE a Gary PARKINSON. A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions. *Biochimie* [online]. 2011, **93**(8), 1239-1251 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.05.012. ISSN 03009084. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908411001696>
- [70] GIANCOLA, Concetta a Bruno PAGANO. Energetics of Ligand Binding to G-Quadruplexes. *Quadruplex Nucleic Acids* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, **330**, 211-242 [cit. 2019-04-21]. Topics in Current Chemistry. DOI: 10.1007/128_2012_347. ISBN 978-3-642-34742-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/128_2012_347
- [71] RAHMAN, Khondaker, Karolina TIZKOVA, Anthony RESZKA, Stephen NEIDLE a David THURSTON. Identification of novel telomeric G-quadruplex-targeting chemical scaffolds through screening of three NCI libraries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2012, **22**(8), 3006-3010 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.02.020. ISSN 0960894X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X1200203X>
- [72] AYATI, Seyed, Badrieh FAZELI, Amir MOMTAZI-BOROJENI, Arrigo CICERO, Matteo PIRRO a Amirhossein SAHEBKAR. Regulatory effects of berberine on microRNome in Cancer and other conditions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2017, **116**, 147-158 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.05.008. ISSN 10408428. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842817300240>
- [73] WANG, Kun, Xinchu FENG, Liwei CHAI, Shijie CAO a Feng QIU. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2017, **49**(2), 139-157 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1080/03602532.2017.1306544. ISSN 0360-2532. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03602532.2017.1306544>
- [74] GUAMÁN ORTIZ, Luis, Paolo LOMBARDI, Micol TILLHON a Anna SCOVASSI. Berberine, an Epiphany Against Cancer. *Molecules* [online]. 2014, **19**(8), 12349-12367 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.3390/molecules190812349. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/8/12349>

- [75] 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 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1002/cbin.10206. ISSN 10656995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbin.10206>
- [76] PATIL, Jeevitha, Jinhee KIM a G.K. JAYAPRAKASHA. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2010, **645**(1-3), 70-78 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.07.037. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299910007569>
- [77] GARCIA-SAMPEDRO, Andres, Andrea TABERO, Ismahan MAHAMED a Pilar ACEDO. Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* [online]. 2019, **23**(0102), 11-27 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1142/S1088424619500111. ISSN 1088-4246. Dostupné z: <https://www.worldscientific.com/doi/10.1142/S1088424619500111>
- [78] LUBITZ, Irit, Natalia BOROVOK a Alexander KOTLYAR. Interaction of Monomolecular G4-DNA Nanowires with TMPyP: Evidence for Intercalation †. *Biochemistry* [online]. 2007, **46**(45), 12925-12929 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1021/bi701301u. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi701301u>
- [79] RUGGIERO, Emanuela a Sara RICHTER. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Research* [online]. 2018, **46**(7), 3270-3283 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1093/nar/gky187. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/46/7/3270/4937544>
- [80] HAN, Haiyong, Richard BENNETT a Laurence HURLEY. Inhibition of Unwinding of G-Quadruplex Structures by Sgs1 Helicase in the Presence of N , N '-Bis[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic Diimide, a G-Quadruplex-Interactive Ligand †. *Biochemistry* [online]. 2000, **39**(31), 9311-9316 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1021/bi000482r. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi000482r>
- [81] PILLICH, R.T., G. SCARSELLA, G. GALATI, L. IZZO, A. IACOANGELI, M. CASTELLI a G. RISULEO. The diimide drug PIPER has a cytotoxic dose-dependent effect in vitro and inhibits telomere elongation in HELA cells. *Anticancer research* [online]. 2005, **25**(5), 3341-3346 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <http://ar.iiarjournals.org/content/25/5/3341.long>
- [82] TAKA, Thanachai, Liming HUANG, Ariyaphong WONGNOPPAVICH, Suk-Wah TAM-CHANG, T. LEE a Wirote TUNTIWECHAPIKUL. Telomere shortening and cell senescence induced by perylene derivatives in A549 human lung cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* [online]. 2013, **21**(4), 883-890 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.12.020. ISSN 09680896. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089612009911>

