

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: Molekulární biologie (5)

Tvorba 1D nanostruktur z DNA a RNA G-kvadruplexů

Formation of 1D nanostructures from DNA and RNA
G-quadruplexes

Autor: Amálie Šmidová

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Brno, Žižkova 55, Žižkova
630/55, 602 00 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Mgr. Jaroslav Malina, Ph.D.

Rok: 2026

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Beru na vědomí, že nejpozději odevzdáním slovesné vědecké práce do veřejné soutěže Středoškolská odborná činnost, stejně jako odevzdáním jejích příloh a dalších připojených děl, např. audiovizuálních, fotografických, výtvarných, architektonických apod. (dále jen „soutěžní dílo“), dochází ke zveřejnění díla podle § 4 odst. 1 zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „autorský zákon“). Totéž platí pro pozdější odevzdání doplněného, změněného, upraveného nebo opraveného díla.

Beru na vědomí, že zveřejněním díla, jehož součástí je vynález, se tento vynález stává součástí stavu techniky podle § 5 odst. 1, 2 zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech, průmyslových vzorech a zlepšovacích návrzích, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „patentový zákon“), což zakládá překážku pro udělení patentu podle § 3 odst. 1 patentového zákona.

Beru na vědomí, že vyhlášovatel soutěže je podle § 61 odst. 1 autorského zákona per analogiam oprávněn užít soutěžní dílo pro účely zajištění průběhu soutěže, zejména k zajištění transparentnosti soutěže a veřejnosti obhajob soutěžních prací. V odůvodněném rozsahu je tedy vyhlášovatel po dobu účasti autora v soutěži oprávněn zejména:

- zhotovovat rozmnoženiny díla, je-li to nezbytné k seznámení účastníků soutěže, porotců nebo veřejnosti se soutěžní prací;
- zapůjčit originál nebo rozmnoženinu díla účastníkům soutěže, porotcům nebo veřejnosti. Přitom dbá na bezpečné nakládání s dílem;
- vystavovat originál nebo rozmnoženinu díla v průběhu soutěžních přehlídek a doprovodných akcí;
- sdělovat dílo veřejnosti v nehmotné podobě, a to především počítačovou nebo obdobnou sítí.

Dále prohlašuji, že při tvorbě této práce jsem použil/a nástroj generativního modelu AI Gemini (model Flash 3); <https://gemini.google.com> za účelem kontroly gramatiky a případné úpravy textu. Po použití tohoto nástroje jsem provedl/a kontrolu obsahu a přebírám za něj plnou zodpovědnost.

Ve Křtinách dne 9.2.2026

Amálie Šmidová

Poděkování

Mé největší poděkování patří panu Mgr. Jaroslavu Malinovi, Ph.D., z Biofyzikálního ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i., který mi umožnil tuto práci realizovat. Byl mi učitelem, dal mi příležitost naučit se nové věci a získat cenné zkušenosti. Děkuji mu také za možnost využívat prostory ústavu, přístroje a materiály, a zejména za jeho ochotu, trpělivost a pevné nervy, které se se mnou mnohdy opravdu hodily.

Ráda bych rovněž poděkovala Mgr. Martinovi Krejčímu, profesorovi z GML, za podporu a vstřícný přístup při řešení různých překážek.

Velké díky patří také mé rodině a kamarádům za povzbuzení a trpělivost. Speciální poděkování patří mým rodičům za jejich neustálou podporu.

Anotace

Hlavní náplní této práce bylo zobrazování 1D nanostruktur DNA a RNA G-kvadruplexů a studium jejich stability za různých podmínek. K výzkumu byly použity čtyři oligonukleotidy (G4T2G4, 1-3p G4, G2AG4AG2 a G4C2G4), které byly připraveny a analyzovány pomocí metod cirkulárního dichroismu (CD) a UV spektroskopie. Bylo zjištěno, že G-kvadruplexy vznikají nejefektivněji v přítomnosti pufrů s vysokým obsahem draslíku a že jsou stabilní při pokojové teplotě. Dalším krokem bylo zobrazování těchto nanostruktur pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM), což umožnilo potvrdit jejich prostorovou organizaci a morfologii. Poznatky této práce přispívají k lepšímu porozumění tvorby a stability G-kvadruplexů, což je zásadní pro jejich využití v nanotechnologii, supramolekulární chemii, potenciálně také v selektivní terapii nádorových onemocnění a v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními, jako je ALS a FTD.

Klíčová slova: G-kvadruplexy, DNA, RNA, nanostruktury, neurodegenerativní onemocnění

Anotation

The main focus of this work was the imaging of 1D DNA and RNA G-quadruplex nanostructures and the study of their stability under various conditions. Four oligonucleotides (G4T2G4, 1-3p G4, G2AG4AG2, and G4C2G4) were used for the research, which were prepared and analyzed using circular dichroism (CD) and UV spectroscopy methods. It was found that G-quadruplexes form most efficiently in the presence of buffers with a high potassium content and that they are stable at room temperature. The next step was to image these nanostructures using atomic force microscopy (AFM), which confirmed their spatial organization and morphology. The findings of this work contribute to a better understanding of the formation and stability of G-quadruplexes, which is essential for their use in nanotechnology, supramolecular chemistry, and potentially also in selective cancer therapy and in connection with neurodegenerative diseases such as ALS and FTD.

Keywords: G-quadruplexes, DNA, RNA, nanostructures, neurodegenerative diseases

Obsah

1 ÚVOD	9
1.1 Nukleové kyseliny	9
1.1.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)	9
1.1.2 Ribonukleová kyselina (RNA)	9
1.2 G-kvadruplexy	11
1.2.1 Úvod ke G-kvadruplexům	11
1.2.2 Vznik G-kvadruplexů	12
1.2.3 Struktura G-kvadruplexů	13
1.2.4. Existence G-kvadruplexů v oblasti telomer	15
1.2.5. Terapeutický potenciál stabilizace telomerického G-kvadruplexu jako možná léčba nádorových onemocnění	16
1.2.6. G-kvadruplexy v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními	17
1.3. Mikroskopie atomárních sil (AFM)	18
1.3.1. Úvod k mikroskopii atomárních sil	18
1.3.2. Poklepový režim AFM	19
1.4. Ověřovací metody	20
1.4.1. Cirkulární dichroismus spektroskopie	20
1.4.2. UV spektroskopie (rozpuštění)	22
1.4.3. Další ověřovací metody	22
2 CÍL PRÁCE	23
3.1 Použité oligonukleotidy a příprava zásobních roztoků	23
3.2 Stanovení koncentrací a příprava pracovních vzorků	24
3.3 Metody strukturní charakterizace	25
3.3.1 Cirkulární dichroismus (CD spektroskopie)	25
3.3.2 UV-Vis spektroskopie	29
3.3.3 Mikroskopie atomárních sil (AFM)	30

4 VÝSLEDKY	36
4.1 Morfologie struktur při nízké iontové síle	36
4.2 Morfologie struktur při zvýšené iontové síle	38
5 DISKUZE	40
5.1 Interpretace CD spekter a konformační analýza	40
5.2 Termostabilita a UV spektroskopie	41
5.3 Morfologie nanostruktur a AFM mikroskopie.....	41
5.4 Biologický a terapeutický význam	41
6 ZÁVĚR	41
7 POUŽITÁ LITERATURA	43
8 Seznam obrázků	45
9 SEZNAM TABULEK.....	47
10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	47
11 SEZNAM PŘÍLOH	48
12 PŘÍLOHY	49
Příloha 1: CD spektroskopie	49
Příloha 2: UV spektroskopie	52

1 ÚVOD

1.1 Nukleové kyseliny

1.1.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

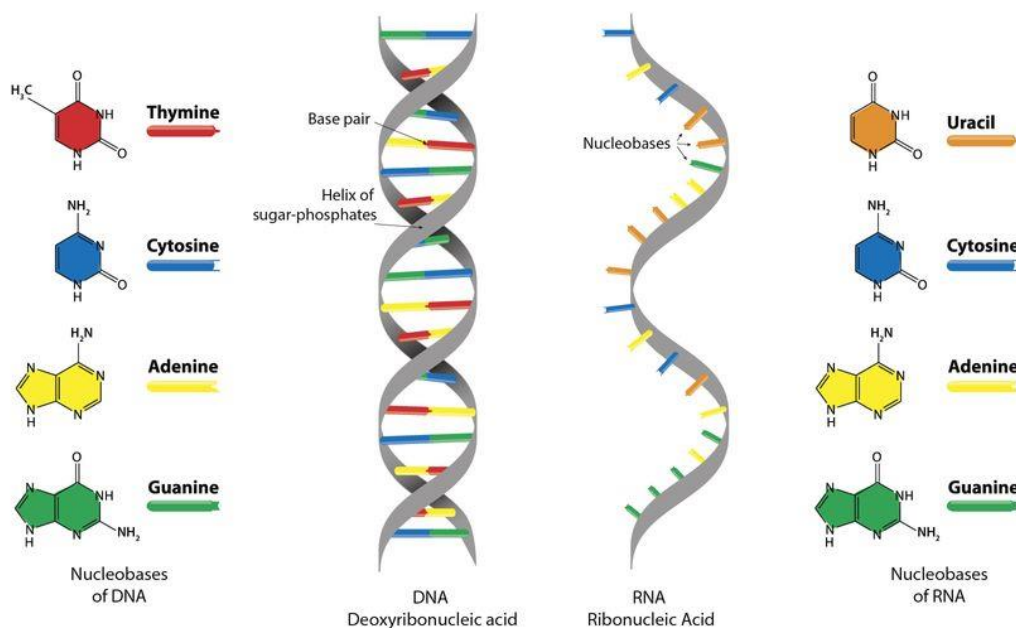
Jedná se o klíčovou molekulu nesoucí veškerou genetickou informaci živých organismů. Tvoří ji dva antiparalelní polynukleotidové řetězce, které jsou navzájem propojeny vodíkovými můstky mezi dusíkatými bázemi a stočeny do charakteristické dvoušroubovice. Tuto složitou strukturu DNA utvářejí nukleotidy, které představují základní jednotky polynukleotidového řetězce. Nukleotid tvoří tři hlavní komponenty, jimiž jsou cukerná složka, monosacharid 2-deoxy-D-ribóza (zkráceně deoxyribóza), dusíkaté báze a fosfátové skupiny (PO_4^{3-}). Molekula deoxyribózy se skládá z pěti atomů uhlíku, které jsou označovány čísly 1' - 5' a od strukturně podobné ribózy se odlišuje tím, že na pozici uhlíku 2' je navázaný pouze vodík, a nikoliv hydroxylová skupina. Na atomy uhlíku v pozici 3' a 5' jsou kovalentní fosfodiesterovou vazbou navázané fosfátové skupiny, díky nimž mají polynukleotidové řetězce jiné označení tedy buď číslo 3', anebo 5'. Poslední, třetí komponent – již zmíněné dusíkaté báze – je navázán kovalentní N-glykosidickou vazbou na atomu uhlíku zaujímajícím pozici 1'. Báze jsou heterocyklické sloučeniny, které odvozujeme od purinu nebo pyrimidinu. Mezi purinové báze se řadí adenin (A) a guanin (G) a mezi pyrimidové (obsažené v DNA) se řadí cytosin (C) a thymín (T). Tyto báze jsou navzájem komplementární, tedy adenin se vždy páruje s thyminem (A-T) a guanin s cytosinem (G-C). Na základě přítomnosti konkrétní dusíkaté báze se rozlišují adeninové, guaninové, cytosinové a thyminové nukleotidy. Ty jsou v DNA uspořádány za sebou v určitém pořadí neboli sekvenci a každý gen je v DNA zapsán jako charakteristická sekvence nukleotidů. K objasnění struktury DNA (viz Obr. 1) přispěla řada vědců, mezi nejznámější patří americký biolog James Dewey Watson (1928) a britský fyzik Francis Harry Compton Crick (1916–2004). Zásadní význam však měla také práce britské chemičky Rosalind Franklinové (1920–1958), jejíž rentgenografické snímky DNA významně přispěly k odhalení její prostorové struktury. Watson, Crick a Maurice Wilkins získali za tento objev v roce 1962 Nobelovu cenu. [1]

1.1.2 Ribonukleová kyselina (RNA)

Tato molekula je nezbytnou součástí proteosyntézy neboli syntézy proteinů, což je základní proces, při němž se informace obsažená v DNA převádí do podoby konkrétního znaku. Ribonukleová kyselina je, stejně jako deoxyribonukleová kyselina, tvořena polynukleotidovým řetězcem, avšak vytváří velmi rozmanité struktury. Její molekuly mohou být jednořetězcové a

lineární, jiné však vykazují složitější uspořádání, v němž se mohou vyskytovat i dvouřetězcové oblasti, například u transferové RNA. Podobně jako DNA obsahuje RNA cukernou složku, již zmíněnou ribózu, jejíž jednotky jsou rovněž propojeny fosfátovými skupinami prostřednictvím fosfodiesterových vazeb. Na ribózovém uhlíku v pozici 1' je navázaná dusíkatá báze, ale zde se objevuje další odlišný aspekt od DNA. Tím je výskyt pyrimidové báze uracilu (U) místo thyminu (T). Uracil tvoří stejně jako thymin komplementární pár s adeninem (A-U). Ostatní dusíkaté báze – adenin, guanin a cytosin – jsou totožné v obou nukleových kyselinách, viz Obr. 1. [2] Objev a charakterizace RNA byla výsledkem práce mnoha vědců. Mezi nejvýznamnější patří Severo Ochoa (1905–1993), který izoloval enzym pro syntézu RNA [3], Robert W. Holley (1922–1993), jenž sekvenoval první tRNA [4], Marshall Nirenberg a Har Gobind Khorana, kteří objasnili roli RNA v proteosyntéze [5], a Thomas Cech (1947), který objevil katalytické schopnosti RNA, tzv. ribozymy. [6]

Na strukturální a chemické vlastnosti RNA navazují její klíčové funkce v procesu proteosyntézy, který probíhá ve dvou základních krocích – transkripci a translaci. Prvním krokem proteosyntézy je transkripce, tedy proces přepisu genetické informace. Během této fáze je nukleotidová sekvence určitého genu přenesena z DNA do mediátorové RNA. Tento přepis probíhá v buněčném jádře a je zajišťován enzymem RNA polymerázou. Výsledným produktem transkripce je lineární molekula mRNA, přičemž jako matrice pro její syntézu slouží jedno z vláken DNA. RNA polymeráza se váže na templátové vlákno DNA v oblasti začátku genu a na základě principu komplementarity postupně připojuje odpovídající ribonukleotidy, čímž vzniká nový řetězec RNA. Zdrojem ribonukleotidů jsou nukleotidtrifosfáty (NTP), z nichž se při syntéze odštěpuje pyrofosfát a uvolněná energie je využita k tvorbě fosfodiesterových vazeb. Stejně jako při replikaci DNA probíhá elongace RNA ve směru 5' - 3'. Po dosažení konce přepisovaného genu se hotová molekula mRNA odděluje od komplexu s RNA polymerázou. Druhou fází proteosyntézy je translace, označovaná také jako překlad. Tento proces probíhá v cytoplazmě, kde se na molekulu mRNA vážou ribozomy. Ribozomy jsou buněčné struktury složené z ribozomální RNA (rRNA) a specifických proteinů. Váží se na 5'-konec mRNA, který odpovídá začátku genu v molekule DNA. Od tohoto místa dochází k postupné syntéze polypeptidového řetězce na základě informace obsažené v mRNA. Translací se rozumí převod genetické informace z nukleotidové sekvence mRNA do pořadí aminokyselin v proteinu. Jednotlivé aminokyseliny jsou k ribozomu dopravovány pomocí transferové RNA (tRNA), která zajišťuje jejich správné zařazení do vznikajícího proteinového řetězce. [7]



Obrázek 1: Porovnání DNA a RNA struktur (Zdroj: RJ Mackenzie, 2024)

1.2 G-kvadruplexy

1.2.1 Úvod ke G-kvadruplexům

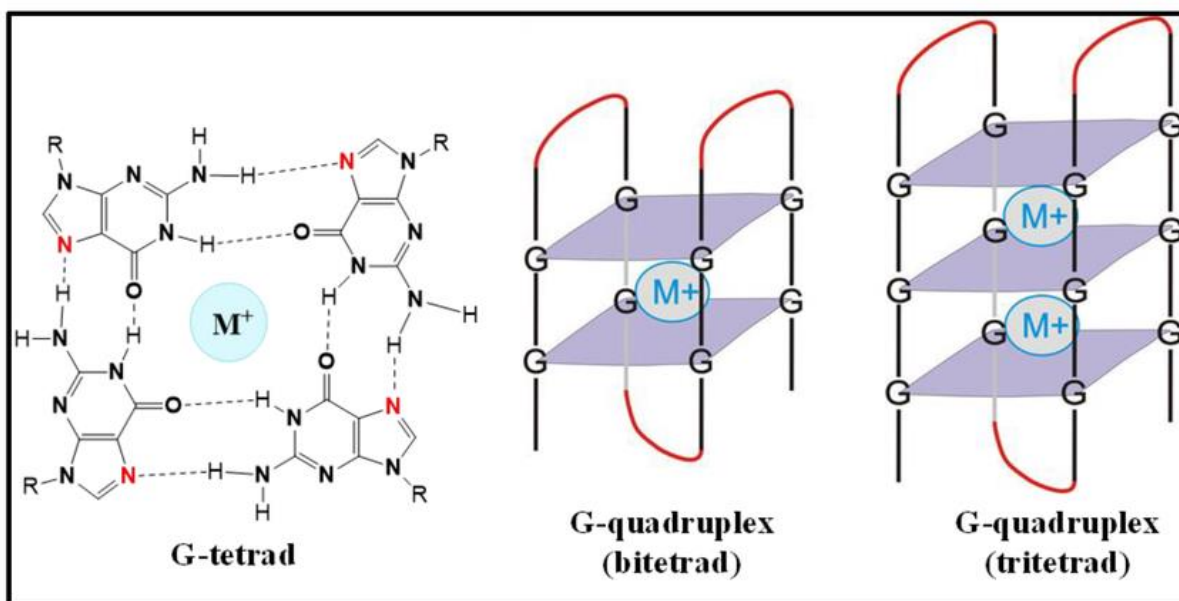
Už v roce 1910 Bang upozornil na skutečnost, že koncentrované roztoky guanosinu vykazují výraznou tendenci k samoasociaci, která vede ke vzniku polykrystalických gelů. Povaha tohoto neobvyklého chování však zůstávala po dalších přibližně padesát let nejasná. Teprve v roce 1962 umožnil rozvoj krystalografických metod poprvé doložit, že guaninové báze mohou vytvářet tetramerní uspořádání, z něhož se následně skládají rozsáhlé helikální struktury. V následujících zhruba pětadvaceti letech byla možná biologická role G-kvadruplexů studována pouze okrajově. Zásadní zlom nastal ve chvíli, kdy bylo zjištěno, že oligonukleotidy odpovídající guaninem bohatým telomerickým sekvencím DNA vykazují nečekaně vysokou elektroforetickou mobilitu v nedenaturujících polyakrylamidových gelech. Na základě těchto pozorování dospěly dvě na sobě nezávislé výzkumné skupiny k závěru, že guaninem bohaté sekvence přítomné v chromozomech eukaryotických buněk, včetně jednovláknového 3'-přesahu telomer, mají schopnost formovat čtyřvláknové struktury DNA.