- [83] GOWAN, S.M., J.R. HARRISON, L. PATTERSON, M. VALENTI, M.A. READ, S. NEIDLE a L.R. KELLAND. A G-Quadruplex-Interactive Potent Small-Molecule Inhibitor of Telomerase Exhibiting in Vitro and in Vivo Antitumor Activity. *Molecular Pharmacology* [online]. 2002, **61**(5), 1154-1162 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1124/mol.61.5.1154. Dostupné z: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/61/5/1154.long>
- [84] MACHIREDDY, Babitha, Gurmanna KALRA, Subash JONNALAGADDA, Kandam RAMANUJACHARY a Chun WU. Probing the Binding Pathway of BRACO19 to a Parallel-Stranded Human Telomeric G-Quadruplex Using Molecular Dynamics Binding Simulation with AMBER DNA OL15 and Ligand GAFF2 Force Fields. *Journal of Chemical Information and Modeling* [online]. 2017, **57**(11), 2846-2864 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00287. ISSN 1549-9596. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.7b00287>
- [85] 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 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.3390/molecules24030396. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/3/396>
- [86] PERRONE, R., E. BUTOVSKAYA, D. DAELEMANS, G. PALU, C. PANNECOUQUE a S. RICHTER. Anti-HIV-1 activity of the G-quadruplex ligand BRACO-19. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2014, **69**(12), 3248-3258 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1093/jac/dku280. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dku280>
- [87] CHEN, Bing-Jia, Yan-Ling WU, Yoshimasa TANAKA a Wen ZHANG. Small Molecules Targeting c-Myc Oncogene: Promising Anti-Cancer Therapeutics: Promising Anti-Cancer Therapeutics. *International Journal of Biological Sciences* [online]. 2014, **10**(10), 1084-1096 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.7150/ijbs.10190. ISSN 1449-2288. Dostupné z: <http://www.ijbs.com/v10p1084.htm>
- [88] ADAN, Aysun, Yağmur KIRAZ a Yusuf BARAN. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2016, **17**(14), 1213-1221 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.2174/1389201017666160808160513. ISSN 13892010. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/144610/article>
- [89] STODDART, Martin. Cell Viability Assays: Introduction. *Mammalian Cell Viability* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, **740**, 1-6 [cit. 2019-04-19]. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6_1. ISBN 978-1-61779-107-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- [90] MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1983, **65**(1-2), 55-63 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>
- [91] STOCKERT, Juan, Alfonso BLÁZQUEZ-CASTRO, Magdalena CAÑETE, Richard HOROBIN a Ángeles VILLANUEVA. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* [online].

- 2012, **114**(8), 785-796 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.01.006. ISSN 00651281. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065128112000190>
- [92] SARAVANAN, B.C., C. SREEKUMAR, G.C. BANSAL, D. RAY, J.R. RAO a A.K. MISHRA. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology* [online]. 2003, **113**(3-4), 211-216 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/S0304-4017(03)00062-1. ISSN 03044017. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401703000621?via%3Dihub#!>
- [93] JUN, Y., Y.J. SHI a M. XU. A new method for antimicrobial susceptibility testing of in vitro-cultured bacteria by means of resonance light scattering technique. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2008, **18**(1), 118-123 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2008&vol=18&num=1&page=118>
- [94] ETXEBERRIA, Aitzol, Sorkunde MENDARTE a Santiago LARREGLA. Determination of viability of *Phytophthora capsici* oospores with the tetrazolium bromide staining test versus a plasmolysis method. *Revista Iberoamericana de Micología* [online]. 2011, **28**(1), 43-49 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/j.riam.2010.11.005. ISSN 11301406. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140610001129>
- [95] SCUDIERO, D., R. SHOEMAKER, K. PAULL et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* [online]. 1988, **48**(17), 4827-4833 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/48/17/4827.long>
- [96] GOODWIN, C.J., S.J. HOLT, S. DOWNES a N.J. MARSHALL. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1995, **179**(1), 95-103 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/0022-1759(94)00277-4. ISSN 00221759. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175994002774>
- [97] ISHIYAMA, M. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* [online]. 1997, **44**(7), 1299-1305 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/S0039-9140(97)00017-9. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914097000179>
- [98] LUTTER, Anne-Helen, Jenny SCHOLKA, Heiko RICHTER, Ursula ANDERER, M. JÜNGER, A. KRÜGER-GENGE a F. JUNG. Applying XTT, WST-1, and WST-8 to human chondrocytes: A comparison of membrane-impermeable tetrazolium salts in 2D and 3D cultures. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* [online]. 2017, **67**(3-4), 327-342 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.3233/CH-179213. ISSN 13860291.