V současnosti je výzkum G-kvadruplexů předmětem intenzivního zájmu, neboť sekvence schopné tyto struktury vytvářet byly identifikovány v řadě biologicky významných oblastí genomu, například v telomerách a promotorových regionech lidských onkogenů. Bioinformatické analýzy odhalily přibližně 375 000 potenciálních kvadruplex-tvořících

sekvencí v lidském genomu, přičemž se předpokládá, že značná část z nich vzniká náhodně a vykazuje pouze omezenou stabilitu. Další studie ukázaly, že schopnost tvorby G-kvadruplexů není omezena pouze na DNA, ale týká se i řady mRNA obsahujících guaninem bohaté sekvence, což naznačuje možnou úlohu RNA kvadruplexů v biologických procesech. Význam G-kvadruplexových struktur spočívá nejen v jejich zapojení do regulace transkripce a translace, ale také v jejich potenciálním využití ve farmaceutickém výzkumu. V posledních letech roste zájem o cílené ovlivňování těchto procesů s cílem vývoje nových terapeutických přístupů. Podrobná znalost struktury G-kvadruplexů je klíčová pro racionální návrh malých molekul schopných selektivní vazby na tyto motivy, které mohou specificky modulovat genovou expresi nebo inhibovat aktivitu telomerázy, stejně jako pro vývoj aptamerů s vysokou afinitou k vybraným proteinům. Nedávné experimentální studie navíc poskytují důkazy o existenci a funkci G-kvadruplexů přímo v živých organismech. Vědecká komunita si zároveň uvědomila značný potenciál guanosinu a jeho derivátů v oblasti seberozpoznávání a sebeuspořádání i jejich schopnost interagovat s dalšími biologicky významnými molekulami. Tyto vlastnosti stály také u zrodu Akce COST MP0802 (Evropská spolupráce ve vědě a technologii, 2008-2012), jejímž cílem byl návrh nových molekulárních architektur založených na kvadruplexových motivech. Spektrum možných aplikací kvadruplexů v supramolekulární a materiálové vědě je velmi široké a zahrnuje například konstrukci biosenzorů, nanostrojů či G-drátů, které mohou sloužit jako základ pro vývoj pokročilých biomateriálů. [8]

1.2.2 Vznik G-kvadruplexů

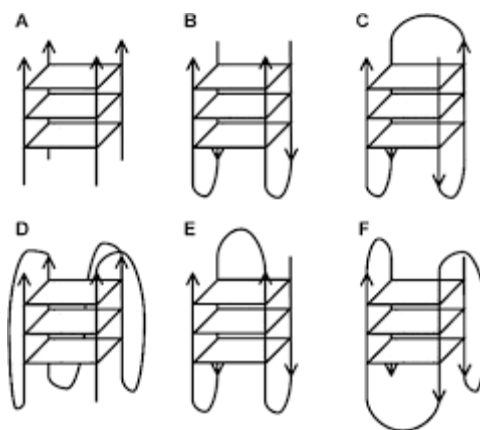
Nukleové kyseliny, tedy DNA a RNA, mohou tvořit různé druhy sekundárních struktur, mezi něž patří i G-kvadruplexy. Ty se objevují v oblastech bohatých na guanin. Čtyři guaninové báze se spojují prostřednictvím Hoogsteenova párování a vytvářejí planární strukturu zvanou G-kvartet, která tvoří základní stavební blok každého G-kvadruplexu. Každá báze se účastní dvou vodíkových vazeb, funguje tedy zároveň jako donor i akceptor. Vznik G-kvadruplexu je podmíněn přítomností monovalentních kationtů, nejčastěji draslíku (K^+) a v menší míře sodíku (Na^+) nebo amonia (NH^+). Poloha těchto iontů závisí na jejich druhu – sodné ionty se umísťují do roviny s G-kvartetem, zatímco draselné a amoniové ionty se nacházejí mezi dvěma po sobě jdoucími kvartety. Složením více G-kvartetů nad sebe vzniká kompletní G-kvadruplex, viz Obr. 2. Tyto struktury mohou vzniknout různými způsoby: spojením čtyř samostatných řetězců DNA nebo RNA, dimerizací dvou řetězců, z nichž každý obsahuje dva G-trakty, nebo intramolekulárním skládáním jednoho řetězce, který obsahuje čtyři či více sekvencí bohatých na guanin. [9-10]



Obrázek 2: Chemická struktura G-kvartetu s centrálním kovovým kationtem, dvouúrovňové a tříúrovňové G-kvadruplexy
(Zdroj: Hoque et al., 2022)

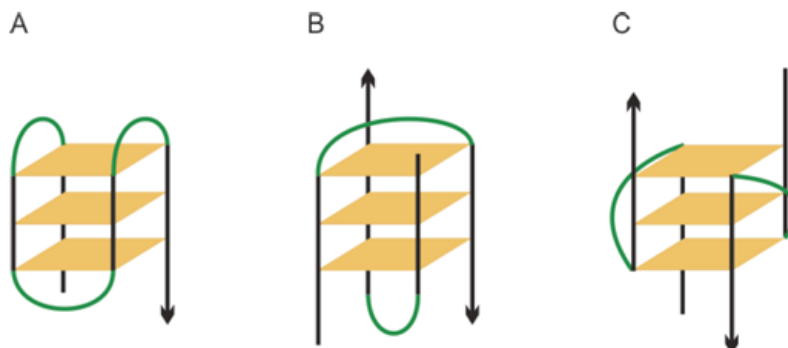
1.2.3 Struktura G-kvadruplexů

Rozlišuje se několik typů G-kvadruplexů a to podle počtu a orientace jejich vláken. Jedním vláknem nukleonové kyseliny, které obsahuje přinejmenším čtyři úseky bohaté na guanin, jsou tvořeny tzv. intramolekulární G-kvadruplexy. Dalším typem jsou tzv. intermolekulární G-kvadruplexy, přičemž ty jsou tvořeny ze dvou až až ze čtyř různých vláken nukleonové kyseliny. Podle orientace vlákna rozlišujeme kvadruplexy paralelní, tedy všechna vlákna mají stejnou orientaci, poté antiparalelní, u nich jsou dvě vlákna orientovaná jedním směrem a další dvě v opačném, a na závěr kvadruplexy smíšené, přičemž ty mají tři vlákna orientovaná jedním směrem, a to čtvrté opačným. Konkrétně paralelní kvadruplexní konformace znamená, že všechny nukleosidy jednotlivých G-kvartetů mají stejnou konformaci glykosidické vazby (*anti. anti. anti. anti* nebo *syn. syn. syn. syn*). G-kvartety v antiparalelních kvadruplexech obsahují dva guanosiny v *syn* konformaci a další dva v *anti* konformaci (*syn. syn. anti. anti* a *syn. anti. syn. anti*). Ve smíšeném (nebo také hybridním) typu, paralelní – antiparalelní (3+1) G-kvadruplexech, mají tři guanosiny stejnou konformaci, zatímco čtvrtý zbývajících má opačnou (*syn. anti. anti. anti* nebo *anti. syn. syn. syn*), viz Obr. 3.



Obrázek 3: Možnosti uspořádání G-kvadruplexů podle počtu a uspořádání vláken nukleových kyselin; tetramolekulární paralelní (A), bimolekulární antiparalelní (B), monomolekulární antiparalelní (C), monomolekulární paralelní (D), monomolekulární antiparalelní (E), monomolekulární smíšený (F) G-kvadruplex (Zdroj: Hubálková, 2015)

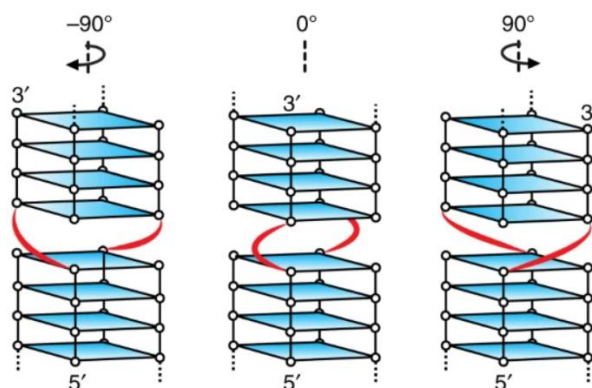
Guaninové úseky jsou propojeny smyčkami proměnné velikosti a sekvence. Existují tři různé typy smyček. Okrajové smyčky (označované také jako laterální smyčky) spojují dvě sousední antiparalelní vlákna. Diagonální smyčky spojují dvě protilehlá antiparalelní vlákna. Dvojitě smyčky s obráceným řetězcem (známé také jako vrtulové smyčky) spojují sousední paralelní řetězce, viz Obr. 4.



Obrázek 4: Schematické diagramy znázorňující možné uspořádání spojovacích smyček: okrajové (A), diagonální (B) a dvojitě řetězové reverzní smyčky (C) (Zdroj: Małgowska et al., 2012)

K ještě větší složitosti struktury kvadruplexů přispívá i možná rotační variace na rozhraní, kde se jeden čtyřvrstvý blok G-kvadruplexu setkává s jiným. Například u modelu s prokluzovaným řetězcem jsou spoje rozhraní propojeny TT linkerem, což by mohlo umožnit blokům G-kvadruplexu přijmout tři různé rotační konformery. Tyto různé rotamery definujeme jako -90° , 0° a $+90^\circ$ na základě jejich relativní rotace od přirozeného postupu páteře ve směru $5' - 3'$ řetězce, viz Obr. 5. Struktury G-kvadruplexů vykazují vysoký stupeň strukturního polymorfismu, pokud jde o nukleotidovou sekvenci, orientaci vláken, syn/anti glykosidickou

konformaci guaninů, šířku drážek, sekvencí a délku smyček. Za různých podmínek, jako je určitá koncentrace, pH, teplota, typ soli a její koncentrace, typ pufru atd., může docházet ke konformačním změnám G-kvadruplexů. Kombinované použití několika metod může poskytnout strukturní informace právě o těchto změnách (viz ověřovací metody). [11–12]



Obrázek 5: Rotamery - 90°, 0° a + 90° (Zdroj: Bose et al., 2018)

1.2.4. Existence G-kvadruplexů v oblasti telomer

Koncové části eukaryotických chromozomů se označují jako telomery a jejich hlavní funkcí je chránit genom před ztrátou dědičné informace. Kromě toho telomery pomáhají rozlišit konce chromozomů od míst poškozené DNA, čímž zabráňují spuštění mechanismů opravy DNA na správných koncích. Telomery tvoří nukleoproteinové komplexy, které se skládají z repetitivních úseků DNA bohaté na guanin a ze specifických proteinů, souhrnně nazývaných shelterin. Délka a sekvence telomerické DNA se liší mezi jednotlivými organismy. U lidí jsou telomery při narození dlouhé přibližně 15-20 kb a obsahují repetitivní sekvenci 5'-(TTAGGG) $_n$ -3' s jednořetězcovým přesahem na 3'-konci. Počet buněčných dělení je částečně určen délkou telomer, protože při každém dělení se ztrácí zhruba 50-100 nukleotidů – DNA polymerasa totiž není schopna replikačně prodloužit řetězec až ke konci. Tento proces omezuje počet dělení buněk a je znám jako Hayflickův limit. V některých typech buněk je délka telomer udržována enzymem telomerasou, která přidává krátké repetitivní úseky DNA na 3'-konec telomer. Lidská telomerasa se skládá ze dvou podjednotek: proteinové, která vykazuje aktivitu reverzní transkriptasy (hTERT – human Telomerase Reverse Transcriptase), a RNA podjednotky, která slouží jako templát pro prodlužování telomerického 3'-konce. Telomerasa je fyziologicky aktivní zejména v embryonálních a kmenových buňkách, zatímco patologicky je její aktivita zvýšena u 85-95 % nádorových buněk, což umožňuje jejich neomezené dělení.

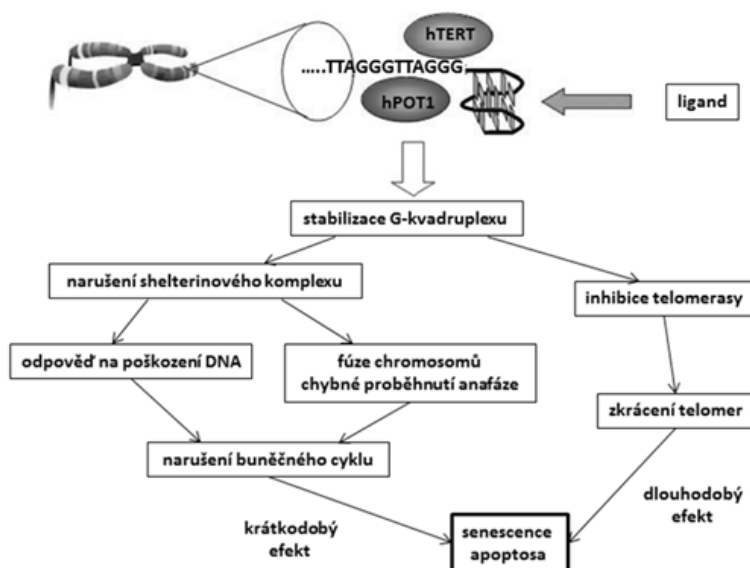
Existence G-kvadruplexů *in vivo* byla poprvé prokázána u telomerických sekvencí nálevníka *Stylonychia lemnae*. U lidských telomer byly G-kvadruplexy *in vivo* detekovány pomocí radioaktivně značeného ligandového markeru H-360A. [13-14]

1.2.5. Terapeutický potenciál stabilizace telomerického G-kvadruplexu jako možná léčba nádorových onemocnění

Existuje několik přístupů k léčbě zhoubných nádorů, mezi něž patří chirurgické odstranění, radioterapie, chemoterapie nebo biologická léčba, často v různých kombinacích. Tyto metody jsou však často spojeny s řadou komplikací a vedlejších účinků, a jejich účinnost stále není optimální. Největším problémem je neselektivní působení, které postihuje i zdravé buňky. Proto je velký zájem o nové strategie léčby, které by působily selektivně pouze na nádorové buňky, a využily odlišnosti mezi zdravými a nemocnými buňkami. Jedním z klíčových rozdílů je rychlost buněčného dělení a replikační potenciál – nádorové buňky se obvykle dělí rychleji a mají kratší telomery (2-5 kbp), které jsou však prodlužovány enzymem telomerasou. Stabilizace telomerických G-kvadruplexů malomolekulovými ligandy se jeví jako potenciálně selektivní přístup. Tyto ligandy by mohly cílit pouze na nádorové buňky, aniž by ovlivnily růst zdravých buněk, a poskytují dva typy účinku: dlouhodobý a krátkodobý.

Princip dlouhodobého účinku spočívá v blokování interakce telomerasy s telomerickým 3'-koncem. Pokud je jednořetězcový přesah telomer zabalen do G-kvadruplexu, RNA podjednotka telomerasy se nemůže navázat, což znemožňuje prodlužování telomer. Při každém dělení se telomery nádorových buněk zkracují, což vede k jejich rychlejšímu zániku, zatímco zdravé buňky zůstávají nepoškozené. Experimenty však ukázaly, že některé ligandy působí již během kratší doby – tzv. krátkodobý efekt, který je z terapeutického hlediska atraktivnější než dlouhodobý. Tento mechanismus spočívá v narušení struktury telomer a shelterinového komplexu vazbou ligandu na G-kvadruplex. Následkem je spuštění odpovědi na poškození DNA, vznik dvouřetězcových zlomů, fúze chromozomů, chybný průběh anafáze, senescence a nakonec apoptóza. Tento efekt se obvykle projeví během pěti až deseti dnů, aniž by došlo k výraznému zkrácení telomer.

Kromě toho bylo popsáno synergické působení G-kvadruplexových ligandů v kombinaci s běžnými chemoterapeutiky, jako je paclitaxel nebo imatinib. Kombinovaná léčba vedla k lepším výsledkům než použití samotného chemoterapeutika, čímž se otevírá možnost účinnější a selektivní terapie nádorových onemocnění. [15]



Obrázek 6: Sled předpokládaných událostí po stabilizaci telomerického G-kvadruplexu malomolekulovým ligandem (Zdroj: Hubálková, 2015)

1.2.6. G-kvadruplexy v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) a frontotemporální demence (FTD) patří mezi neurodegenerativní onemocnění, která jsou si klinicky, patologicky i geneticky příbuzná. Většina případů vzniká sporadicky, bez rodinné anamnézy, ale u některých pacientů jsou onemocnění spojena s mutacemi v různých genech spojených s ALS nebo FTD. Nejčastější příčinou familiárních forem je expanze hexanukleotidových repetitiv G4C2 v prvním intronu genu *C9orf72*, která se vyskytuje u 23-47 % familiárních a 4-5 % sporadických případů. Přesný mechanismus, kterým tato expanze způsobuje neurodegeneraci, není dosud znám, ale předpokládá se, že souvisí s tvorbou G-kvadruplexových struktur na úrovni DNA a RNA.

Byly navrženy tři hlavní hypotézy, které vysvětlují toxicitu *C9orf72* expanze: (1) ztráta funkce genu kvůli snížené hladině mRNA, (2) zachytávání proteinů vázících RNA prostřednictvím RNA G-kvadruplexů, a (3) akumulace polydipeptidových repetitiv, které vznikají obousměrnou translací oblasti obsahující expanzi. Nedávné studie ukázaly, že RNA G-kvadruplexy jsou hojnější ve fibroblastech a astrocytech pacientů s C9 ALS než u osob bez expanze. Transkripce rozsáhlých G4C2 repetitiv vede ke vzniku fragmentovaných transkriptů proměnné délky, které mohou být dále štěpeny na menší RNA fragmenty. Krátké repetitivové sekvence RNA mohou samy skládáním vytvářet intramolekulární i multimolekulární G-kvadruplexy, jejichž konformace závisí na počtu repetitiv a koncentraci RNA. S rostoucím počtem repetitiv se elektroforeticky pozorují jak pomalu, tak rychle migrující formy, odpovídající různým

G-kvadruplexovým strukturám. V kontextu ALS/FTD, kde jsou G4C2 repetice mnohem více než stovky až tisíce, může vznikat velké množství intramolekulárních i multimolekulárních konformací a fragmenty RNA štěpené nukleázami mohou samostatně tvořit struktury vyššího řádu.

Studie také ukázaly, že RNA obsahující pouze pět repetice G4C2 může podléhat fázové separaci kapalina-kapalina (LLPS) a vytvářet nerozpustné síťové struktury, tzv. RNA ložiska. RNA G-kvadruplexy a tzv. G-dráty tak mohou být základem LLPS. V modelových systémech byly G-dráty tvořeny stabilními G-kvadruplexy spojenými monovalentními kationty. Tento model lze rozšířit na repetitivní sekvence d[G4C2G4] a r[G4C2G4], což otevírá možnost využití inhibitorů G-kvadruplexů jako terapeutických látek k zabránění tvorby G-drátů v ALS/FTD. Dosavadní výzkumy identifikovaly několik nízkomolekulárních inhibitorů, antisense oligonukleotidů a peptidů, které omezují patologické projevy ALS/FTD, například tvorbu RNA ložisek a aberantní translaci v neuronových modelech a u geneticky modifikovaných mušek. Například stabilitu RNA G-kvadruplexů v G4C2 repetitivních sekvencích lze modulovat porfyrinovou sloučeninou TMPyP4, která narušuje interakce s proteiny vážícími RNA a snižuje deficit jaderného importu, což naznačuje terapeutický potenciál destabilizujících ligandů.

Další významný aspekt patofyziologie ALS/FTD je hyperexcitabilita neuronů, která způsobuje nadměrnou depolarizaci, zvýšenou perzistentní vodivost Na^+ a sníženou vodivost K^+ . V klidovém stavu mají neurony typické koncentrace 140 mM K^+ a 5-15 mM Na^+ a intracelulární pH kolem 7,0-7,5, což je příznivé pro tvorbu RNA G-kvadruplexů a G-drátů. Tyto struktury jsou velmi stabilní, odolávají degradaci RNázou a mohou přetrvávat i při depolarizaci, kdy se koncentrace Na^+ zvyšuje a K^+ snižuje. V astrocytech pacientů s C9 ALS byla prokázána vyšší přítomnost RNA G-kvadruplexů ve srovnání s astrocyty bez expanze, což potvrzuje jejich potenciální význam v patologii onemocnění. [16]

1.3. Mikroskopie atomárních sil (AFM)

1.3.1. Úvod k mikroskopii atomárních sil

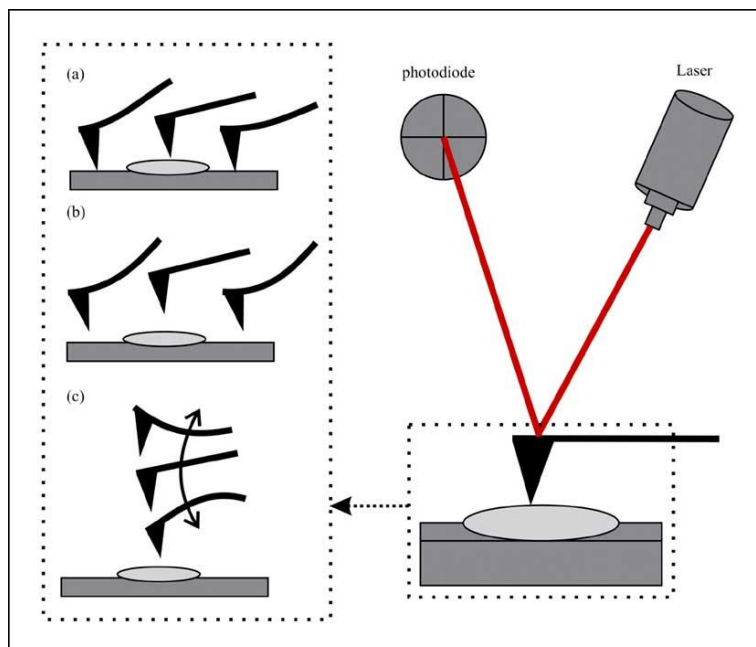
Mikroskopie atomárních sil (AFM) je založena na mapování atomárních sil na povrchu vzorku a poprvé byla uskutečněna v roce 1986. Současná metoda AFM rastruje povrch vzorku ostrým hrotem, jehož délka činí několik mikrometrů a průměr špičky přibližně 10 nm. Hrot je umístěn na volném konci raménka (cantilever) o délce 100–200 μm . Vzájemné silové působení mezi hrotem a povrchem vzorku způsobuje ohyb a odklon raménka, který lze měřit a převést na

topografickou mapu povrchu. V počátcích této techniky vycházeli výzkumníci ze zkušeností s tunelovací mikroskopií (STM), kde bylo zjištěno, že k přesnému měření je nutné zohlednit i síly, jež mění vzájemnou polohu hrotu a vzorku. Důležitým požadavkem bylo také zobrazování nevodivých vzorků, neboť pokrytí izolantu vodivým filmem snižuje rozlišení. Povrchové síly jsou mapovány těsným přiblížením hrotu k povrchu, přičemž přitažlivé nebo odpudivé síly ohýbají raménko. Toto ohnutí je snímáno citlivým, zpravidla laserovým snímačem a vytváří měřicí veličinu, na jejímž základě počítač generuje topografii povrchu vzorku. Podstatné je, že tyto síly působí u jakéhokoli vzorku nezávisle na jeho vodivosti, což umožňuje široké spektrum aplikací AFM. Síly, které ohýbají raménko, mohou mít různou fyzikální podstatu. Především se uplatňuje van der Waalsova přitažlivá síla působící mezi dvěma atomy (dipól-dipólová interakce) a síla odpudivá, vznikající podle Pauliho principu, jestliže je vzájemná vzdálenost atomů menší než součet jejich atomových poloměrů. [17]

1.3.2. Poklepový režim AFM

Poklepový režim představuje jednu z možných aplikací AFM, dalšími jsou například kontaktní nebo nekontaktní režim, přičemž poklepový režim je nekontaktnímu velmi podobný, viz Obr. 7. Rozkmit raménka je však tak velký, že dochází k občasnému dotyku hrotu s povrchem – vibrující raménko se dostává do těsné blízkosti povrchu a ve spodní části své dráhy hrot lehce udeří, čímž dochází k „poklepávání“ po vzorku. Povrch je v tomto režimu mapován ze změny rezonanční frekvence raménka. Tento režim je výhodnější než čistě dotykový tam, kde by hrozilo poškození vzorku třením nebo tažením, a rovněž vhodnější než bezdotykový, pokud je třeba snímat větší plochy s větším rozpětím v ose z . Zavedení poklepového režimu je podmíněno neschopností udržet hrot ve střední vzdálenosti nad povrchem, kde by byly optimální podmínky z hlediska rozlišení, složitosti interakcí a rizika poškození vzorku. Tato neschopnost vzniká v důsledku přeskoků ve vzdálenosti, pokud gradient síly v daném bodě převyší tuhost raménka (cantilever), a zároveň způsobuje hysterezi. Pokud je raménko o hmotnosti m rozkmitáváno s frekvencí f , jeví se, jako by mělo větší efektivní tuhost. Větší rozkmit (energie) hrotu napomáhá překonávat případné kapilární síly a usnadňuje měření. Dobrého rozlišení, srovnatelného s dotykovým režimem, lze dosáhnout volbou bodu nejbližšího kontaktu ve vzdálenosti několika desítek nanometrů a vhodnou frekvencí kmitů, aby se hrot do tohoto bodu dostal několikrát, než se laterálně posune o svůj průměr. Většina dostupných AFM přístrojů detekuje polohu raménka s hrotem optickou cestou. Laserový svazek se odráží od raménka na fotodetektor, který registruje změny dopadajícího paprsku (PSPD – Position Sensitive PhotoDetector). Při odklonu raménka se posune stopa laseru na

detektoru, přičemž citlivé fotodetektory dokážou zaznamenat posunutí menší než 1 nm. Poměr mezi optickou dráhou laseru a délkou raménka vytváří geometrické zesílení, díky němuž systém detekuje subnanometrové vertikální pohyby hrotu. [18]



Obrázek 7: Pracovní režimy AFM (a) kontaktní režim (b) bezkontaktní režim (c) pokleповý režim (Zdroj: Veerapandian a Yun, 2009)

1.4. Ověřovací metody

1.4.1. Cirkulární dichroismus spektroskopie

Cirkulární dichroismus spektroskopie (CD) patří mezi nejjednodušší metody používané k posouzení povahy kvadruplexního záhybu. Tato technika je založena na diferenciální absorpci levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla chirálními molekulami. CD spektra nukleových kyselin jsou velmi citlivá na interakce vrstvení mezi bázemi.

U G-kvadruplexů korelují tři základní typy topologie (paralelní, antiparalelní a hybridní) se syn- a anti-konformací guanosinu zapojeného do tvorby G-kvartetu. V důsledku toho dochází k odlišnému vrstvení mezi sousedními G-kvartety, což se projevuje vznikem jedinečného CD „podpisu“ charakteristického pro danou topologii. CD spektra typických čtyřvláknových paralelních DNA kvadruplexů obecně vykazují absorpční maximum při 264 nm a minimum při 240 nm. Tyto struktury lze snadno odlišit od jednovláknových nebo dvouvláknových paralelních kvadruplexů s vnějšími smyčkami, jelikož se v jejich CD spektrech objevuje další pozitivní pík v oblasti kolem 290 nm. CD spektra paralelních DNA a RNA kvadruplexů jsou

rovněž velmi podobná CD spektrům duplexů A-formy. Tyto dva typy strukturních motivů však lze obvykle rozlišit podle znaménka píku přítomného při vlnové délce 210 nm. Duplexy A-formy vykazují charakteristický negativní pás, zatímco paralelní kvadruplexy mají při této vlnové délce pozitivní pás. Přítomnost dvou pozitivních píků při 210 nm a 260 nm tedy svědčí o kvadruplexní struktuře. Výskyt absorpčního maxima při 295 nm a minima při 265 nm je charakteristický pro antiparalelní DNA kvadruplexy. Spektrum hybridních kvadruplexů je charakterizováno nejen dominantními pozitivními pásy při 295 nm a 265 nm, ale také negativním pásem při 240 nm. Přehled charakteristických píků pozorovaných v CD spektrech jednotlivých topologií kvadruplexů je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka 1. Charakteristické píky pozorované ve spektrech CD pro různé topologie kvadruplexů

Typ kvadruplexu	Profil CD při λ [nm]			
	210	240	265	295
Tetramolekulární paralela	+	-	+	
Bimolekulární nebo unimolekulární paralelní s vnějšími smyčkami	+	-	+	+
Antiparalelní jednovláknový	+	+	-	+
Hybrid (3+1)	+	-	+	+

Zdroj: Małgowska et al. (2012)

CD spektroskopie může rovněž poskytovat informace o konformačních změnách vyvolaných změnami podmínek roztoku. Pomocí této techniky lze sledovat kinetiku tvorby kvadruplexů. Zároveň je možné analyzovat mapu konformačních změn, jelikož stejná molekula může izomerizovat v důsledku působení různých faktorů. Například přidání molekulárního shlukovacího činidla, jako je poly(ethylenglykol), nebo konsolventu (methanol, ethanol, acetonitril) může indukovat strukturní změny kvadruplexů, které jsou detekovatelné pomocí CD spektroskopie. Analýza teplotní závislosti CD spekter dále umožňuje sledování stability struktury kvadruplexů a stanovení teploty tání. Drobnými úpravami oligonukleotidové sekvence a pečlivou optimalizací podmínek roztoku lze dosáhnout přítomnosti jediného konformeru v roztoku, což je klíčové pro studium kvadruplexních struktur pomocí NMR spektroskopie a rentgenové krystalografie.

Než bude možné data získaná pomocí CD spektroskopie využít k jednoznačnému určení topologie různých kvadruplexů, je nutné lépe porozumět faktorům, které přispívají ke vzniku specifických vzorců CD spekter. Do doby, než budou tato data k dispozici, je třeba výsledky

získané z CD spekter interpretovat s opatrností a k potvrzení tvorby kvadruplexů využívat i další fyzikální metody. [19]

1.4.2. UV spektroskopie (rozpuštění)

UV spektroskopie představuje rychlou metodu pro potvrzení vzniku kvadruplexní struktury a hodnocení její strukturální stability. Měření teplot tání nukleových kyselin se obvykle provádí při vlnové délce 260 nm, kde je pozorováno maximum jejich absorpce. U duplexů DNA a RNA je při této vlnové délce detekován přibližně 25% rozdíl v absorbanci mezi plně složeným a rozloženým (roztaveným) stavem. U DNA a RNA kvadruplexů však tyto změny nejsou tak výrazné, jelikož rozdíl v absorbanci dosahuje pouze přibližně 4 %. Alternativně lze zaznamenat tání při jiných vlnových délkách, nejčastěji při 295 nm, kde je absorbance sice nižší, avšak denaturace vzorku se zde projevuje více než 50% změnou amplitudy absorpce. Potvrzení vzniku kvadruplexní struktury je možné provést jednoduchou analýzou UV křivky tání. Důvodem je skutečnost, že při vlnové délce 295 nm je profil tání kvadruplexu invertovaný ve srovnání s profilem duplexní struktury. G-kvadruplexy při tání vykazují hypochromní posun, tedy pokles absorbance, při 295 nm. Měření profilů tání za různých podmínek umožňuje charakterizaci závislosti stability a kinetiky asociačních a disociačních procesů kvadruplexů na řadě faktorů, včetně koncentrace oligonukleotidového řetězce, typu a koncentrace přítomných iontů. Kromě toho lze z těchto dat stanovit termodynamické parametry tvorby kvadruplexní struktury. [20]

1.4.3. Další ověřovací metody

Elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS) byla úspěšně použita k detekci tvorby G-kvadruplexové struktury již v roce 1993. Od té doby se tato technika stala užitečným nástrojem ve strukturních studiích G-kvadruplexů, a to zejména při studiu stechiometrie řetězců, interakcí mezi kvadruplexy a ligandy, strukturních přechodů, kinetiky tvorby struktury a dalších vlastností. Hmotnostní spektrometrie je založena na ionizaci sloučenin za účelem generování nabitých molekul nebo jejich fragmentů, u nichž je následně měřen poměr hmotnosti k náboji (m/z). Pro strukturní studie nukleových kyselin je však často nezbytné minimalizovat fragmentaci molekul. Metoda elektrosprejové ionizace umožňuje zachovat nativní strukturu analyzovaných molekul během měření, a to udržováním co nejnižší teploty kapiláry nebo zdroje Z-spreje a nízkého urychlovacího napětí v přenosové optice.

Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR) může být použita k určení struktury G-kvadruplexu s atomovým rozlišením. Na rozdíl od rentgenové krystalografie, která se rovněž používá ke strukturní analýze G-kvadruplexů, umožňuje NMR stanovení struktury v roztoku, což odpovídá přirozenému prostředí molekul nacházejících se v živých buňkách. G-kvadruplexy poskytují charakteristická NMR spektra. Rezonance odpovídající iminoprotonům guaninových zbytků zapojených do tvorby G-kvartetu se objevují při charakteristických chemických posunech přibližně 10,5-10 ppm. Počet těchto rezonancí obvykle koreluje s počtem guanosinových zbytků zapojených do tvorby G-kvartetu. Tato spektrální oblast je oddělena od iminových oblastí jiných forem nukleových kyselin, jako jsou duplexy, jednovláknové struktury nebo jiné sekundární struktury. Díky tomu poskytuje NMR spektra vhodnou metodu nejen pro sledování tvorby G-kvadruplexní struktury, ale i jejích vazebných interakcí s ligandy.

Existují i další metody umožňující ověření tvorby kvadruplexů. Pro naše pozorování jsme však využili pouze dvě z výše uvedených, konkrétně CD spektroskopii a UV spektroskopii. [21]

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo prozkoumat tvorbu a stabilitu DNA nanostruktur založených na G-kvadruplexních motivech a určit, jak na jejich délku a morfologii působí primární sekvence oligonukleotidu a iontová síla pufru. Práce se zaměřila na porovnání sekvencí G4T2G4, G4C2G4, 1-3p G4 a G2AG4AG2, s cílem zjistit, které jsou nejvhodnější pro tvorbu dlouhých nanostruktur. Dále bylo sledováno, jak koncentrace draslíku a hořčíku ovlivňuje proces sebeskládání a výslednou délku nanodrátků. Celkově práce směřovala k lepšímu pochopení faktorů, které umožňují cílenou kontrolu morfologie a stability DNA nanostruktur, což má význam pro jejich využití v nanobiotechnologiích i pro další studium jejich biologické role.

3 METODIKA A EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité oligonukleotidy a příprava zásobních roztoků

V rámci experimentální části práce byly použity čtyři oligonukleotidy: G4T2G4, 1-3p G4, G2AG4AG2 a G4C2G4. Jedná se o krátké jednořetězcové DNA oligonukleotidy, jejichž délky a další charakteristiky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Oligonukleotidy byly dodány společností Eurofins Genomics, přičemž u všech byla provedena purifikace metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Měřítko syntézy všech oligonukleotidů bylo 0,2 μ mol.

Pro každý oligonukleotid byl následně dopočítán extinkční koeficient (ϵ) s využitím IDT kalkulátoru. Na základě naměřené absorpce při vlnové délce 260 nm byly pomocí Lambert-Beerova zákona vypočteny koncentrace jednotlivých zásobních roztoků. Tyto koncentrace sloužily jako výchozí hodnoty pro všechny následující výpočty a přípravu pracovních roztoků. Přehled všech vypočtených parametrů je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka 2. Specifikace a analytické parametry výchozích oligonukleotidů

Číslo	1	2	3	4
Jméno oligonukleotidu	G4T2G4	1-3p G4	G2AG4AG2	G4C2G4
Sekvence (5' → 3')	GGGGTTGGGG	GGTGGGTGGGTGGG	GGAGGGGAGG	GGGGCCGGGG
Délka (nt)	10	15	10	10
Výtěžek [OD*]	11,38	7,39	12,37	11,87
Výtěžek [μg]	379,99	238,62	364,27	389,51
Výtěžek [nmol]	119,49	49,70	113,90	123,65
Objem [μl] pro $c = 100 \text{ pmo} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	650	270	600	650
Teplota tání [$^{\circ}\text{C}$]	36	54	36	40
Molekulová hmotnost [g/mol]	3180,10	4801,13	3198,14	3150,08
Obsah G a C bází v sekvenci [%]	80	80	80	100
Měřítka syntézy [μmol]	0,2	0,2	0,2	0,2
Purifikace	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC
Extinkční koeficient ϵ [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	99000	148700	108600	96000
C při $\lambda = 260 \text{ nm}$ [M]	$1,67 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,92 \cdot 10^{-4}$

Zdroj: vlastní zpracování na základě dat od Eurofins Genomics

3.2 Stanovení koncentrací a příprava pracovních vzorků

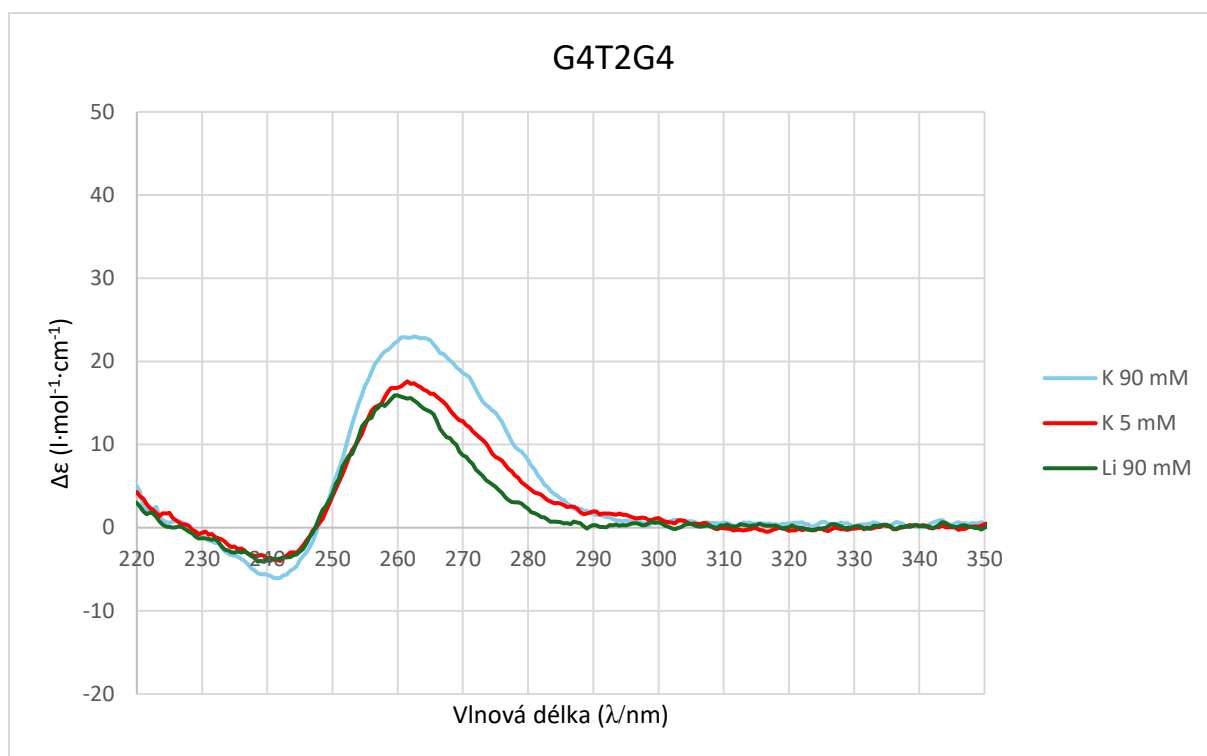
Po stanovení koncentrací byly vypočteny objemy jednotlivých složek potřebných pro přípravu měřených roztoků. Celkem bylo připraveno dvanáct roztoků s oligonukleotidy určených pro měření cirkulární dichroismus spektroskopii a tři odpovídající blanky. Blank roztoky obsahovaly všechny složky shodné se vzorky kromě sledovaného analytu a sloužily k odečtení příspěvku rozpouštědla a pufru. Dalších osm roztoků bylo připraveno pro měření metodou UV rozpouštění. Podrobné složení jednotlivých vzorků a konkrétní vypočtené objemy pro přípravu všech měřených roztoků (viz tabulky P1–P10) jsou součástí Přílohy 1 a 2.

3.3 Metody strukturní charakterizace

3.3.1 Cirkulární dichroismus (CD spektroskopie)

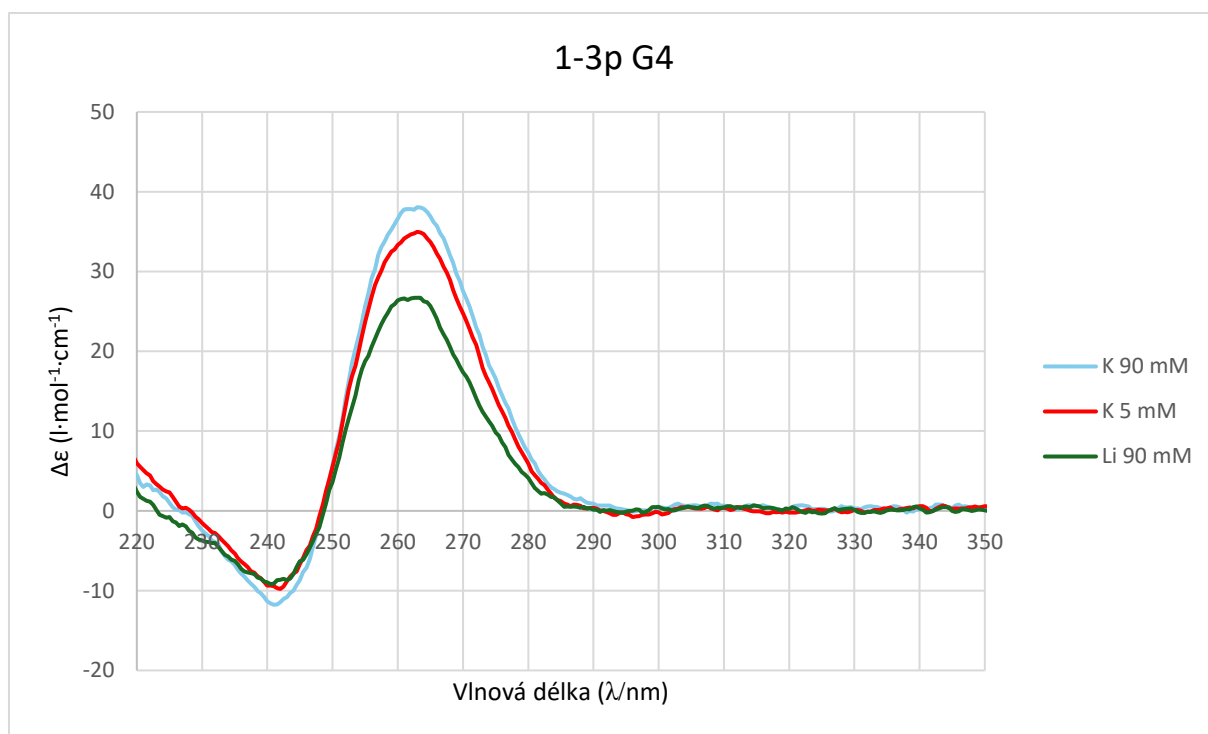
Po výpočtech byly roztoky připraveny pomocí mikropipet. Při pipetování bylo dbáno na přesné nastavení objemu a pravidelnou výměnu plastových špiček, aby se předešlo kontaminaci vzorků. Připravené roztoky byly umístěny do předem popsaných mikrozkušavek typu Eppendorf, následně promíchány pomocí vortexové třepačky a krátce centrifugovány. Stejný postup byl aplikován u všech připravovaných roztoků. Vzorky byly uchovávány v chladicím zařízení do doby měření. Před provedením cirkulární dichroismus spektroskopie byly vzorky podrobeny teplotnímu ošetření, při kterém byly zahřáty ve vroucí vodní lázni a následně ponechány k postupnému ochlazení na laboratorní teplotu. Po dostatečné době temperace byly vzorky připraveny k měření.

Měření cirkulárního dichroismu bylo prováděno na CD spektrofotometru JASCO J-1500. Přístroj byl ovládán pomocí připojeného počítače a příslušného softwaru. Každé měření bylo zahájeno změřením blanku odpovídající skupiny vzorků. Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Spektra byla zaznamenávána v rozsahu vlnových délek 210–370 nm, přičemž každé měření bylo provedeno třikrát a výsledné spektrum představovalo průměr těchto měření. Naměřená data byla následně korigována o hodnoty blanku, zpracována a uložena. Výsledná spektra byla exportována ve formátu CSV a dále zpracována do grafické podoby. Grafy obsahují závislost signálu na vlnové délce, kde osa X představuje vlnovou délku v nanometrech a osa Y molární dichroismus $\Delta\epsilon$ ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), odpovídající spektroskopické odezvě. Pro každý oligonukleotid byly zobrazeny tři křivky odpovídající třem různým pufovým podmínkám, na jejichž základě bylo možné posoudit vznik G-kvadruplexových struktur, viz Obr. 8 – 11.



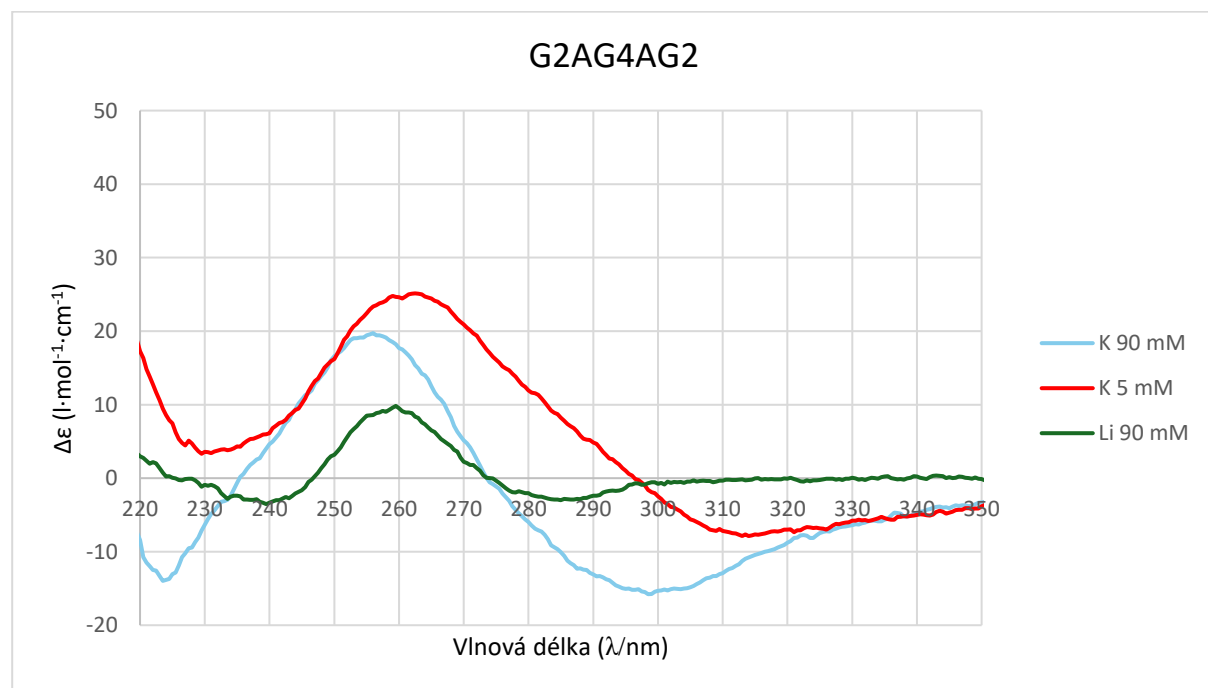
Obrázek 8: CD spektra oligonukleotidu G4T2G4 v různých pufovéch podmínkách.

Z naměřených dat na Obr. 8 je patrné, že CD spektrum G4T2G4 oligonukleotidu ukazuje typický G-kvadruplexový signál s maximem kolem 265 nm. Intenzita signálu je nejvyšší při 90 mM K⁺, nižší při 5 mM K⁺ a nejnižší při 90 mM Li⁺.



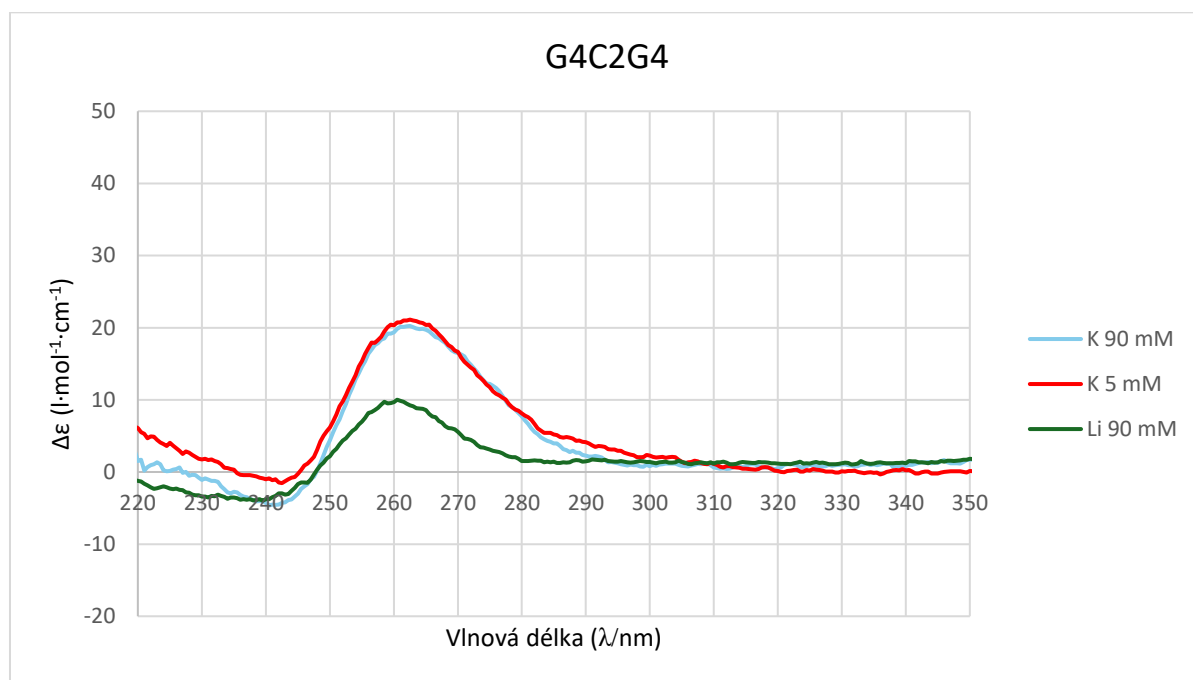
Obrázek 9: CD spektra oligonukleotidu 1-3p G4 v různých pufrových podmínkách.

Z naměřených CD spekter (Obr. 9) vyplývá, že 1-3p G4 vykazuje značnou přítomnost G-kvadruplexů s výrazným maximem kolem 265 nm. Nejvyšší stabilitu a signál vykazuje při 90 mM K⁺, zatímco Li⁺ poskytuje nejslabší CD signál.



Obrázek 10: CD spektra oligonukleotidu G2AG4AG2 v různých pufrových podmínkách.

Na Obr. 10 vidíme CD spektrum oligonukleotidu G2AG4AG2, které indikuje tvorbu G-kvadruplexu, přičemž nízká koncentrace K^+ výrazně zvyšuje intenzitu signálu s maximem kolem 265 nm. Přítomnost Li^+ stabilitu struktury a intenzitu signálu výrazně snižuje, zatímco vysoká koncentrace K^+ (90 mM) vede ke středním hodnotám dichroismu. Tento oligonukleotid vykazuje atypické strukturní rysy, které se projevují právě touto neobvyklou citlivostí na koncentraci draselných iontů.



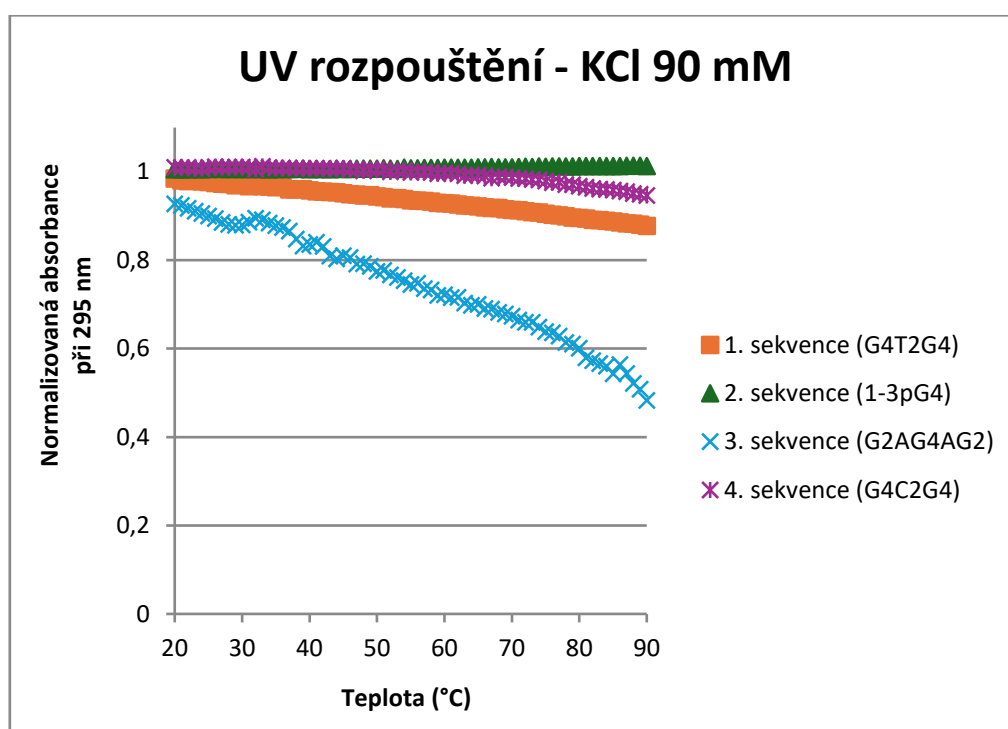
Obrázek 11: CD spektra oligonukleotidu G2AG4AG2 v různých pufrových podmínkách.

CD spektrum G4C2G4 (Obr. 11) vykazuje typický G-kvadruplexový signál s maximem kolem 265 nm, který je nejintenzivnější při 5 mM K^+ . Spektrum při 90 mM K^+ je nepatrně slabší a při Li^+ téměř minimální.

Z CD spekter vyplývá, že tvorba G-kvadruplexů probíhá zejména v přítomnosti pufru s vysokou koncentrací draslíku, což se projevuje charakteristickými maximy kolem 260 nm. Sekvence 1-3p G4 vykazovala nejvyšší charakteristické křivky a zároveň nejvyšší molární extinkční koeficienty. Sekvence G2AG4AG2 se chovala odlišně a její spektrum neodpovídalo typickým rysům G-kvadruplexu; byla však ponechána ve studii, protože její netypické chování může naznačovat vznik jiné, potenciálně zajímavé struktury. Při nižší koncentraci K^+ byla tvorba G-kvadruplexů stále detekovatelná, avšak s nižším signálem. Roztoky obsahující Li^+ vykazovaly pouze minimální tvorbu G-kvadruplexů, proto nebyly v dalších experimentech využity.

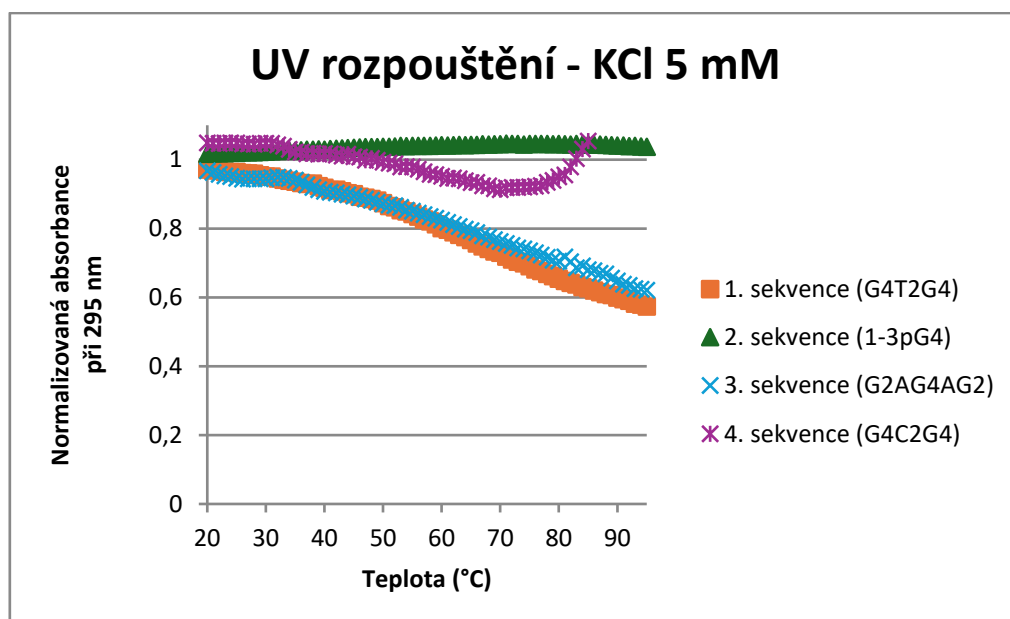
3.3.2 UV-Vis spektroskopie

Druhou ověřovací metodou byla UV-Vis spektroskopie, kterou jsme využili k posouzení stability G-kvadruplexů při teplotách, při kterých jsme s nimi pracovali (tedy pokojová teplota kolem 20–25 °C). K měření jsme použili UV-Vis spektrofotometr Varian Cary 4000, připojený k počítači, který umožňuje záznam a zpracování dat prostřednictvím příslušného softwaru. Postup měření byl obdobný jako u předchozích experimentů: po dosažení zadané konečné teploty (v našem případě 90 °C) byla data uložena, exportována do formátu CSV a následně normalizována. Na základě těchto dat byly vytvořeny dva grafy zobrazující profily křivek, které znázorňují denaturaci a rozpad G-kvadruplexů s rostoucí teplotou, viz Obr. 12–13.



Obrázek 12: Graf UV tání G-kvadruplexů (20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl₂).

Obr. 12 ukazuje normalizovanou absorbanci G-kvadruplexů čtyř různých sekvencí při 295 nm v závislosti na teplotě. Vysoká koncentrace KCl udržuje absorbanci téměř konstantní i při zvýšení teploty, což naznačuje, že struktury jsou stabilní a méně citlivé na denaturaci.



Obrázek 13: Graf UV tání G-kvadruplexů (5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂).

Z Obr. 13 vidíme, že při nízké koncentraci KCl klesá absorbance s rostoucí teplotou mnohem výrazněji, zejména pro sekvenci G2AG4AG2 (3. sekvence). To ukazuje, že struktury jsou méně stabilní a snadněji se denaturují.

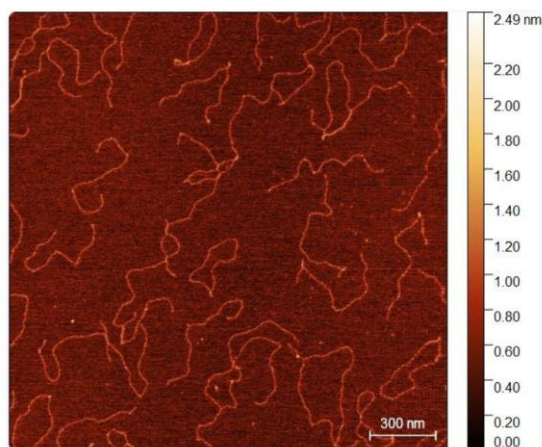
Srovnáním obou grafů je zřejmé, že vyšší koncentrace KCl (90 mM) zvyšuje stabilitu G-kvadruplexů. Struktury zůstávají stabilní i při vyšších teplotách, zatímco při nízké koncentraci (5 mM) se částečně denaturují. Vzhledem k tomu, že jsme experimenty prováděli při pokojové teplotě (20–25 °C), lze si ověřit, že při této teplotě jsou G-kvadruplexy stabilní a neměla by na ně tato teplota mít žádný vliv.

3.3.3 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

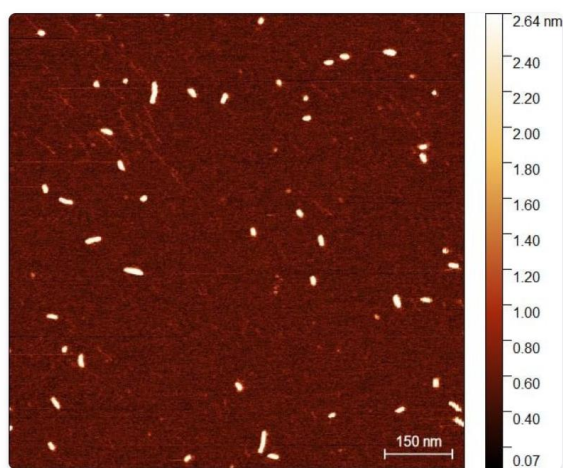
Po ověření přítomnosti a teplotní stability G-kvadruplexů pomocí předchozích metod jsme přistoupili k jejich vizualizaci mikroskopií atomárních sil (AFM). Každý experimentální den jsme sledovali konkrétní sekvenci G-kvadruplexu. Před samotným pozorováním každého vzorku bylo však nutné připravit kontrolní vzorek DNA. Tento krok nám umožnil ověřit, že při pozorování se skutečně zobrazují G-kvadruplexy a nikoliv běžná DNA. Jako kontrolní DNA byla použita plazmidová DNA pSP73. Jde o malou kruhovou molekulu DNA, která se často používá pro vnášení, replikaci a manipulaci s geny zájmu, případně pro syntézu RNA in vitro. Pro AFM pozorování byla DNA linearizována a připravena v koncentraci 1 µg/ml, naředěná v pufru obsahujícím 5 mM HEPES, 5 mM MgCl₂ a 5 mM KCl. Postup přípravy vzorku byl stejný pro všechny sledované sekvence. Substrátem pro AFM měření byla slída (mica), konkrétně

muskovit. Její hlavní výhody jsou snadná štěpnost, pružnost a chemická stálost. Odštípnutím několika vnějších vrstev získáme atomárně rovný povrch, zbavený nečistot. Chemicky je muskovit složeninou $K_2O \cdot Al_2O_3 \cdot SiO_2$ a jeho povrch lze popsat jako hydratovaný SiO_2 . V biologických aplikacích AFM jde o nejpoužívanější substrát, který je hydrofilní a při fyziologickém pH záporně nabitý. Tento záporný náboj umožňuje iontovou nebo kovalentní imobilizaci biomolekul a přítomnost vrstvy vody z ovzduší může ovlivnit interakci hrotu mikroskopu s povrchem. [22] Na připravenou slídu byl pipetou nanesen přiměřený objem roztoku DNA. Následovalo opláchnutí deionizovanou vodou, která je zbavená téměř všech iontů a zhruba 10–20krát čistší než běžná destilovaná voda. Ihned po opláchnutí byla slída osušena vzduchem s maximální opatrností, aby nedošlo k odfouknutí vzorku nebo vzniku solných krystalů. Samotné měření AFM probíhalo v poklepovém režimu (tapping mode) a zahrnovalo několik kroků: nejprve bylo nutné vyjmout snímací jednotku (scanner), umístit slídu se vzorkem na magnetické kolečko a vše vrátit zpět do pozice. Následně jsme nastavili kameru a přiblížili povrch vzorku, aby hrot mohl skenovat jeho plochu. Před samotným snímáním bylo nutné zkontrolovat parametry: osy X a Y byly vynulovány, velikost skenované plochy nastavena na $3 \times 3 \mu m$ (celková plocha $9 \mu m^2$), frekvence skenování cca 3,56 Hz a počet řádků 512. Po spuštění skenování hrot projel povrch vzorku, po dokončení byl proces ukončen vysunutím hrotu. Snímek byl vyhlazen a vyexportován pro další analýzu. Každý další vzorek byl snímán stejným způsobem.

Jako první vzorek pro pozorování a srovnání byla použita plazmidová DNA pSP73 (viz Obr. 14). Po ověření kontrolního vzorku jsme začali pozorovat první experimentální sekvenci, konkrétně G4T2G4, viz Obr. 15. Koncentrace této sekvence v roztoku připraveném pro AFM měření byla $1 \cdot 10^{-7}$ M a koncentrace KCl byla 5 mM. Pro účely AFM zobrazení byl použit specifický pufr o složení 5 mM HEPES, 5 mM KCl a 5 mM $MgCl_2$, který zajišťuje stabilizaci struktur a jejich efektivní adsorpci na povrch slídy díky přítomnosti hořčnatých kationtů. Příprava vzorku na AFM probíhala identicky jako u kontrolní DNA.