- [99] O'BRIEN, John, Ian WILSON, Terry ORTON a François POGNAN. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* [online]. 2000, **267**(17), 5421-5426 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x. ISSN 00142956. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- [100] UZARSKI, Joseph, Michael DIVITO, Jason WERTHEIM a William MILLER. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* [online]. 2017, **129**, 163-175 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.015. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961217300893>
- [101] LOMAKINA, G., Yu. MODESTOVA a N. UGAROVA. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2015, **80**(6), 701-713 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1134/S0006297915060061. ISSN 0006-2979. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0006297915060061>
- [102] VICHAI, Vanicha a Kanyawim KIRTIKARA. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(3), 1112-1116 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1038/nprot.2006.179. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.179>
- [103] PAPAISIS, K.T, G.D GEROMICHALOS, K.A DIMITRIADIS a A.H KORTSARIS. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1997, **208**(2), 151-158 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/S0022-1759(97)00137-3. ISSN 00221759. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175997001373>
- [104] KUETE, V., O. KARAOSMANOĞLU a H. SIVAS. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* [online]. Elsevier, 2017, , 271-297 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8. ISBN 9780128092866. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128092866000108>
- [105] ECACC cell line profiles. *Culture Collections* [online]. Salisbury: Public Health England, b.r. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/search.jsp>
- [106] HERNÁNDEZ-VARGAS, Héctor, Esteban BALLESTAR, Pedro CARMONA-SAEZ, Cayetano VON KOBBE, Inmaculada BAÑÓN-RODRÍGUEZ, Manel ESTELLER, Gema MORENO-BUENO a José PALACIOS. Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5-Fluorouracil: Relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53. *International Journal of Cancer* [online]. 2006, **119**(5), 1164-1175 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1002/ijc.21938. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21938>
- [107] WęSIERSKA-GąDEK, Józefa, David GRITSCH, Nora ZULEHNER, Oxana KOMINA a Margarita MAURER. Roscovitine, a selective CDK inhibitor, reduces the basal and estrogen-induced phosphorylation of ER- α in human ER-positive breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2011, **112**(3), 761-

- 772 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1002/jcb.23004. ISSN 07302312. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.23004>
- [108] TOMANKOVA, Katerina, Katerina POLAKOVA, Klara PIZOVA et al. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2015, **10**, 949–961 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.2147/IJN.S72590. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/in-vitro-cytotoxicity-analysis-of-doxorubicin-loadedsuperparamagnetic-peer-reviewed-article-IJN>
- [109] XING, Yingying, Weiwei BAO, Xiaobo FAN, Kunmei LIU, Xiaokang LI a Tao XI. A novel oxaliplatin derivative, Ht-2, triggers mitochondrion-dependent apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis* [online]. 2015, **20**(1), 83-91 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1007/s10495-014-1044-6. ISSN 1360-8185. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-014-1044-6>
- [110] BARZEGAR, E., S. FOULADDEL, T.K. MOVAHHED, S. ATASHPOUR, M.H. GHAHREMANI, S.N. OSTAD a E. AZIZI. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. *Iranian journal of basic medical sciences* [online]. 2015, **18**(4), 334 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439447/>
- [111] SENGUPTA, Devashish, Zeaul MAZUMDAR, Avinaba MUKHERJEE, Debdulal SHARMA, Amit HALDER, Samita BASU a Tarun JHA. Benzamide porphyrins with directly conjugated and distal pyridyl or pyridinium groups substituted to the porphyrin macrocycles: Study of the photosensitising abilities as inducers of apoptosis in cancer cells under photodynamic conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2018, **178**, 228-236 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.014. ISSN 10111344. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417309466>
- [112] WU, Fei, Yong SHAO, Kun MA, Qinghua CUI, Guiying LIU a Shujuan XU. Simultaneous fluorescence light-up and selective multicolor nucleobase recognition based on sequence-dependent strong binding of berberine to DNA abasic site. *Organic & biomolecular chemistry* [online]. 2012, **10**(16), 3300-7 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1039/c2ob00028h. ISSN 1477-0520. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ob00028h>
- [113] AGNARELLI, Alessandro, Marco NATALI, Mercedes GARCIA-GIL et al. Cell-specific pattern of berberine pleiotropic effects on different human cell lines. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1038/s41598-018-28952-3. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-28952-3>
- [114] WANG, Yugang, Michael KHEIR, Yushuang CHAI, Jun HU, Dongming XING, Fan LEI, Lijun DU a Vladimir UVERSKY. Comprehensive Study in the Inhibitory Effect of Berberine on Gene Transcription, Including TATA Box. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(8), 23495 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1371/journal.pone.0023495. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023495>