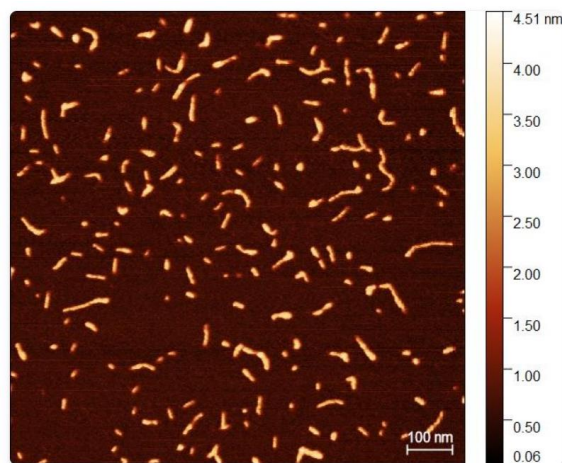


Obrázek 14: AFM topografie kontrolního vzorku plazmidové DNA pSP73.



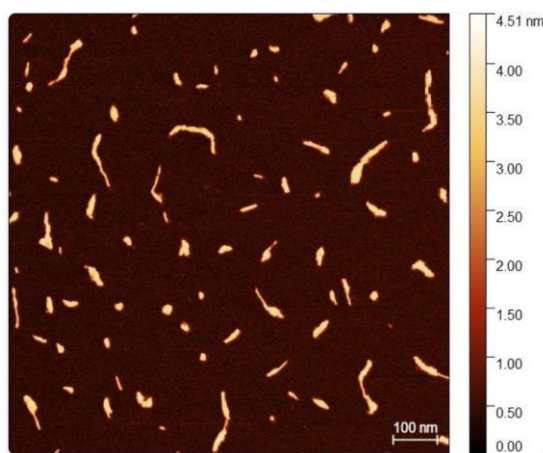
Obrázek 15: AFM topografie sekvence G4T2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂).

Dalším vzorkem byla opět sekvence G4T2G4 (Obr. 16), tentokrát připravená ze vzorku s vyšším obsahem KCl, konkrétně 90 mM. Tento krok nám umožnil porovnat strukturu G-kvadruplexu při různých koncentracích draslíku a posoudit vliv iontů na jeho stabilitu a vizualizaci pomocí AFM. Koncentrace této sekvence v roztoku byla $1 \cdot 10^{-7}$ M. Pro účely AFM zobrazení byl opět použit specifický pufr o složení 5 mM HEPES, 5 mM KCl a 5 mM MgCl₂.



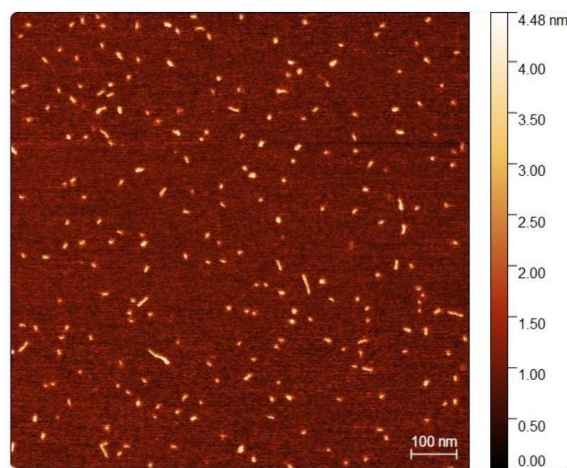
Obrázek 16: AFM topografie sekvence G4T2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂).

Posledním snímáním toho dne byla opět sekvence G4T2G4 (Obr. 17), připravená ze vzorku s obsahem 90 mM KCl a z pufru se zvýšenou koncentrací KCl a MgCl₂ na 10 mM. Koncentrace sekvence v roztoku pro AFM měření byla $1 \cdot 10^{-7}$ M. Tento vzorek nám umožnil sledovat vliv kombinace vyšší koncentrace KCl na tvorbu a stabilitu G-kvadruplexů.



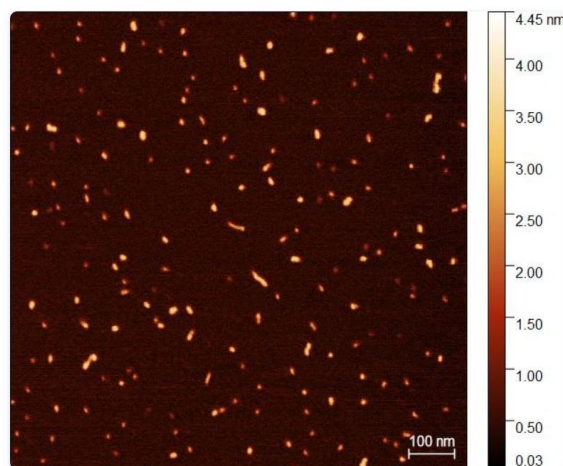
Obrázek 17: AFM topografie sekvence G4T2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂).

Druhý den jsme opět začali pozorováním plazmidové DNA pSP73 jako kontrolního vzorku. Následně jsme se zaměřili na sekvenci 1-3p G4 (viz Obr. 18), která byla připravena ze vzorku s obsahem 90 mM chloridu draselného (KCl). Koncentrace této sekvence v roztoku pro AFM měření byla $1 \cdot 10^{-7}$ M. Roztok dále obsahoval pufr s 5 mM KCl, 5 mM HEPES a 5 mM MgCl₂. Příprava vzorku, jeho nanesení na substrát a AFM měření probíhalo identicky jako u předchozího dne.



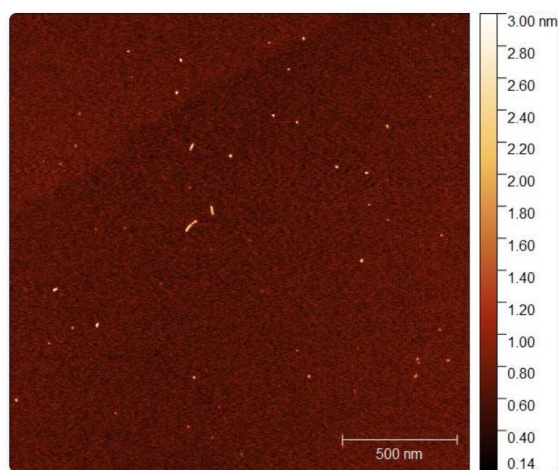
Obrázek 18: AFM topografie sekvence 1-3p G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂).

Posledním vzorkem toho dne byla opět sekvence 1-3p G4 (Obr. 19), připravená ze vzorku s obsahem 90 mM KCl a z pufru se zvýšenou koncentrací KCl a MgCl₂ na 10 mM. Koncentrace sekvence v roztoku pro AFM měření byla $1 \cdot 10^{-7}$ M. Tento vzorek nám opět umožnil sledovat vliv kombinace vyšší koncentrace KCl a pufru na tvorbu a stabilitu G-kvadruplexů.



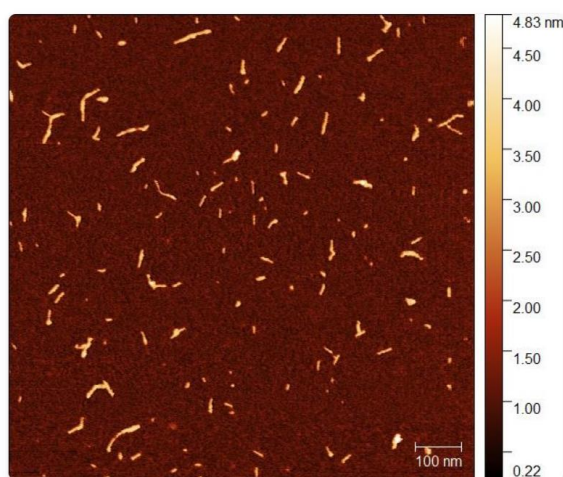
Obrázek 19: AFM topografie sekvence 1-3p G4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂).

Třetí den jsme opět začali pozorováním plazmidové DNA pSP73 jako kontrolního vzorku. Následně jsme přešli k sekvenci G2AG4AG2, připravené ze vzorku s obsahem 90 mM chloridu draselného (KCl). Koncentrace této sekvence v roztoku pro AFM měření byla $2 \cdot 10^{-7}$ M. Roztok dále obsahoval pufr s 10 mM KCl, 5 mM HEPES a 10 mM MgCl₂ a příprava vzorku probíhala stejně jako u předchozích dnů.



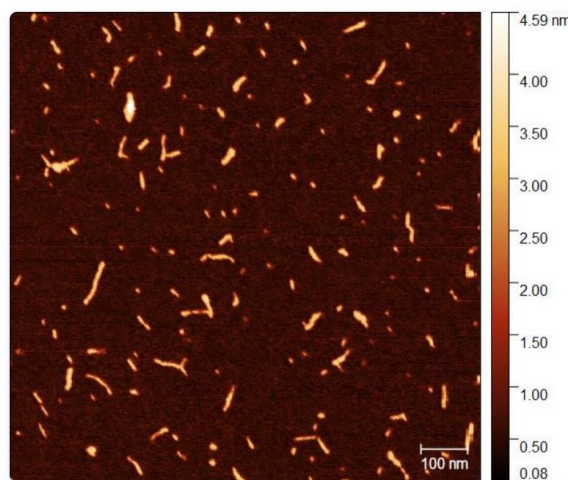
Obrázek 20: AFM topografie sekvence G2AG4AG4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂).

Dalším vzorkem třetího dne byla sekvence G4C2G4 (Obr. 21), připravená ze vzorku s obsahem 90 mM KCl. Koncentrace této sekvence v roztoku pro AFM měření byla $1 \cdot 10^{-7}$ M. Roztok dále obsahoval pufr s 5 mM, 5 mM HEPES a 5 mM MgCl₂.



Obrázek 21: AFM topografie sekvence G4C2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂).

Posledním vzorkem třetího dne byla opět sekvence G4C2G4 (viz Obr. 22), tentokrát roztok obsahoval pufr s 5 mM HEPES, 10 mM KCl a 10 mM MgCl₂. Koncentrace sekvence byla $1 \cdot 10^{-7}$ M. Tento vzorek nám umožnil sledovat vliv zvýšené koncentrace pufru a draslíku na tvorbu a stabilitu G-kvadruplexů.



Obrázek 22: AFM topografie sekvence G4C2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂).

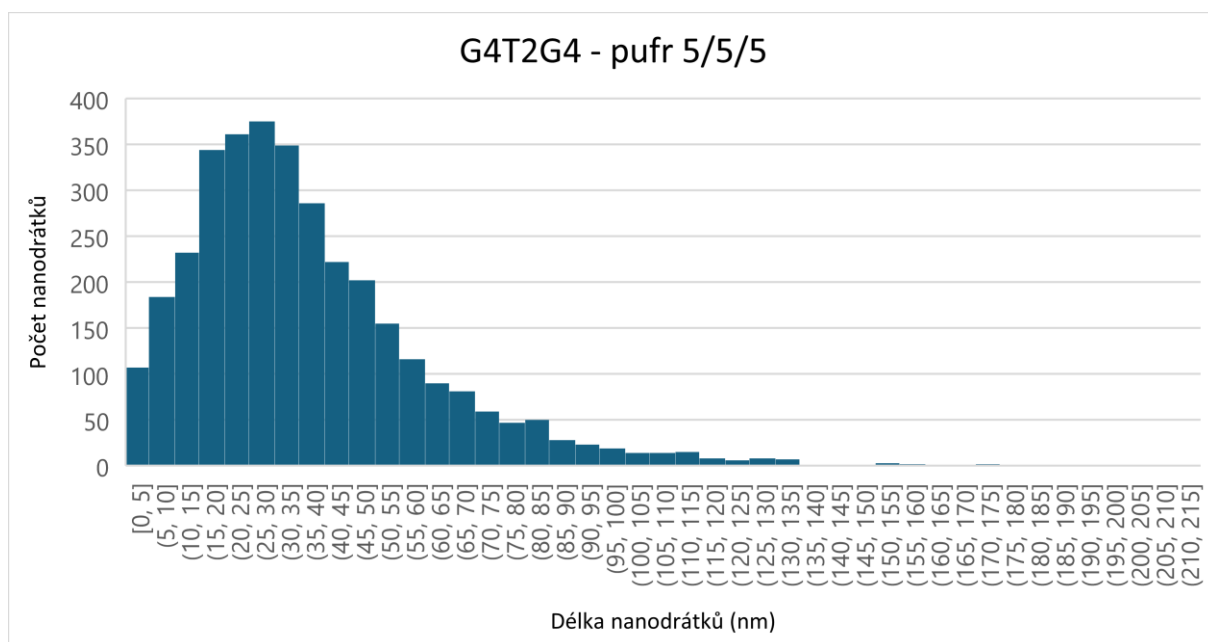
4 VÝSLEDKY

Statistická analýza morfologie DNA nanostruktur byla provedena na základě AFM snímků zpracovaných v softwaru Gwyddion. Z jednotlivých snímků byly změřeny délky pozorovaných útvarů a výsledná data byla převedena do histogramů distribuce délek. Tento přístup umožnil kvantitativní porovnání vlivu sekvence oligonukleotidu a iontové síly pufru na proces sebeskládání G-kvadruplexových struktur.

4.1 Morfologie struktur při nízké iontové síle

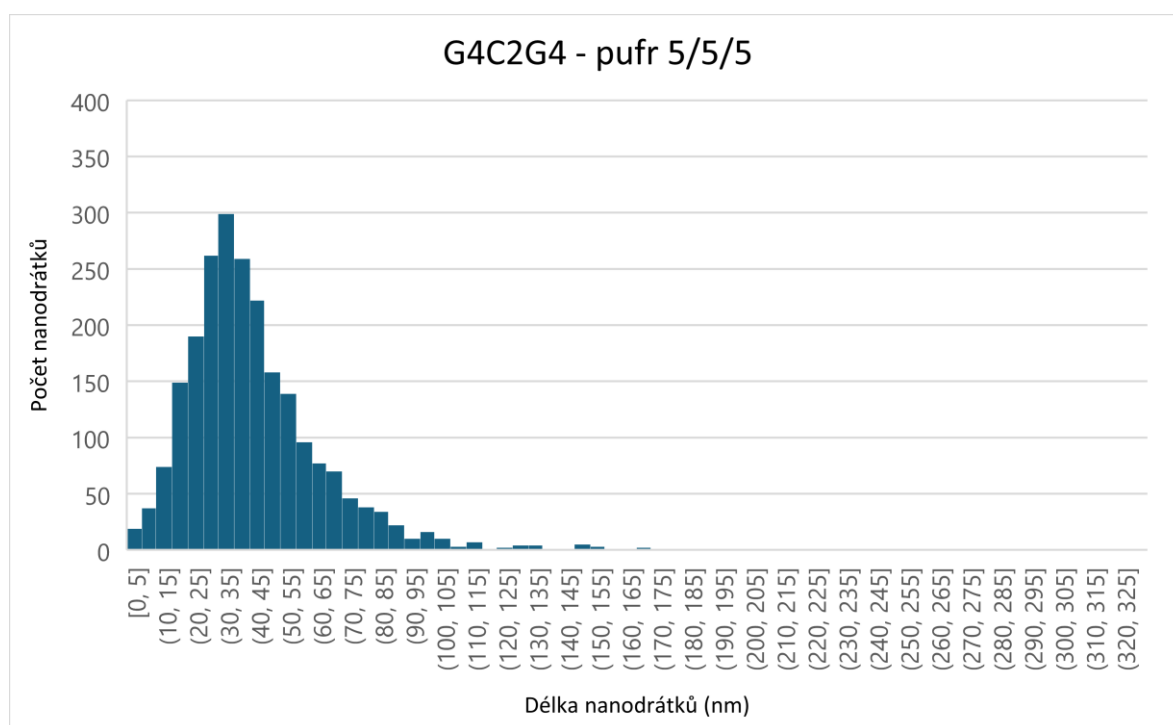
Při nízké iontové síle pufru (5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂) vykazovaly jednotlivé sekvence výrazně odlišné chování.

Sekvence G4T2G4 vytvářela převážně dlouhé jednorozměrné nanostruktury. Nejčtenější délky (modus) se nacházely v intervalu 25–30 nm, přičemž významná část vláken dosahovala délek přesahujících 100 nm. Histogram (Obr. 23) svědčí o efektivní polymeraci G-kvadruplexových jednotek do souvislých vláken.



Obrázek 23: Histogram distribuce délek G4T2G4 nanostruktur (pufr 5/5/5).

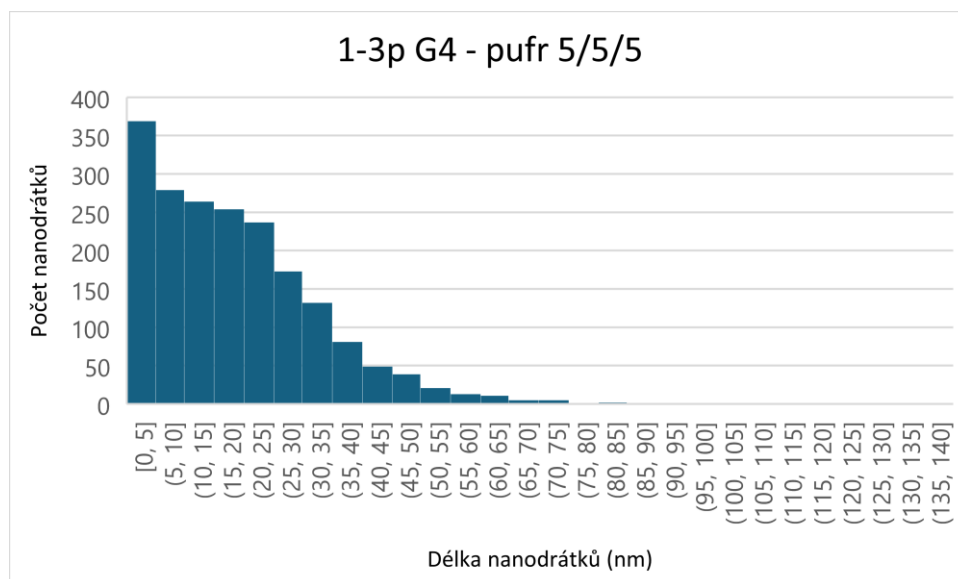
Podobný trend byl pozorován také u sekvence G4C2G4 (Obr. 24), u níž se modus posunul do intervalu 30–35 nm.



Obrázek 24: Histogram distribuce délek G4C2G4 nanostruktur (pufr 5/5/5).

Oproti tomu sekvence 1-3p G4 (Obr. 25) vykazovala výrazně odlišný distribuční profil. Nejvyšší četnost byla zaznamenána u velmi krátkých struktur v intervalu 0–5 nm, přičemž s

rostoucí délkou jejich počet prudce klesal. Tato sekvence tedy preferuje tvorbu izolovaných intramolekulárních G-kvadruplexů namísto polymerních vláken.

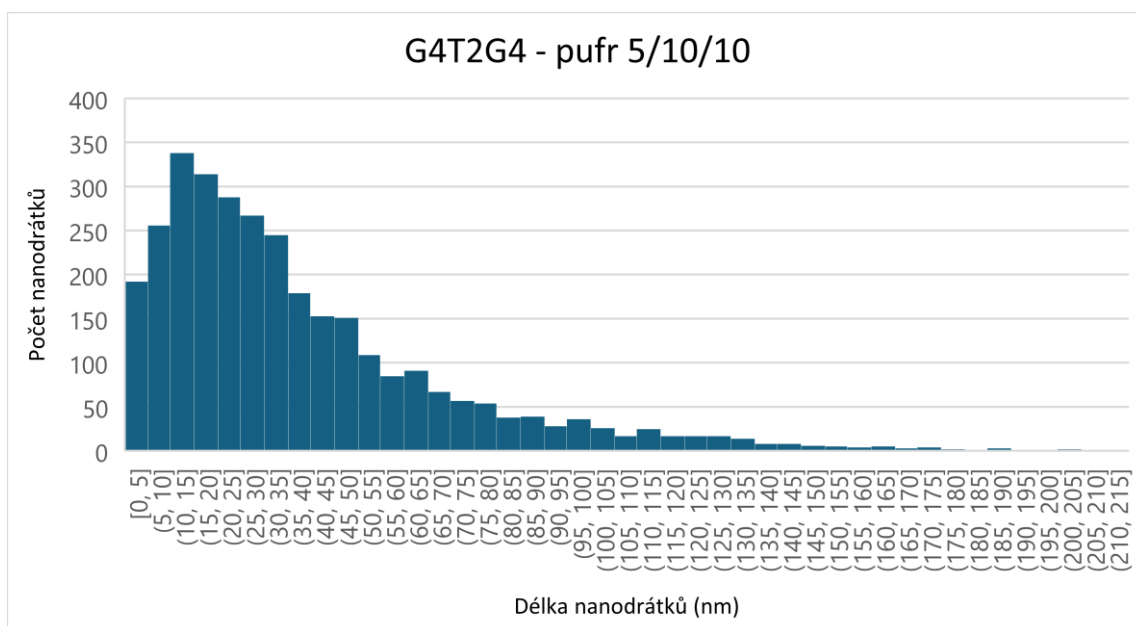


Obrázek 25: Histogram distribuce délek 1-3p G4 nanostruktur (pufr 5/5/5).

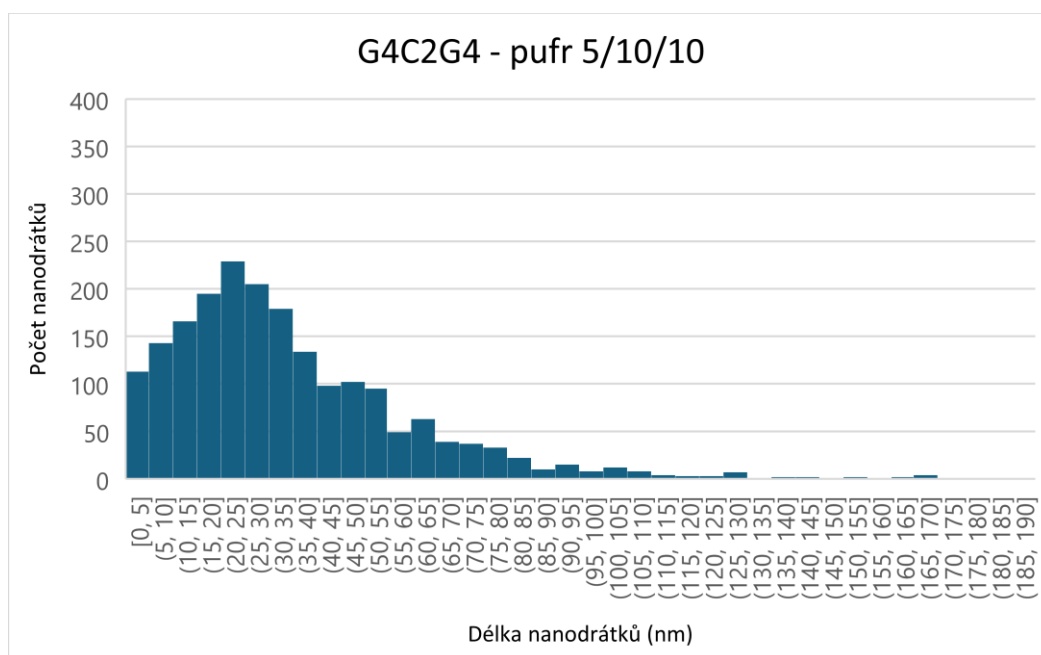
4.2 Morfologie struktur při zvýšené iontové síle

Zvýšení koncentrace KCl a MgCl₂ v pufru na 10 mM vedlo u všech studovaných sekvencí k posunu distribucí směrem ke kratším délkám.

U sekvence G4T2G4 se modus posunul z intervalu 25–30 nm na 10–15 nm (Obr. 26), zatímco u G4C2G4 došlo k posunu z 30–35 nm na 20–25 nm (Obr. 27). U obou sekvencí tak došlo ke snížení průměrné délky nanostruktur.

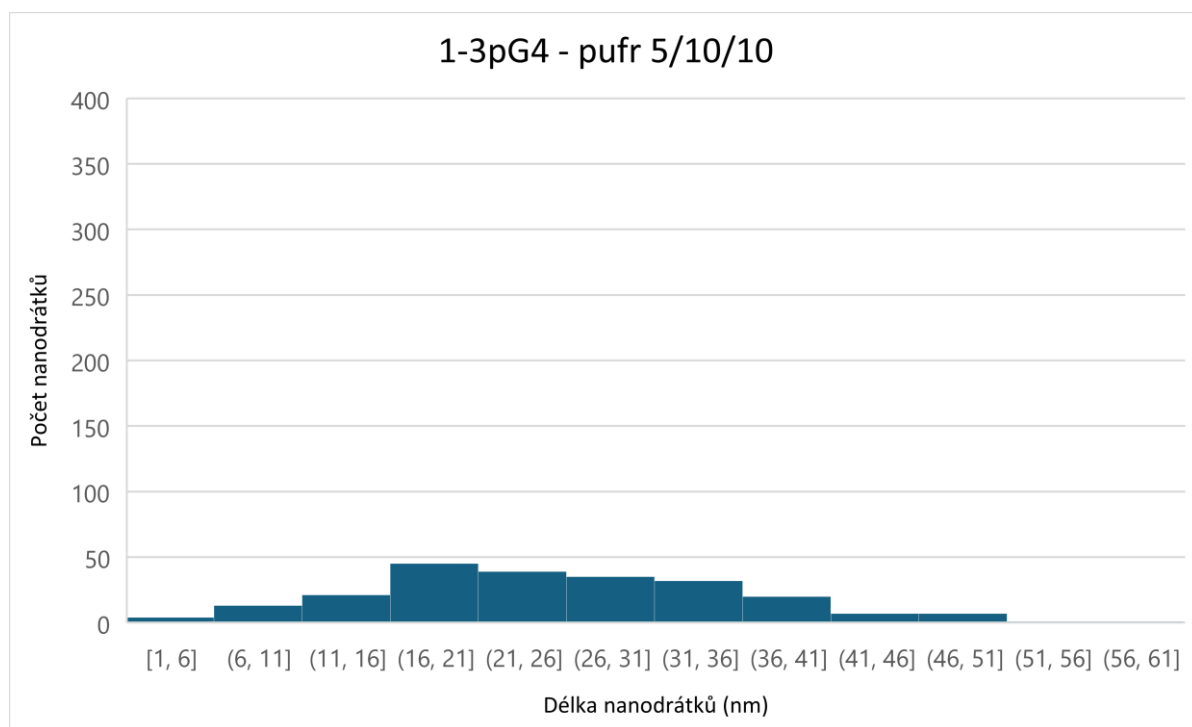


Obrázek 26: Histogram distribuce délek G4T2G4 nanostruktur (pufr 5/10/10).



Obrázek 27: Histogram distribuce délek G4C2G4 nanostruktur (pufr 5/10/10).

Sekvence 1-3p G4 si zachovala nízkou schopnost polymerace i při vyšší iontové síle. Ačkoliv došlo k mírnému rozšíření distribuce délek, nebyla pozorována významná tvorba dlouhých vláken, viz Obr. 28.



Obrázek 28: Histogram distribuce délek 1-3p G4 nanostruktur (pufr 5/10/10).

5 DISKUZE

5.1 Interpretace CD spekter a konformační analýza

Naměřená CD spektra u všech studovaných sekvencí vykazovala charakteristické rysy G-kvadruplexových struktur. Zejména u sekvence 1-3p G4 (Obr. 9) a G4T2G4 byl pozorován dominantní pozitivní pík v oblasti 265 nm a negativní minimum kolem 240 nm. Podle literatury tento profil jednoznačně odpovídá paralelní topologii G-kvadruplexu, kde jsou všechna vlákna orientována stejným směrem a glykosidické vazby guanosinů jsou v *anti* konformaci.

Zajímavé výsledky přineslo srovnání vlivu kationtů. V souladu s teoretickými předpoklady vykazovaly vzorky nejvyšší stabilitu (vyjádřenou amplitudou CD signálu) v prostředí 90 mM K⁺. Draselné ionty díky svému iontovému poloměru optimálně zapadají do kavity mezi G-kvartety, čímž strukturu stabilizují účinněji než ionty sodné či lithné. U sekvence G2AG4AG2 bylo pozorováno atypické chování, kdy nízká koncentrace kationtů vedla k vyšší intenzitě signálu než koncentrace vysoká. Tento jev lze přisoudit strukturnímu polymorfismu, kdy přítomnost adeninových bází ve smyčkách může při vyšší iontové síle pufru indukovat tvorbu alternativních nebo agregovaných forem, které mění výsledný optický podpis.

5.2 Termostabilita a UV spektroskopie

UV spektroskopie potvrdila stabilitu studovaných kvadruplexů při fyziologických teplotách. Při vlnové délce 295 nm byl u všech vzorků zaznamenán charakteristický hypochromní efekt (pokles absorpance při tání), což je specifický indikátor rozpadu G-kvartetu. Skutečnost, že absorpance zůstávala v přítomnosti 90 mM KCl téměř konstantní i při zvyšování teploty, svědčí o mimořádné stabilitě těchto struktur, což je klíčové pro jejich potenciální využití v nanotechnologiích jako jsou tzv. G-dráty.

5.3 Morfologie nanostruktur a AFM mikroskopie

Mikroskopie atomárních sil (AFM) umožnila přímé zobrazení připravených struktur v reálném prostoru. Použití specifického pufru (HEPES, KCl, MgCl₂) se ukázalo jako zásadní pro fixaci vzorků na povrch slídy. Role hořčnatých iontů jako elektrostatického „můstku“ mezi negativně nabitou DNA a podložkou potvrzuje metodické postupy uváděné v odborné literatuře.

Statistická analýza délek struktur v softwaru Gwyddion odhalila, že proces sebeskládání je silně závislý na sekvenci. Zatímco některé sekvence tvořily izolované monomolekulární kvadruplexy, u sekvencí s repetitivními motivy (např. G4T2G4) byla patrná tendence k tvorbě vyšších supramolekulárních celků – 1D nanostruktur.

5.4 Biologický a terapeutický význam

Výsledky této práce mají přímou relevanci k problematice neurodegenerativních onemocnění. Studium sekvencí bohatých na guanin, podobných těm v genu *C9orf72*, ukazuje, jak stabilní mohou být tyto struktury (zejména RNA verze) v intracelulárním prostředí bohatém na K⁺. Extrémní stabilita G-kvadruplexů, kterou jsme pozorovali při UV tání, vysvětluje, proč tyto struktury mohou v neuronech odolávat degradaci a přispívat k patogenezi onemocnění jako ALS. Pochopení faktorů, které tyto struktury stabilizují či destabilizují (např. vliv Li⁺), otevírá cestu k vývoji selektivních ligandů pro potenciální terapii.

6 ZÁVĚR

V této práci byla studována tvorba a stabilita DNA nanostruktur založených na G-kvadruplexových motivech pomocí kombinace CD spektroskopie, UV-Vis spektroskopie a mikroskopie atomárních sil. Bylo prokázáno, že všechny studované sekvence tvoří stabilní G-

kvadruplexy při pokojové teplotě (20–25 °C), avšak jejich schopnost sebeskládání do delších nanostruktur se výrazně liší.

Sekvence G4T2G4 a G4C2G4 se ukázaly jako nejvhodnější pro tvorbu dlouhých jednorozměrných G-drátů, zatímco sekvence 1-3p G4 a anomální sekvence G2AG4AG2 preferují tvorbu krátkých, izolovaných struktur. Dále bylo zjištěno, že nižší iontová síla pufru podporuje růst delších nanostruktur, zatímco vyšší koncentrace kationtů vede k rychlé nukleaci a zkracování vláken.

Získané poznatky potvrzují možnost cílené kontroly morfologie DNA nanostruktur pomocí volby sekvence a experimentálních podmínek a představují významný přínos pro oblast DNA nanotechnologií i pro další studium biologické role G-kvadruplexů.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] - KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Biologie pro gymnázia. Praha: Scientia, 2008, s. 120-124. ISBN 9788086960364. [cit. 2025-12-30].
- [2] - KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Biologie pro gymnázia. Praha: Scientia, 2008, s. 139. ISBN 9788086960364. [cit. 2025-12-30].
- [3] - **Ochoa, Severo**. Severo Ochoa. *Encyclopaedia Britannica*, 2025. Dostupné z: <https://www.britannica.com/biography/Severo-Ochoa> [cit. 2025-12-30].
- [4] - **Cech, Thomas R.** Thomas R. Cech – Nobel Prize in Chemistry 1989. *NobelPrize.org*, 1989. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1989/cech/article/> [cit. 2025-12-30].
- [5] - **Altman, Sidney**. Sidney Altman – Nobel Prize in Chemistry 1989. *NobelPrize.org*, 1989. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1989/press-release/> [cit. 2025-12-30].
- [6] - **Nirenberg, Marshall W.; Khorana, Har Gobind; Holley, Robert W.** The genetic code and the role of RNA. *NobelPrize.org*, 1968. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/advanced-information/> [cit. 2025-12-30].
- [7] - KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Biologie pro gymnázia. Praha: Scientia, 2008, s. 139-140. ISBN 9788086960364. [cit. 2025-12-30].
- [8] - MAŁGOWSKA, Magdalena; GUDANIS, Dorota; TEUBERT, Anna; DOMINIAK, Grażyna a GDANIEC, Zofia. REVIEW PAPER How to study G-quadruplex structures. Online. *BioTechnologia*. 2014, roč. 93, č. 4, s. 381. ISSN 0860-7796. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46592>. [cit. 2026-02-03].
- [9] - HUBÁLKOVÁ, P. G-kvadruplexy v oblasti lidských telomer a jejich terapeutický potenciál. Online. 2015, roč. 109, č. 12, s. 918. [cit. 2026-02-03].

- [10] - SINGH, Abhishek; FERNALDO RICHTIA WINNERDY; CONSTANZA AVENDAÑO AVILA; NOGUÈS, Claude; ANH TUÂN PHAN et al. Interlocking G-Quadruplexes Using a G-Triad•G Connection: Implications for G-Wire Assembly. Online. *Journal of the American Chemical Society*. 2024, vol. 146, no. 38, s. 26034-26040. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jacs.4c05713>. [cit. 2026-02-03].
- [11] - BOSE, K., C. J. LECH, B. HEDDI et al. High-resolution AFM structure of DNA G-wires in aqueous solution. *Nature Communications* [online]. 2018, roč. 9, č. 1, s. 1959. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04016-y>. [cit. 2026-02-09]
- [12] - MAŁGOWSKA, Magdalena; GUDANIS, Dorota; TEUBERT, Anna; DOMINIĄK, Grażyna a GDANIEC, Zofia. REVIEW PAPER How to study G-quadruplex structures. Online. *BioTechnologia*. 2014, roč. 93, č. 4, s. 382. ISSN 0860-7796. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46592>. [cit. 2026-02-03].
- [13] - PETRÁKOVÁ, Monika. *Stopy silného a dlouhodobého stresu v lidských telomerách*. Diplomová práce. Masarykova univerzita, 2017. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/391097/prif_m/. [cit. 3. 2. 2026].
- [14] - HUBÁLKOVÁ, P. G-kvadruplexy v oblasti lidských telomer a jejich terapeutický potenciál. Online. 2015, roč. 109, č. 12, s. 918-919. [cit. 2026-02-03].
- [15] - HUBÁLKOVÁ, P. G-kvadruplexy v oblasti lidských telomer a jejich terapeutický potenciál. Online. 2015, roč. 109, č. 12, s. 920-921. [cit. 2026-02-03].
- [16] - BOSE, Krishnashish; MAITY, Arijit; KHAC HUY NGO; J. JEYA VANDANA; NEIL A. SHNEIDER et al. Formation of RNA G-wires by G4C2 repeats associated with ALS and FTD. Online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022, vol. 610, s. 113-118. ISSN 0006-291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.162>. [cit. 2026-02-03].
- [17] - KUBÍNEK, Roman; MAŠLÁŇ, Miroslav a VŮJTEK, Milan. *Mikroskopie skenující sondou*. Monografie. V Olomouci: Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2003, s. 26. ISBN 80-244-0602-0. [cit. 2026-02-03].

[18] - KUBÍNEK, Roman; MAŠLÁŇ, Miroslav a VŮJTEK, Milan. *Mikroskopie skenující sondou*. Monografie. V Olomouci: Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2003, s. 31. ISBN 80-244-0602-0. [cit. 2026-02-03].

[19] - MAŁGOWSKA, Magdalena; GUDANIS, Dorota; TEUBERT, Anna; DOMINIAK, Grażyna a GDANIEC, Zofia. REVIEW PAPER How to study G-quadruplex structures. Online. *BioTechnologia*. 2014, roč. 93, č. 4, s. 382-384. ISSN 0860-7796. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46592>. [cit. 2026-02-03].

[20] - MAŁGOWSKA, Magdalena; GUDANIS, Dorota; TEUBERT, Anna; DOMINIAK, Grażyna a GDANIEC, Zofia. REVIEW PAPER How to study G-quadruplex structures. Online. *BioTechnologia*. 2014, roč. 93, č. 4, s. 384. ISSN 0860-7796. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46592>. [cit. 2026-02-03].

[21] - MAŁGOWSKA, Magdalena; GUDANIS, Dorota; TEUBERT, Anna; DOMINIAK, Grażyna a GDANIEC, Zofia. REVIEW PAPER How to study G-quadruplex structures. Online. *BioTechnologia*. 2014, roč. 93, č. 4, s. 385-388. ISSN 0860-7796. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46592>. [cit. 2026-02-03].

[22] - ZAHŘÁDKOVÁ, Simona. *Zobrazování fágových částic pomocí AFM mikroskopie*. Brno, 2017, s. 25. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie. Vedoucí práce doc. RNDr. Petr Skládal, CSc. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/th/opa4l/Zahradkova-BP.pdf>. [cit. 2026-02-03].

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Porovnání DNA a RNA struktur (Zdroj: RJ Mackenzie, 2024).....	11
Obrázek 2: Chemická struktura G-kvartetu s centrálním kovovým kationtem, dvouúrovňové a tříúrovňové G-kvadruplexy (Zdroj: Hoque et al., 2022).....	13
Obrázek 3: Možnosti uspořádání G-kvadruplexů podle počtu a uspořádání vláken nukleových kyselin; tetramolekulární paralelní (A), bimolekulární antiparalelní (B), monomolekulární antiparalelní (C), monomolekulární paralelní (D), monomolekulární antiparalelní (E), monomolekulární smíšený (F) G-kvadruplex (Zdroj: Hubálková, 2015).....	14
Obrázek 4: Schematické diagramy znázorňující možné uspořádání spojovacích smyček: okrajové (A), diagonální (B) a dvojité řetězové reverzní smyčky (C) (Zdroj: Małgowska et al., 2012).....	14

Obrázek 5: Rotamery - 90° , 0° a $+90^\circ$ (Zdroj: Bose et al., 2018).....	15
Obrázek 6: Sled předpokládaných událostí po stabilizaci telomerického G-kvadruplexu malomolekulovým ligandem (Zdroj: Hubálková, 2015).....	17
Obrázek 7: Pracovní režimy AFM (a) kontaktní režim (b) bezkontaktní režim (c) poklepový režim (Zdroj: Veerapandian a Yun, 2009)	20
Obrázek 8: CD spektra oligonukleotidu G4T2G4 v různých pufrových podmínkách.....	26
Obrázek 9: CD spektra oligonukleotidu 1-3p G4 v různých pufrových podmínkách.	27
Obrázek 10: CD spektra oligonukleotidu G2AG4AG2 v různých pufrových podmínkách. ...	27
Obrázek 11: CD spektra oligonukleotidu G2AG4AG2 v různých pufrových podmínkách. ...	28
Obrázek 12: Graf UV tání G-kvadruplexů (20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl ₂)....	29
Obrázek 13: Graf UV tání G-kvadruplexů (5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂).....	30
Obrázek 14: AFM topografie kontrolního vzorku plazmidové DNA pSP73.....	32
Obrázek 15: AFM topografie sekvence G4T2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂).	32
Obrázek 16: AFM topografie sekvence G4T2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂).	33
Obrázek 17: AFM topografie sekvence G4T2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl ₂).	33
Obrázek 18: AFM topografie sekvence 1-3p G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂).	34
Obrázek 19: AFM topografie sekvence 1-3p G4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl ₂).	34
Obrázek 20: AFM topografie sekvence G2AG4AG4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl ₂).	35
Obrázek 21: AFM topografie sekvence G4C2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂).	35
Obrázek 22: AFM topografie sekvence G4C2G4 (pufr: 5 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 mM MgCl ₂).	36
Obrázek 23: Histogram distribuce délek G4T2G4 nanostruktur (pufr 5/5/5).....	37
Obrázek 24: Histogram distribuce délek G4C2G4 nanostruktur (pufr 5/5/5).....	37
Obrázek 25: Histogram distribuce délek 1-3p G4 nanostruktur (pufr 5/5/5).....	38
Obrázek 26: Histogram distribuce délek G4T2G4 nanostruktur (pufr 5/10/10).....	39
Obrázek 27: Histogram distribuce délek G4C2G4 nanostruktur (pufr 5/10/10).....	39
Obrázek 28: Histogram distribuce délek 1-3p G4 nanostruktur (pufr 5/10/10).....	40

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Charakteristické píky pozorované ve spektrech CD pro různé topologie kvadruplexů	21
Tabulka 2. Specifikace a analytické parametry výchozích oligonukleotidů	24

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- A, G, C, T, U – Adenin, guanin, cytosin, thymin, uracil (dusíkaté báze)
- AFM – Mikroskopie atomárních sil (*Atomic Force Microscopy*)
- ALS – Amyotrofická laterální skleróza
- CD – Cirkulární dichroismus (nebo cirkulárně dichroická spektroskopie)
- DNA – Deoxyribonukleová kyselina
- ESI-MS – Hmotnostní spektrometrie s elektrospray ionizací
- FTD – Frontotemporální demence
- G4 – G-kvadruplex
- HEPES – Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (pufr)
- HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High-Performance Liquid Chromatography*)
- hTERT – Lidská telomerázová reverzní transkriptáza
- K⁺, Na⁺, Li⁺ – Draselný, sodný, lithný kation
- LLPS – Fázová separace kapalina-kapalina (*Liquid-liquid phase separation*)
- Mg²⁺ / MgCl₂ – Hořečnatý kation / Chlorid hořečnatý
- mM / M – Milimolární / molární koncentrace
- mRNA / tRNA / rRNA – Mediátorová / transferová / ribozomální ribonukleová kyselina
- nm – Nanometr
- NMR – Nukleární magnetická rezonance
- PSPD – Polohově citlivý fotodetektor (*Position Sensitive PhotoDetector*)
- RNA – Ribonukleová kyselina
- STM – Skenovací tunelovací mikroskopie
- UV – Ultrafialové záření / spektroskopie
- $\Delta\epsilon$ – Diferenciální molární absorpční koeficient (jednotka v CD)

11 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Parametry přípravy vzorků pro CD spektroskopii (Tabulky P1 až P6)
- Příloha 2: Parametry přípravy vzorků pro UV spektroskopii (Tabulky P7 až P10)

12 PŘÍLOHY

Příloha 1: CD spektroskopie

Tabulka P1: Složení pufru a odpovídajícího blanku pro CD spektroskopii (20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl₂)

CD spektroskopie- 20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl ₂		
HEPES	Zásobní koncentrace pufru [mM]	20
	Cílová koncentrace pufru [M]	0,5
	Objem pufru [μl]	3,6
KCl	Zásobní koncentrace [mM]	90
	Cílová koncentrace [M]	3
	Objem [μl]	2,7
MgCl ₂	Zásobní koncentrace [mM]	10
	Cílová koncentrace [M]	0,1
	Objem [μl]	9
Blank	Objem HEPES [μl]	36
	Objem KCl [μl]	27
	Objem MgCl ₂ [μl]	9
	Objem H ₂ O [μl]	828
	Objem roztoku [μl]	900

Pozn.: Blank sloužil jako referenční roztok pro CD spektroskopická měření a obsahoval pouze pufr a soli, bez přítomnosti oligonukleotidu.

Tabulka P2: Koncentrace a objemy oligonukleotidů ve vzorcích připravených pro CD spektroskopii (20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl₂)

CD spektroskopie- 20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl ₂				
Oligonukleotid	G4T2G4	1-3p G4	G2AG4AG2	G4C2G4
Koncentrace zásobního roztoku oligonukleotidu [M]	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
Cílová koncentrace oligonukleotidu ve vzorku [M]	$1,67 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,92 \cdot 10^{-4}$
Objem zásobního roztoku [μl]	13,5	13,1	14,1	11,7
Objem H ₂ O [μl]	61,2	61,6	60,6	63
Objem roztoku [μl]	90	90	90	90

Pozn.: Požadované koncentrace oligonukleotidů byly dosaženy ředěním zásobního roztoku vodou v pufru pro CD spektroskopii.

Tabulka P3: Složení pufru a odpovídajícího blanku pro CD spektroskopii (5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂)

CD spektroskopie- 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂		
HEPES	Zásobní koncentrace pufru [mM]	5
	Cílová koncentrace pufru [M]	0,5
	Objem pufru [μl]	2
KCl	Zásobní koncentrace [mM]	5
	Cílová koncentrace [M]	0,2
	Objem [μl]	5
MgCl ₂	Zásobní koncentrace [mM]	5
	Cílová koncentrace [M]	0,1
	Objem [μl]	10
Blank	Objem HEPES [μl]	2
	Objem KCl [μl]	5
	Objem MgCl ₂ [μl]	10
	Objem H ₂ O [μl]	183
	Objem roztoku [μl]	200

Tabulka P4: Koncentrace a objemy oligonukleotidů ve vzorcích připravených pro CD spektroskopii (5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂)

CD spektroskopie- 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂				
Oligonukleotid	G4T2G4	1-3p G4	G2AG4AG2	G4C2G4
Koncentrace zásobního roztoku oligonukleotidu [M]	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$
Cílová koncentrace oligonukleotidu ve vzorku [M]	$1,67 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,92 \cdot 10^{-4}$
Objem zásobního roztoku [μl]	6	5,8	7,5	6,3
Objem H ₂ O [μl]	177	177,2	175,5	176,7
Objem roztoku [μl]	200	200	200	200

Tabulka P5: Složení pufru a odpovídajícího blanku pro CD spektroskopii (20 mM TRIS, 90 mM LiCl, 10 mM MgCl₂)

CD spektroskopie- 20 mM TRIS, 90 mM LiCl, 10 mM MgCl ₂		
TRIS	Zásobní koncentrace pufru [mM]	20
	Cílová koncentrace pufru [M]	1
	Objem pufru [μl]	1
LiCl	Zásobní koncentrace [mM]	90
	Cílová koncentrace [M]	2
	Objem [μl]	2,3
MgCl ₂	Zásobní koncentrace [mM]	10
	Cílová koncentrace [M]	0,1
	Objem [μl]	5
Blank	Objem TRIS [μl]	18
	Objem LiCl [μl]	40,5
	Objem MgCl ₂ [μl]	9
	Objem H ₂ O [μl]	832,5
	Objem roztoku [μl]	900

Tabulka P6: Koncentrace a objemy oligonukleotidů ve vzorcích připravených pro CD spektroskopii (20 mM TRIS, 90 mM LiCl, 10 mM MgCl₂)

CD spektroskopie- 20 mM TRIS, 90 mM LiCl, 10 mM MgCl ₂				
Oligonukleotid	G4T2G4	1-3p G4	G2AG4AG2	G4C2G4
Koncentrace zásobního roztoku oligonukleotidu [M]	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
Cílová koncentrace oligonukleotidu ve vzorku [M]	$1,67 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,92 \cdot 10^{-4}$
Objem zásobního roztoku [μl]	7,5	7,3	7,8	6,5
Objem H ₂ O [μl]	34,2	34,4	33,9	35,2
Objem roztoku [μl]	50	50	50	50

Příloha 2: UV spektroskopie

Tabulka P7: Složení pufru a odpovídajícího blanku pro UV spektroskopii (20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl₂)

UV spektroskopie- 20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl ₂		
HEPES	Zásobní koncentrace pufru [mM]	20
	Cílová koncentrace pufru [M]	0,5
	Objem pufru [μl]	8
KCl	Zásobní koncentrace [mM]	90
	Cílová koncentrace [M]	0,2
	Objem [μl]	9
MgCl ₂	Zásobní koncentrace [mM]	10
	Cílová koncentrace [M]	0,1
	Objem [μl]	20
Blank	Objem HEPES [μl]	8
	Objem KCl [μl]	9
	Objem MgCl ₂ [μl]	20
	Objem H ₂ O [μl]	163
	Objem roztoku [μl]	200

Tabulka P8: Koncentrace a objemy oligonukleotidů ve vzorcích připravených pro UV spektroskopii (20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl₂)

UV spektroskopie- 20 mM HEPES, 90 mM KCl, 10 mM MgCl ₂				
Oligonukleotid	G4T2G4	1-3p G4	G2AG4AG2	G4C2G4
Koncentrace zásobního roztoku oligonukleotidu [M]	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Cílová koncentrace oligonukleotidu ve vzorku [M]	$1,67 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,92 \cdot 10^{-4}$
Objem zásobního roztoku [μl]	12	11,6	12,5	10,4
Objem H ₂ O [μl]	151	151,4	150,5	152,6
Objem roztoku [μl]	200	200	200	200

Tabulka P9: Složení pufru a odpovídajícího blanku pro UV spektroskopii (5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂)

UV spektroskopie- 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂		
HEPES	Zásobní koncentrace pufru [mM]	5
	Cílová koncentrace pufru [M]	0,5
	Objem pufru [μl]	2
KCl	Zásobní koncentrace [mM]	5
	Cílová koncentrace [M]	0,2
	Objem [μl]	5
MgCl ₂	Zásobní koncentrace [mM]	5
	Cílová koncentrace [M]	0,1
	Objem [μl]	10
Blank	Objem HEPES [μl]	2
	Objem KCl [μl]	5
	Objem MgCl ₂ [μl]	10
	Objem H ₂ O [μl]	183
	Objem roztoku [μl]	200

Tabulka P10: Koncentrace a objemy oligonukleotidů ve vzorcích připravených pro UV spektroskopii (5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂)

UV spektroskopie- 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂				
Oligonukleotid	G4T2G4	1-3p G4	G2AG4AG2	G4C2G4
Koncentrace zásobního roztoku oligonukleotidu [M]	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Cílová koncentrace oligonukleotidu ve vzorku [M]	$1,67 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,92 \cdot 10^{-4}$
Objem zásobního roztoku [μl]	12	11,6	12,5	10,4
Objem H ₂ O [μl]	171	171,4	170,5	172,6
Objem roztoku [μl]	200	200	200	200