- [115] SHAH, Amy, Taylor CANNON, James HIGGINBOTHAM, Robert COFFEY a Melissa SKALA. Autofluorescence flow sorting of breast cancer cell metabolism. *Journal of Biophotonics* [online]. 2017, **10**(8), 1026-1033 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1002/jbio.201600128. ISSN 1864063X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201600128>
- [116] BONUCCELLI, Gloria, Ernestina DE FRANCESCO, Rianne DE BOER, Herbert TANOWITZ a Michael LISANTI. NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of Vitamin C and CAPE as natural products targeting “stemness. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(13), 20667–20678 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.18632/oncotarget.15400. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/15400>
- [117] SNYDER, John, John LAMBERT a Peter OGILBY. 5,10,15,20-Tetrakis(N-Methyl-4-Pyridyl)-21H,23H-Porphine (TMPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation-dependent Behavior of TMPyP in a Single Cell†. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2006, **82**(1), 2005-05-30-553 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1562/2005-05-30-RA-553. ISSN 0031-8655. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1562/2005-05-30-RA-553>
- [118] ZHOU, Guangtong, Xinrui LIU, Yunqian LI, Songbai XU a Chengyuan MA. 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 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.18632/oncotarget.7483. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4924762/>
- [119] 5-Fluorouracil|5-FU|CAS 51-21-8. In: *MedchemExpress.com* [online]. b.r. [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <https://www.medchemexpress.com/5-Fluorouracil.html>
- [120] YACOUB, Tyrone J., Allam S. REDDY a Igal SZLEIFER. Structural Effects and Translocation of Doxorubicin in a DPPC/Chol Bilayer: The Role of Cholesterol. *Biophysical Journal* [online]. 2011, **101**(2), 378-385 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.06.015. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349511007120>
- [121] KWOK, Chun a Catherine MERRICK. G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application. *Trends in Biotechnology* [online]. 2017, **35**(10), 997-1013 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.06.012. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779917301610>
- [122] DAY, Henry, Pavlos PAVLOU a Zoë WALLER. *I-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands* [online]. 2014, **22**(16), 4407-4418 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.05.047. ISSN 09680896. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089614004064>
- [123] 96 Well Plate Template. *WED-EASE.COM* [online]. 2019 [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <http://wed-ease.com/96-well-plate-template-20549/>

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosintrifosfát
BF	mikroskopie ve světlém poli (Bright-field microscopy)
BRACO-19	<i>N,N'</i> -(9-(4-(dimethylamino)phenylamino)akridin-3,6-diyl)bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propanamid)
Cdk	cyklin-dependentní kinasa
Cisplatina	cis-diammin-dichlorido-platnatý komplex
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
HEK293FT	lidské embryonální ledvinové buňky
HeLa	nádorové epiteliální buňky
G4	G-kvadruplex
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
iM	I-motiv
MCF7	buněčná linie karcinomu prsu
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid (methyl-thiazolyl-tetrazolium)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PIPER	<i>N,N'</i> -bis[2-(1-Piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide
PMS	fenazin methosulfát
RNA	ribonukleová kyselina
Roskovitin	(R)-2-((6-(benzylamino)-9-isopropyl-9H-purin-2-yl) amino) butan-1-ol
SRB	Sulforhodamine B
TERRA	Telomeric Repeat-containing RNA
TFO	oligonukleotid tvořící triplex (triplex-forming oligonucleotide)
TMPyP	5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)

WST-1	4-[3-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát sodná sůl
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium monosodná sůl
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid