

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Vendula Sedláková

Modulace metabolismu hub pomocí fytochemikálií
Fungal metabolism modulation by plant substances

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Adéla Čmoková

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2021

.....
Vendula Sedláková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Adéle Čmokové za její nekonečnou trpělivost a čas strávený kontrolou mé práce. Velké díky patří také mé rodině a blízkým, kteří mě při psaní podporovali a dodávali mi motivaci.

Abstrakt

Fytochemikálie jsou biologicky aktivní látky, kterými rostliny ovlivňují organismy ve svém okolí. Houby na jejich přítomnost často reagují změnou metabolismu, která se projevuje spuštěním produkce sekundárních metabolitů, navýšením biomasy nebo regulací virulence. Mechanismus těchto změn lze připisovat schopnosti některých fytochemikálií (např. kurkuminu, EGCG) modulovat epigenetickou informaci. První polovina práce je věnována jednotlivým mechanismům epigenetické modifikace (např. metylace, modifikace histonů), které byly u hub studovány. V druhé polovině jsou přehledně shrnuty studie zaměřené na fytochemikálie, u kterých byla pozorována schopnost modifikovat epigenetickou informaci u eukaryotických organismů. Bakalářská práce tak přináší cenné poznatky o možnosti modifikovat houbový metabolismus fytochemikáliemi, které jsou často odpadními produkty průmyslu. Informace shrnuté v práci mohou mít významný dopad na zkvalitnění biotechnologických postupů, tam kde je snaha o zvýšení výnosu biomasy a navození produkce sekundárních metabolitů v případech, kde je jejich produkce za normálních podmínek umlčená.

Klíčová slova: sekundární metabolity, epigenetika, epigenetické modifikace, fytochemikálie, vláknité houby

Abstract

Phytochemicals are bioactive substances by which plants affect organisms in their vicinity. Fungi often respond to their presence by metabolism alternation, which is manifested by the production of secondary metabolites, an increase in biomass or the regulation of virulence. These changes can be caused by phytochemicals (e.g. curcumin, EGCG) with abilities to modulate epigenetic information. The first half of the work is devoted to mechanisms of epigenetic modification (e.g. methylation, histone modification), which were studied in fungi. The second half summarizes studies focused on phytochemicals, in which the ability to modify epigenetic information in eukaryotic organisms was observed. The bachelor's thesis thus brings valuable knowledge about the possibility of modifying fungal metabolism by phytochemicals, which are often waste products of industry. Information summarized in this work can have a significant impact on improving biotechnological processes, where there is an effort to increase biomass yield or induce the production of secondary metabolites in cases where their production is normally suppressed.

Key words: secondary metabolites, epigenetics, epigenetic modification, phytochemicals, filamentous fungi

Obsah

1. Úvod	1
2. Epigenetika.....	3
2.1. Epigenetika ve spojení s houbami.....	3
2.1.1. Typy modifikací a jejich studium.....	4
2.1.1.1. Metylace DNA.....	4
2.1.1.2. Modifikace histonů.....	6
2.1.1.3. Regulace pomocí RNA interference.....	7
2.1.2. Epigenetické modifikátory.....	9
2.1.2.1. Vliv epigenetických modifikátorů na metabolismus hub.....	9
3. Fytochemikálie.....	11
3.1. Fytochemikálie se schopnostmi epigenetické modifikace.....	11
3.1.1. Fenolické sloučeniny.....	12
3.1.1.1. Katechiny.....	12
3.1.1.2. Kurkumin.....	12
3.1.1.3. Genistein.....	13
3.1.1.4. Resveratrol a pterostilben.....	14
3.1.1.5. Kvercetin.....	15
3.1.1.6. Apigenin.....	15
3.1.1.7. Kyselina gallová.....	16
3.1.1.8. Další fenolické látky.....	16
3.1.2. Ostatní sloučeniny.....	18
3.1.2.1. Sulforafan.....	18
3.1.2.2. Fenethyl-isothiokyanát.....	18
3.1.2.3. Merkaptan.....	19
3.1.2.4. Triptolid.....	19
3.1.2.5. Guggulsteron.....	19
3.1.2.6. Withaferin A.....	20
3.1.2.7. Lykopen.....	20
3.1.2.8. Mahanin.....	20
3.2. Studie na houbách s fytochemikáliemi.....	23
4. Diskuse a závěr.....	24
5. Seznam použité literatury.....	26

Seznam použitých zkratk

Zkratka	Anglický název	Český název
disiRNA	Dicer-independent small RNA	na Diceru nezávislá malá RNA
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA methyltransferase	DNA methyltransferázy
EGCG	epigallocatechin-3-gallate	epigallokatechin-3-gallát
HAT	histone acetyltransferase	histon acetyltransferáza
HMT	histone methyltransferase	histon metyltransferáza
HDAC	histone deacetylase	histon deacetyláza
lncRNA	long non-coding RNA	dlouhá nekódující RNA
MeDIP	methylated DNA immunoprecipitation	imunoprecipitace metylované DNA
MeDIP-chip	methylated DNA immunoprecipitation microarray	metylovaná DNA imunoprecipitace následovaná hybridizací pole
MeDIP-seq	methylated DNA immunoprecipitation sequencing	MeDIP sekvenování
miRNA	micro-RNA-like RNA	micro RNA podobná RNA
miRNA	micro RNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA	messenger RNA
ncRNA	non-coding RNA	nekódující RNA
piRNA	piwi-interacting RNA	piwi-interagující RNA
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
siRNA	small interfering RNA	malá interferující RNA
sRNA	small RNA	malá RNA
TSA	trichostatin A	trichostatin A

1. Úvod

Ve srovnání s rostlinami je houbová diverzita obrovská. Zatímco u rostlin (cca. 270 tisíc popsaných druhů) bylo odhadem popsáno již více než 90 % všech taxonů, u hub se celkový počet druhů odhaduje od dvou až nejnověji k více než šesti milionům taxonů, z čehož bylo popsáno pouze kolem 100 tisíc druhů, tedy odhadem méně než 5 % (Hyde, Jeewon et al. 2020, Baldrian, Větrovský et al. 2021). Stejně jako pro rostliny i pro houby, které také nejsou schopné rychlé pohybové reakce, je vylučování chemických látek jediný možný způsob, jak si vymezit svůj prostor, bránit se patogenům a komunikovat s prostředím. Obě skupiny jsou proto významnými producenty bioaktivních sekundárních metabolitů. Historicky jsou více prostudovány rostlinné sekundární metabolity, kterých bylo opsáno odhadem 350 tisíc. Pro srovnání, houbových metabolitů bylo popsáno více než 500 tisíc, přestože se jejich výzkumu v minulosti nevěnovalo tolik pozornosti. S přihlédnutím k výše zmíněnému faktu, že více než 95 % taxonů hub je ještě neznámých, to představuje také obrovskou skrytou diverzitu houbových sekundárních metabolitů (Bills and Gloer 2017). Ty jsou poté frekventovaně využívány ve farmaceutickém, zemědělském i potravinářském průmyslu, například jako antibiotika (peniciliny, cefalosporiny), imunosupresiva (cyklosporin, rapamycin), látky snižující cholesterol (lovastatin, mevastatin), tumor-supresorové (mitomycin, bleomycin) nebo antivykutika (caspofungin) (Hyde, Xu et al. 2019). V současné době jsou v centru pozornosti především metabolity izolované z houbových endofytů, tedy hub, které se vyskytují uvnitř rostlinných tkání. Jde o látky, kterými se rostliny a houby vzájemně metabolicky ovlivňují, mohou tak například ovlivňovat biomasu, zdravotní stav jeden druhého nebo spouštět či umlčovat produkci sekundárních metabolitů (Ancheeva, Daletos et al. 2020).

Kvůli velkému biotechnologickému a farmaceutickému významu potenciálních nových houbových metabolitů a jejich časově náročnému výzkumu se současné studie zaměřují především na jejich predikci na základě bioinformatických dat. Tyto predikce se provádí i pro substráty, které jsou k jejich syntéze nezbytné (Zerikly and Challis 2009). Dalším příkladem přístupu je simulace podmínek prostředí, ve kterém by organismus danou látku přirozeně vylučoval. Může se jednat o změny fyziologických podmínek, poskytnutí symbiotických partnerů či kompetitorů nebo změnu výživových návyků. K nejúspěšnějším metodám však v současnosti pravděpodobně patří ty molekulární. Mezi nimi genetické metody zahrnující knock-outování genů či řízenou overexpresi transkripčních faktorů nebo metody epigenetické, které nezasahují přímo do nukleotidové sekvence, ale přesto představují

významný nástroj modulace metabolismu (Brakhage and Schroeckh 2011). Právě na epigenetické metody, zahrnující například metylaci DNA nebo modifikaci histonů vyvolávající chromatinové přestavby, se tato práce zaměřuje. V biologii obecně platí, že je dobré začínat s výzkumem tam, kde skončil přírodní výběr, proto se tato práce zaměřila na rostlinné látky jako epigenetické modifikátory. Jsou to látky, s nimiž je velká část hub (např. endofytů, rostlinných patogenů či půdních hub) v kontaktu a kterými pravděpodobně rostlina může přirozeně manipulovat jejich metabolismus. Kromě výše zmíněných důvodů se tato práce soustředí na epigenetické modifikátory rostlinného původu také kvůli jejich cenové dostupnosti a hojnosti (často tvoří odpad potravinářského průmyslu). To z nich dělá vhodné kandidáty pro využití v biotechnologickém průmyslu.

Cílem této práce je představit mechanismy epigenetické modifikace, kterými se v minulosti úspěšně podařilo modulovat metabolismus hub. Dále zde budou velmi komplexně shrnuty studie zabývající se fytochemikáliemi se schopnostmi modulovat epigenom eukaryotických buněk. Informace v této práci shrnuté tak mohou představovat základy pro zkvalitnění a zjednodušení biotechnologických postupů při získávání sekundárních metabolitů nebo při produkci biomasy.

2. Epigenetika

Termín epigenetika byl poprvé použit Conradem Waddingtonem, který ho definoval velmi obecně jako oblast vědy zabývající se běžnými interakcemi mezi geny, jejich produkty a z nich vyplývajícím fenotypovým projevem (Waddington 1942). S postupně přibývajícím vědomostmi v oblasti genetiky a molekulární biologie bylo nutné tuto obecnou definici upravit a rozlišit dědičné změny na ty, které jsou způsobené změnou nukleotidové sekvence a na ty, které nejsou. Podle moderní vědy je tedy epigenetika definována jako podobor genetiky obecně se zabývající změnami v genové expresi, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA a které jsou mitoticky a/nebo meioticky stabilní (Russo, Martienssen et al. 1996).

Mezi hlavní epigenetické mechanismy, kterými lze těchto změn docílit, patří například metylace DNA, modifikace histonů nebo RNA interference. Práce na téma metylace DNA nebo modifikace histonů vycházely již od 60. let 20. století, avšak na sobě nezávisle, například pod záštitou genetiky, vývojové nebo molekulární biologie. Termínem epigenetika se začaly zastřešovat až v 90. letech 20. století (Deichmann 2016). Právě od začátku 21. století zaznamenala epigenetika velký nárůst zájmu, kterému se těší dodnes, a lze ji tak považovat za jeden z nejvíce a nejrychleji se rozvíjejících oborů v oblasti molekulární biologie.

2.1. Epigenetika ve spojení s houbami

Přestože se jedná o takto populární obor, většina pozornosti mu je věnována v souvislosti s výzkumem genetických onemocnění u člověka. Část je také věnována rostlinám, u kterých byl epigenom spojen se stresovou pamětí, a kde se studuje epigenetická modifikace s cílem zvýšit jejich stresovou odolnost proti škůdcům, ale i proti v současné době se měnícím klimatickým podmínkám (Chinnusamy and Zhu 2009). Pouze zlomek vědecké komunity se zabývá studiem epigenetiky na houbách a jim podobných organismech. Jedná se však o oblast s velkým potenciálem, neboť právě sem patří velké množství patogenů napadajících ať už samotného člověka nebo hospodářsky významná zvířata či plodiny. Také mezi ně patří řada biotechnologicky významných producentů, kteří svými sekundárními metabolity zásobují farmaceutický, zemědělský i potravinářský průmysl. A právě epigenetika může představovat způsob, jakým lze modulovat jejich metabolismus, ať už s cílem snížení patogenicity, zvýšení produkované biomasy nebo produkce specifických sekundárních metabolitů.

2.1.1. Typy modifikací a jejich studium

I přesto, že houby a jim podobné organismy zahrnují pestré množství životních forem, lze zde najít určité společné znaky v souvislosti se studiem epigenetických změn. Není radno zapomínat, že přestože jsou tyto eukaryotické organismy studovány pod záštitou botaniky, jsou jejich buňky více příbuzné těm živočišným než rostlinným.

Studie soustředící se na odhalení epigenetické regulace na nepatogenních modelech (kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a vláknité houbě *Neurospora crassa*) odhalily, že mezi tři nejvýznamnější způsoby modifikací houbového epigenomu patří DNA metylace, modifikace histonů a regulace pomocí RNA interference (Aramayo and Selker 2013, Grunstein and Gasser 2013, Allshire and Ekwall 2015).

Studie zabývající se metylací se kvůli nedostatečné citlivosti tehdejších metod dlouhou dobu soustředily pouze na globální hypometylacii nebo stav metylace konkrétních úseků DNA. V současnosti dochází k rozvoji metod na základě imunoprecipitace metylované DNA (MeDIP) nebo její ošetření hydrogensířičitanem. DNA imunoprecipitace poskytuje základ pro metody podrobné celogenomové detekce, jako jsou například metylovaná DNA imunoprecipitace následovaná hybridizací pole (MeDIP-chip) nebo sekvenování nové generace – MeDIP sekvenování (MeDIP-seq). Imunoprecipitace chromatinu zároveň poskytuje základ pro identifikaci umístění modifikovaných histonů. Tato technika je v současné době kombinována s technologií Microarray jako Chip-on-chip a Chip-seq (Kurdyukov and Bullock 2016). Novou výzvou se stává zpracování obrovského množství dat, které je těmito metodami produkováno a které celkově představuje problém v tomto vědním odvětví.

2.1.1.1. Metylace DNA

U eukaryot představuje DNA metylace jeden z nejvýznamnějších způsobů modifikací genomického DNA a spočívá v navázání metylové skupiny na pátý uhlík cytosinu pomocí enzymu DNA methyltransferázy. Na základě této chemické modifikace zde může docházet ke změně afinity DNA vazebných proteinů k DNA nebo k rekrutování proteinů způsobujících represi daného genu. Tímto způsobem může metylace DNA ovlivňovat nejen genovou expresi, ale také genomický imprinting, umlčování transpozonů nebo chromozomální stabilitu (Bird 2002).

DNA methyltransferázy, které metylaci zajišťují, lze dělit do dvou základních skupin. První skupinou jsou udržovací methyltransferázy, které zajišťují metylaci nově nasyntetizovaného vlákna DNA po replikaci podle vlákna starého a mezi které patří houbám vlastní DIM-2

(Kouzminova and Selker 2001) nebo CpG-specifická udržovací methyltransferáza DNMT5 (Bewick, Hofmeister et al. 2019). Druhou skupinou jsou *de novo* methyltransferázy, které jsou důležité pro vytváření DNA metylačních vzorů a kam bychom zařadili pro houby specifickou Msc1 popsanou na druhu *Ascobolus immersus* (Malagnac, Wendel et al. 1997). Počty a typy methyltransferáz se mezi jednotlivými druhy hub výrazně liší (He, Zhang et al. 2020).

V souvislosti s metylačními vzory u eukaryot je známo, že nejvíce metylovaných úseků DNA se nachází v oblastech transponovatelných elementů, genových promotorů a repetitivních sekvencí. I přesto, že bývá hladina DNA metylace ve velké části hub velmi nízká či skoro nedetekovatelná (Bird 2002), je stále významná. Data z více než 40 druhů hub potvrzují, že stejně jako u ostatních eukaryot nejvíce metylací se nachází v transkripčně neaktivních oblastech a repetitivních úsecích, zatímco v transkripčně aktivních oblastech chybí. Tato skutečnost indikuje, že právě u hub DNA metylace ovlivňuje genovou expresi a ve velké míře přispívá k supresi transponovatelných elementů, a tedy k zachování genomové integrity (Bewick, Hofmeister et al. 2019).

Ke snížení metylace může docházet dvěma způsoby. Může se jednat o pasivní proces, při kterém nedojde k metylaci nového vlákna po replikaci, nebo aktivní na replikaci nezávislý proces, při kterém dojde k odstranění metylové skupiny z 5-metylcytosinu (Ooi and Bestor 2008). Látky, které mají schopnost pasivní modifikace (hypometylace), nazýváme hypometylačními činidly. Jedná se například o azacytidin nebo decitabin a mechanismus jejich aktivity spočívá hlavně v inhibici DNA methyltransferáz (Garcia-Manero and Fenaux 2011). Oproti tomu látky se schopností aktivní modifikace (demetylace) nazýváme činidly demetylačními. U těchto látek jsou v současné době známy tři způsoby, kterými k demetylaci může docházet. První z nich je přerušování obtížně štěpitelné vazby mezi uhlíky, kterou je k cytosinu metylová skupina připojena. Druhá z nich zahrnuje výměnu metylované báze a třetí výměnu metylovaného nukleotidu. Ne vždy je ve vědecké literatuře dělení na hypometylační a demetylační činidla dodržováno a oběma výrazy mohou být označovány obecně látky, které snižují množství metylace v genomu (Kress, Thomassin et al. 2001).

Geny související s produkcí sekundárních metabolitů u hub bývají uspořádány do biosyntetických genových klastrů, které jsou často v laboratorních podmínkách kompletně metylované – umlčené. Výhodou tohoto uspořádání je snadná manipulace, obzvláště v případě potřeby dané geny aktivovat (Pfannenstiel and Keller 2019). Aktivování umlčených klastrů a spuštění produkce za laboratorních podmínek normálně neprodukovaných sekundárních metabolitů bylo po aplikaci azacytidinu a RG-108 dosaženo u několika druhů hub, například

u *Aspergillus niger* (Fisch, Gillaspay et al. 2009), *Cladosporium cladosporoides*, *Diatrype* sp. (Williams, Henrikson et al. 2008), *Penicillium citreonigrum* (Wang, Sena Filho et al. 2010), *Isaria tenuipes* (Asai, Chung et al. 2012) nebo *Alternaria* sp. (Sun, Awakawa et al. 2012).

2.1.1.2. Modifikace histonů

Eukaryotická DNA je kvůli své ochraně, ale také komprimaci, nabalována na histonové oktamery, spolu se kterými tvoří základní stavební jednotky chromozomů – nukleozomy. Histonové jádro nukleozomů je tvořeno oktamery složenými z histonů H2A, H2B, H3 a H4. Jedná se o u eukaryotických organismů vysoce konzervované, malé, velmi bazické a pozitivně nabitě proteiny. Právě poslední ze zmiňovaných vlastností jim umožňuje částečně odstínit negativní náboj DNA a usnadňuje její těsnější sbalení. Zde ještě nezmiňovaný histon H1 brání sklouznutí DNA z nukleozomů, které spojuje do vyšší strukturní jednotky 30nm chromatinového vlákna (Thoma, Koller et al. 1979). Chromatin se může v buňce vyskytovat jako rozvolněný transkripčně aktivní euchromatin nebo těsně sbalený transkripčně neaktivní heterochromatin. Změnu stavu chromatinu lze navodit v této práci již zmiňovaným připojením metylové skupiny na cytosin nebo posttranslační modifikací histonových konců. Každý z histonů má N terminální konec, který vyčnívá z nukleozomu a na němž se nachází aminokyseliny, které lze modifikovat a tím ovlivňovat stav chromatinu (Allfrey, Faulkner et al. 1964). Mezi posttranslační modifikace histonových konců patří například acetylace, metylace, fosforylace, ubikvitinace, sumoylace nebo ADP-ribosylace (Bannister and Kouzarides 2011). V současné době uznávaná hypotéza zvaná histonový kód, vysvětlující, jak posttranskripční modifikace histonů ovlivňují genovou expresi, hovoří o tom, že ovlivňují stav okolního chromatinu a představují signální nebo vazebná místa pro distální transkripční oblast (Rando 2012, Prakash and Fournier 2017). Proteiny, které řídí tyto modifikace, lze rozdělit do tří kategorií.

První z nich jsou tzv. „**writer**“ proteiny, které označují místa v chromatinu určená k modifikaci. Lze je dále dělit podle toho, jaký typ modifikace způsobují. Ve spojení s vláknitými houbami jsou studovány především histonové methyltransferázy a acetyltransferázy. V případě histonových methyltransferáz nevede metylace vždy k umlčení dané oblasti jako tomu bylo při použití DNA methyltransferáz, ale může vézt naopak i k její aktivaci. Záleží zde, na v pořadí kolikátou aminokyselinu byla metylová skupina přidána či na kolika místech zároveň k tomu došlo (Martin and Zhang 2005). V současnosti existuje již mnoho důkazů, že nejen metylací DNA, ale i metylací histonů, je běžně regulován vývoj hub a biosyntéza mykotoxinů (Li, He et al. 2017).

Acetylace histonů byla vždy spojována pouze se zvýšením transkripce (Allfrey, Faulkner et al. 1964). Histonové acetyltransferázy nejsou příliš specifické a nerozlišují, na který konkrétní lysin acetylovou skupinu umístí, což vzhledem ke způsobu modifikace není nezbytné. Po připojení acetylové skupiny zde dochází ke snížení pozitivního náboje dané aminokyseliny a tím k částečnému rozvolnění a zpřístupnění molekuly DNA (Workman and Kingston 1998). Na druhu *Aspergillus flavus* byla acetylace prokázána jako významný způsob aktivace genových klastrů spojovaných s produkcí sekundárních metabolitů (Roze, Arthur et al. 2007). Do druhé kategorie bychom zařadili tzv. „eraser“ proteiny, které mažou značky napsané „writer“ proteiny. Řadí se k nim například histon demetylázy, které se dělí na dvě třídy, z toho proteiny jedné třídy obsahují Jumonji C doménu a jsou schopné odstranit metylaci ze všech pozic (Klose, Kallin et al. 2006). Do této kategorie patří také histon deacetylázy. Skrze tyto enzymy se poprvé podařilo spojit remodelaci chromatinu s produkcí sekundárních metabolitů u hub. Výsledky z této studie na druhu *Aspergillus nidulans* ukázaly, že histon deacetyláza HdaA funguje jako negativní regulátor biosyntetického klastru sterigmatocystinu a penicilinu. Tato studie také prokázala působení tricostatinu A, inhibitoru deacetylázy, na produkci sekundárních metabolitů u druhů *Alternaria alternata* a *Penicillium expansum* (Shwab, Bok et al. 2007).

Třetí kategorie obsahuje tzv. „readers“ proteiny. Ty jsou potřeba k umístování a mazání ostatních proteinů, protože dokážou rozeznat správný lokus, kde má dojít k modifikaci. K tomu využívají různé domény, které umí rozpoznat více odlišných typů modifikací (Yun, Wu et al. 2011). Například protein SntB má čtyři domény, ze kterých je každá schopná rozeznávat čtyři odlišné histonové modifikace. Tento protein studovaný na druhu *Aspergillus flavus*, ale známý i z druhů *Neuspora crassa* nebo *Fusarium oxysporum*, byl spojen s velkým množstvím fyziologických procesů. Mutanti, u kterých byl gen kódující tento protein deletován, vykazovali neschopnost tvorby heterokaryonu, potřebnému k sexuálnímu rozmnožování a následné tvorbě spor, zvýšení hladiny acetylace histonu H3 a rozsáhlé změny v počtu a složení syntetizovaných sekundárních metabolitů (Pfannenstiel, Greco et al. 2018).

2.1.1.3. Regulace pomocí RNA interference

Při RNA interferenci může docházet k transkripční i posttranskripční genové regulaci pomocí nekódujících RNA. Může se jednat o malé RNA (sRNA) nebo i dlouhé nekódující RNA (lnRNA). V případě sRNA je lze dělit podle toho, zda-li je k jejich vzniku nutný enzym Dicer. Mezi na Diceru závislé sRNA patří microRNA (miRNA) nebo různé malé intervenujícími RNA (siRNA), zatímco mezi na Diceru nezávislé patří piwi-interagující RNA (piRNA) (Hannon

2002). S množstvím na Diceru závislých sRNA lze manipulovat regulací dostupnosti tohoto enzymu, která může být ovlivněna různými endogenními i exogenními faktory. Změnu v expresi jím upravované sRNA tak může vyvolat hypoxie, oxidativní stres, radiace, kumulace těžkých kovů nebo jiných danému organismu cizích látek, produkovaných ostatními organismy ve formě sekundárních metabolitů (Wiesen and Tomasi 2009).

Interference pomocí microRNA byla využívána již od doby jednobuněčných organismů a pravděpodobně ji používaly organismy napříč všemi říšemi. V současnosti to však vypadá, že u některých organismů došlo k její sekundární ztrátě, a tak lze miRNA nalézt především v rostlinné i živočišné říši (Zheng, Cai et al. 2013). Dlouhou dobu to vypadalo, že se u hub miRNA nevyskytují, dokud nebyly u houby *Neurospora crassa* objeveny molekuly RNA regulující genovou expresi podobně jako miRNA u rostlin a živočichů, nazvané tedy „miRNA like RNA“ (miRNA). U stejného druhu byly také pozorovány na Diceru nezávislé malé RNA (disiRNA). Piwi-interagující RNA zatím nebyly u houbových organismů pozorovány, oproti tomu siRNA jsou zde obvyklé (Lee, Li et al. 2010). Způsob, jakým k regulaci genové exprese při RNA interferenci dochází, se mezi jednotlivými ncRNA liší. Ve většině případů však spuštění/ navýšení jejich produkce vede k zastavení/ snížení genové exprese a naopak zatavení/ snížení jejich produkce vede k jejímu opětovnému spuštění/ navýšení. Může k tomu docházet například formou metylace DNA a histonů, tvorbou heterochromatinu nebo destabilizací cílové mRNA (Zhou, Hu et al. 2010).

Kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* využívá siRNA k umlčení určitých genů nebo modifikaci chromatinu, například při vzniku heterochromatinu v centromerové oblasti chromozomů (Allshire and Ekwall 2015). Mezi nekódující RNA pozorované u houbových organismů patří také dlouhé nekódující RNA (lncRNA). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo zaznamenáno, že s lncRNA přes deacetylaci dokáže za daných podmínek umlčet lokus podílející se na metabolismu galaktózy (Geisler, Lojek et al. 2012). Stejně jako u sRNA i v případě lncRNA má jejich zvýšená produkce ve většině případů negativní efekt na genovou expresi (Mercer, Dinger et al. 2009). Existují však i výjimky a jednou z nich je lncRNA HAX1 u vláknité houby *Trichoderma reesei*, která je v průmyslu využívána jako producent celuláz (Kubicek and Penttila 1998). Dlouhá nekódující RNA nazvaná HAX1 zde slouží právě jako aktivátor celulázové exprese, a tedy představuje potencionální cíl při snaze zvýšení její enzymatické produkce (Till, Pucher et al. 2018).

2.1.2. Epigenetické modifikátory

Látky, které výše zmíněné modulace metabolismu způsobují, nazýváme epigenetickými modifikátory nebo také epigenetickými léčivy. Jejich výzkumu je v současné době věnována velká pozornost. Kromě touhy porozumět základním buněčným, a tedy i epigenetickým procesům, představují motivaci pro studium těchto látek jejich již prokázané, ale i další aktuálně zkoumané kancerostatické účinky. V současné době již americký Ústav pro kontrolu potravin a léčiv schválil několik z těchto látek, jako například azacytidin, vorinostat nebo romidepsin ke komerčnímu použití (Duncan and Campbell 2017). S přesnou definicí epigenetických modifikátorů je to složité, protože ani hranice epigenetiky nejsou pevně stanoveny. Signifikantní účinek těchto látek také často bývá podmíněn přítomností jiných látek – působí pouze v určité kombinaci. Další komplikací představuje fakt, že k zásahu, jehož finálním výsledkem je změna epigenetické informace, může dojít hned na několika úrovních. Můžeme zde pozorovat “skutečné“ epigenetické modifikátory, které mají schopnost přímé metylace/deacetylase/atd., látky, které se chovají jako jejich supresory či enhacery a pak látky působící jako blokátory těchto supresorů/enhancerů. Lze je třídit podle přesného mechanismu, kterým epigenom moduluji, ale některé látky těchto mechanismů uplatňují více, a tedy spadají do více kategorií (Medvedeva, Lennartsson et al. 2015).

Studie zkoumající účinky epigenetických modifikátorů u hub se zaměřují zejména na opětovné spuštění exprese u umlčených klastrů nebo snížení virulence u houbových patogenů. Mezi komerčně využívané látky běžně používané v těchto výzkumech patří například inhibitor DNMT azacytidin nebo inhibitory HDAC kyselina suberoylanilid hydroxamová, butyrát sodný či nicotinamid (Williams, Henrikson et al. 2008, El-Hawary, Sayed et al. 2018).

2.1.2.1. Vliv epigenetických modifikátorů na metabolismus hub

Epigenetické modifikace mohou mít u hub různé výsledky. Mezi nejvíce studované patří regulace produkce sekundárních metabolitů, u které lze ovlivnit jejich pestrost i množství. Ne vždy je však cílem genovou expresi navýšit. V některých případech je žádoucí genovou expresi utlumit, například při produkci některých mykotoxinů nebo v případech, kdy je u houbových patogenů spojena s regulací virulence.

Navození produkce sekundárních metabolitů pomocí epigenetických modifikátorů bylo již v mnoha případech úspěšné. Například u endofytní houby *Leucostoma persoonii* se po vystavení butyrátu sodnému (inhibitoru HDAC) a azacytidinu (inhibitoru DNMT) podařilo zesílit produkci u této houby známých cyklosporinů B (o 360 %), C (o 580 %) a E (o 890 %).

Navíc se zde spustila produkce ještě nepopsaného cyklosporinu R (Beau, Mahid et al. 2012). Autorům další studie se po ošetření entomopatogenní houby *Isaria tenuipes* HDAC inhibitorem SBHA a DNMT inhibitorem RG-108 podařilo vyizolovat ještě neobjevený polyketid tenuipyron (Asai, Chung et al. 2012). S berytátem sodným a azacytidinem byly ošetřeny i kultury endofytické houby *Colletotrichum gloeosporioides*, kde došlo k 263% (azacytidin), 487% (berytát sodný) a 261% (azacytidin + berytát sodný) nárůstu v počtu produkovaných metabolitů (Sharma, Kumar et al. 2017). Ošetření azacytidinem vyvolalo změny i u houby *Penicillium minioluteum*. Dosud neznámé látky, jejichž produkce se zde spustila byly pojmenovány minioliny A-C (Tang, Zhang et al. 2015). Oproti tomu u druhů, u nichž byla naměřena velmi nízká či dokonce nulová hladina metylace, docházelo po přidání azacytidinu naopak k umlčení biosyntetických drah (Wilkinson, Kale et al. 2011, Lin, Zhao et al. 2013, Ma, Lu et al. 2018).

3. Fytochemikálie

Fytochemikálie jsou biologicky aktivní látky produkované rostlinami ve formě primárních i sekundárních metabolitů. Mohou kontrolovat nejen samotný růst rostliny, její opylení, oplodnění a prostředí rhizosféry, ale také slouží jako ochrana před kompetitivy, predátory nebo před houbovými, bakteriálními či virovými patogeny. Tyto látky tak rostlinám pomáhají překonat krátkodobé i trvalé hrozby, ale zároveň mohou mít vážný dopad na životní formy vyskytující se v bezprostředním okolí jejich producentů. Pro okolní organismy často představují signál, že se dostaly do určitého prostředí, jehož podmínkám se budou muset přizpůsobit (Molyneux, Lee et al. 2007).

3.1. Fytochemikálie se schopnostmi epigenetické modifikace

I mezi fytochemikáliemi lze nalézt látky se schopnostmi epigenetické modifikace. Tyto látky často kombinují konkrétní epigenetické mechanismy, které doplňují případnými protizánětlivými či antioxidantními účinky. Není proto překvapením, že velké množství rostlin, ze kterých tyto látky pocházejí, je již po staletí využíváno v tradiční východní i západní medicíně. Extrakt z kořenu kurkumy dlouhé, označované také jako indický šafrán, je běžně používán proti zánětlivým onemocněním v ajurvédě i tradiční čínské medicíně (Shishodia, Sethi et al. 2005). Mezi další tradičně čínské byliny zmíněné v této práci patří trojkřídlec Wilfordův. Ten je již několik století používán k léčbě artritidy, poranění svalů, kostí a onemocnění kůže a u něhož jsou známy protizánětlivé a imunosupresivní účinky (Tao and Lipsky 2000). Resveratrol obsažený ve slupkách plodů vinné révy je považován za původce tzv. francouzského paradoxu. Tento pojem byl zaveden v roce 1992 na základě epidemiologických dat, ze kterých vyplývalo, že obyvatelé Francie mají i přes vysokou konzumaci tučných jídel neobvykle nízkou incidenci kardiovaskulárních onemocnění. Od té doby byla studiu tohoto jevu a všem jeho aspektům věnována velká pozornost. Závěrem těchto studií bylo potvrzení, že konzumace mírného množství vína má spojitost s nižší úmrtností na kardiovaskulární a cerebrovaskulární onemocnění (Catalgol, Batirel et al. 2012). Za přispění moderních technologií lze rozklíčovat jednotlivé bioaktivní látky v těchto rostlinách a podrobně pozorovat jejich účinek na ostatní organismy.

Následující část bude věnována konkrétním látkám rostlinného původu, jejichž shrnutí lze nalézt v tabulce 1 a u kterých byla zkoumána schopnost modulovat eukaryotický organismus ve spojení s epigenetickými modifikacemi, s důrazem na jejich původ, shrnutí úspěšnosti

dosavadních pokusů, které byly s nimi provedeny in vitro i in vivo, jejich dostupnost a z toho vyplývající biotechnologický potenciál.

3.1.1. Fenolické sloučeniny

K fenolům řadíme sloučeniny, které mají hydroxylovou funkční skupinu připojenou přímo na benzenový kruh. Není náhodou, že právě do této skupiny spadá zhruba polovina zde prezentovaných fytochemikálií (Obrázek č. 1). Látky z této třídy jsou již dlouhou dobu intenzivně studovány pro své antioxidační, antialergické, protizánětlivé, protirakovinné nebo antimikrobiální účinky a druhová pestrost jejich producentů je skutečně velká (Rapeanu, Bahrim et al. 2014).

3.1.1.1. Katechiny

Nejhojnější biologicky aktivní látky obsažené v listech *Camellia sinensis*, známé jako čajovník čínský, jsou katechiny, které tvoří až 42 % hmotnosti sušiny jejich listů. Jedná se o flavonoidy, mezi které patří například (-)-epikatechin, (-)-epikatechin-3-gallát, (-)-epigallokatechin a epigallokatechin-3-gallát, také známý jako EGCG (Balentine, Wiseman et al. 1997). Právě EGCG je velmi hojně zkoumán pro své kancerostatické účinky, z nichž část je umožněna díky schopnosti epigenetické modifikace.

Studie probíhající in vitro na čtyřech lidských buněčných liniích ukázala jeho schopnost chovat se jako kompetitivní inhibitor DNA methyltransferáz (především DNMT1), a tím potlačit jejich aktivitu. To poté vedlo ke snížení hladiny hypermetylace, a tedy k reexpresi metylací umlčených genů (Fang, Wang et al. 2003, Hwang, Park et al. 2005). Další studie zkoumající účinky EGCG tentokrát in vitro na dvou různých lidských buněčných liniích i in vivo na myších prokázala jeho na dávkování závislou schopnost navodit globální hypoacetylaci přímou inhibicí HAT (Choi, Jung et al. 2009). Výsledky studie prováděné in vitro na lidských buňkách prokázaly schopnost EGCG regulovat miRNA. Po ošetření EGCG zde došlo ke změně exprese u 61 miRNA. Z to u 13 došlo k upregulaci a u 47 miRNA k downregulaci (Tsang and Kwok 2010).

3.1.1.2. Kurkumin

Další sloučeninou je kurkumin. Tento polyfenol extrahovaný například z oddenku kurkumovníku dlouhého (*Curcuma longa*) je používán zejména jako barvivo v potravinářském a kosmetickém průmyslu nebo v lidovém lékařství. V dnešní době je hojně studován zejména v souvislosti se svými kancerostatickými a antidiabetickými účinky

(Aggarwal and Sung 2009). Epigenetické modifikace za pomoci kurkuminu cílí stejně jako u EGCG hned na několik míst.

Ve studiích soustředících se na jeho vliv na expresi HDAC je popisována jeho schopnost inhibovat HDAC1, 3 a 8, vedoucí ke zvýšenému množství acetylovaných histonů, a tedy i k rozvolnění DNA (Liu, Chen et al. 2005, Chen, Shu et al. 2007, Bora-Tatar, Dayangaç-Erden et al. 2009). Oproti tomu poté, co byly kurkuminem ošetřeny tkáňové kultury z lidských buněk, které po vystavení vodnímu extraktu z cigaretového dýmu ztratily schopnost produkovat HDAC2, došlo k obnovení této produkce (Meja, Rajendrasozhan et al. 2008). Studie z roku 2004 potvrdila, že kurkumin působí také jako specifický inhibitor p300/CBP HAT aktivity (Balasubramanyam, Varier et al. 2004). Také může vyvolat hypoacetylaci histonů (Kang, Cha et al. 2006).

V případě jeho vlivu na metylaci panují ve vědecké komunitě neshody. Studiím potvrzujícím schopnost kurkuminu vyvolávat globální hypometylaci (Liu, Xie et al. 2009, Jha, Nikbakht et al. 2010) oponují studie, které to naopak vyvrací (Kuck, Singh et al. 2010, Hassan, Carlson et al. 2015). Ve studii in vitro na lidských buňkách bylo odhaleno, že po ošetření kurkuminem dochází k upregulaci produkce u 11 mRNA, zatímco u 18 mRNA dochází k jejich downregulaci (Sun, Estrov et al. 2008). Obecně studie pracující s kurkuminem in vitro mají mnohem signifikantnější výsledky, pravděpodobně pro jeho nízkou biologickou dostupnost in vivo (Karius, Schnekenburger et al. 2012).

3.1.1.3. Genistein

Genistein je isoflavon poprvé vyizolován z kručinky barvířské (*Genista tinctoria*) a běžně se vyskytující například v zástupcích z rodu *Lupinus*, fazolích, sóje nebo kávě. Jedná se o fytoestrogen, tedy látku, která se díky své podobnosti s estrogény tvořenými v lidském těle může vázat na estrogení receptory a sloužit tak jako přírodní náhrada při hormonální léčbě (Beck, Rohr et al. 2005). V souvislosti s epigenetickou modifikací se jedná o látku se širokým polem působnosti.

Studie uskutečněná in vitro na několika liniích lidských buněk ukázala schopnost genisteinu zvrátit hypermetylovaný stav DNA, a tím obnovit expresi specifických genů při koncentraci 2-20 $\mu\text{mol/L}$. A potvrdila schopnost inhibovat DNMT (konkrétně DNMT1, 3A a 3B) a to při koncentraci 20-50 $\mu\text{mol/L}$ (Fang, Chen et al. 2005). Studií zkoumající vliv genisteinu na metylaci in vitro je v porovnání se studiemi in vivo větší množství. Jednou z mála in vivo je například studie, která sledovala genisteinem vyvolané zvýšení metylace a s ním spojenou změnu barvy srsti a zvýšenou ochranu před obezitou u potomků myší, kterým byl v březosti

podáván (Dolinoy, Weidman et al. 2006). Dále je o genisteinu známo, že *in vitro* podporuje aktivitu HAT, a tím zvyšuje množství acetylovaných histonů (Majid, Dar et al. 2010). *In vitro* i *in vivo* prováděné studie také potvrzují jeho vliv na expresi miRNA. Účinky genisteinu a především jeho schopnost upregulovat 10 miRNA, a naopak downregulovat 17 miRNA jsou souhrnně shrnuty v (Ratovitski A 2017).

3.1.1.4. Resveratrol a pterostilben

Resveratrol, stilbenoid patřící mezi fytoalexíny, je typicky vylučován rostlinami, které byly poškozeny, jako ochrana před bakteriálními či houbovými patogeny, a lze ho nalézt například ve slupce červených hroznů, burácích či borovicích (Soleas, Diamandis et al. 1997). Významnými producenty resveratrolu jsou také samotné houby, především rostlinné endofyty (Dwibedi and Saxena 2018).

Ve spojení s epigenetickými modifikacemi u něj byla pozorována schopnost inhibovat readers proteiny, které jsou nezbytné k rozpoznávání acetylovaných lysinů, vedoucí ke snížení transkripce (Dutra, Heidenreich et al. 2017). Opačné účinky na genovou expresi měla jeho schopnost inhibovat nejen HDAC1, ale také zmírnit expresi DNMT1 (Mirza, Sharma et al. 2013). Po ošetření resveratrolem byla pozorována demethylace specifických genů, spojená se změnou exprese odpovídajících mRNA (Medina-Aguilar, Pérez-Plasencia et al. 2016). Změna exprese miRNA byla zaznamenána autory další studie, která odhalila, že po přidání resveratrolu do buněčné kultury došlo k upregulaci u 22 miRNA, zatímco u 26 miRNA došlo k downregulaci (Tili, Michaille et al. 2010). Všechny výše zmíněné studie probíhaly *in vitro* na kulturách lidských buněk.

Metoxylovaným derivátem resveratrolu je pterostilben, který lze nalézt například v mandlích nebo listech vinné révy. Od svého analogu se liší vyšší biodostupností a pomalejším rozkladem v metabolismu (Langcake and Pryce 1977).

V kombinaci s resveratrolem vykazuje pterostilben schopnost snížení hladiny i aktivity DNMT1, DNMT3A a 3B *in vitro*. Dále zde došlo k inhibici SIRT1 (HDAC 3. třídy), který reguluje buněčné procesy skrz deacetylaci histonů i nehistonových proteinů (Kala, Shah et al. 2015). V jiné studii naopak ošetření touto látkou vyvolalo v buněčných kulturách navýšení množství DNMT3B a následnou metylaci DNA (Lubecka, Kurzava et al. 2016). Dále byl zjištěn vliv pterostilbenu na expresi některých miRNA. Exprese miR-205 byla v jeho přítomnosti upregulována a naopak miR-663b downregulována (Su, Lee et al. 2015, Wang, Shen et al. 2017).

3.1.1.5. Kvercetin

Kvercetin je polyfenol běžně využívaný v potravinářském průmyslu pro svou hořkou chuť a také jako potravní doplněk. Patří mezi velmi hojně se vyskytující flavonoidy a lze ho nalézt například v mnoha druzích obilovin, ovoce a zeleniny nebo v listech stromů z rodu *Quercus* (Lesjak, Beara et al. 2018).

Po ošetření kvercetinem byla u buněčných kultur pozorována acetylace u histonů H3 (Lee, Chen et al. 2011). Další studie také in vitro poté prokázala jeho schopnost snížení aktivity DNMT1 a 3B, HDAC1, 2, 3, 6, 7, 10, HAT1 a G9A (HMT), které vedlo k poklesu míry globální metylace. Ke konkrétnímu mechanismu autoři vyjádřili myšlenku, že výsledky naznačují, že kvercetin by se mohl chovat jako kompetitivní inhibitor interagující s katalytickým místem více druhů DNMT a HDAC (Kedhari Sundaram, Hussain et al. 2019). Ve velmi nedávné době byla u této látky provedena i in vivo studie a to konkrétně na prasotech, která zkoumala její vliv na globální DNA metylaci. Její výsledky pak ukázaly, že v laboratorních zvířatech došlo k nárůstu množství 5mC, který představuje marker globální metylace, ale i 5hmC, který naopak představuje demetylační marker. Ke změnám v hodnotách však došlo pouze v tukové tkáni a ledvinách, zatímco ve svalové tkáni ani játrech k podobným změnám nedošlo (Burdeos, Blank et al. 2020).

3.1.1.6. Apigenin

Apigenin je polyfenol patřící mezi flavony. Jedná se o běžnou látku hojně dostupnou v mnoha druzích ovoce a zeleniny, ale v největší míře obsaženou zejména v květech rostlin z rodu *Matricaria* a zástupcích z čeledi *Apiaceae* (Ali, Rahul et al. 2017).

Několik výzkumů prokázalo jeho schopnost inhibovat aktivitu HDAC a navozovat globální i specifickou acetylaci. Studie prováděná na tkáňových kulturách, ale i in vivo na myších subjektech, ukázala po ošetření apigeninem zvýšenou acetylaci histonů H3 a H4. Těchto změn bylo dosaženo pomocí inhibice aktivity HDAC1 a HDAC3 a byly dokonce rozsáhlejší než změny vyvolané po použití TSA, komerčně užívaného acetylačního činidla (Pandey, Kaur et al. 2012). Podobný experiment byl později zopakován, tentokrát pouze na buněčných kulturách. Jeho výsledky se shodují, a navíc přináší rozšiřující informace o tom, že apigenin působí na HDAC 1. i 2. třídy a konkrétně byla zaznamenána inhibice aktivity u HDAC1, 3, 4, 5, 6 a 8. V této studii byl také zachycen jeho inhibiční účinek na expresi všech DNMT, s největším vlivem na DNMT1 a 3B, který měl za následek snížení metylace ve specifických CpG oblastech (Paredes-Gonzalez, Fuentes et al. 2014). Apigenin má také vliv na expresi některých miRNA a schopnost synergicky interagovat s některými miRNA inhibitory (Ozbeý, Attar et al. 2019).

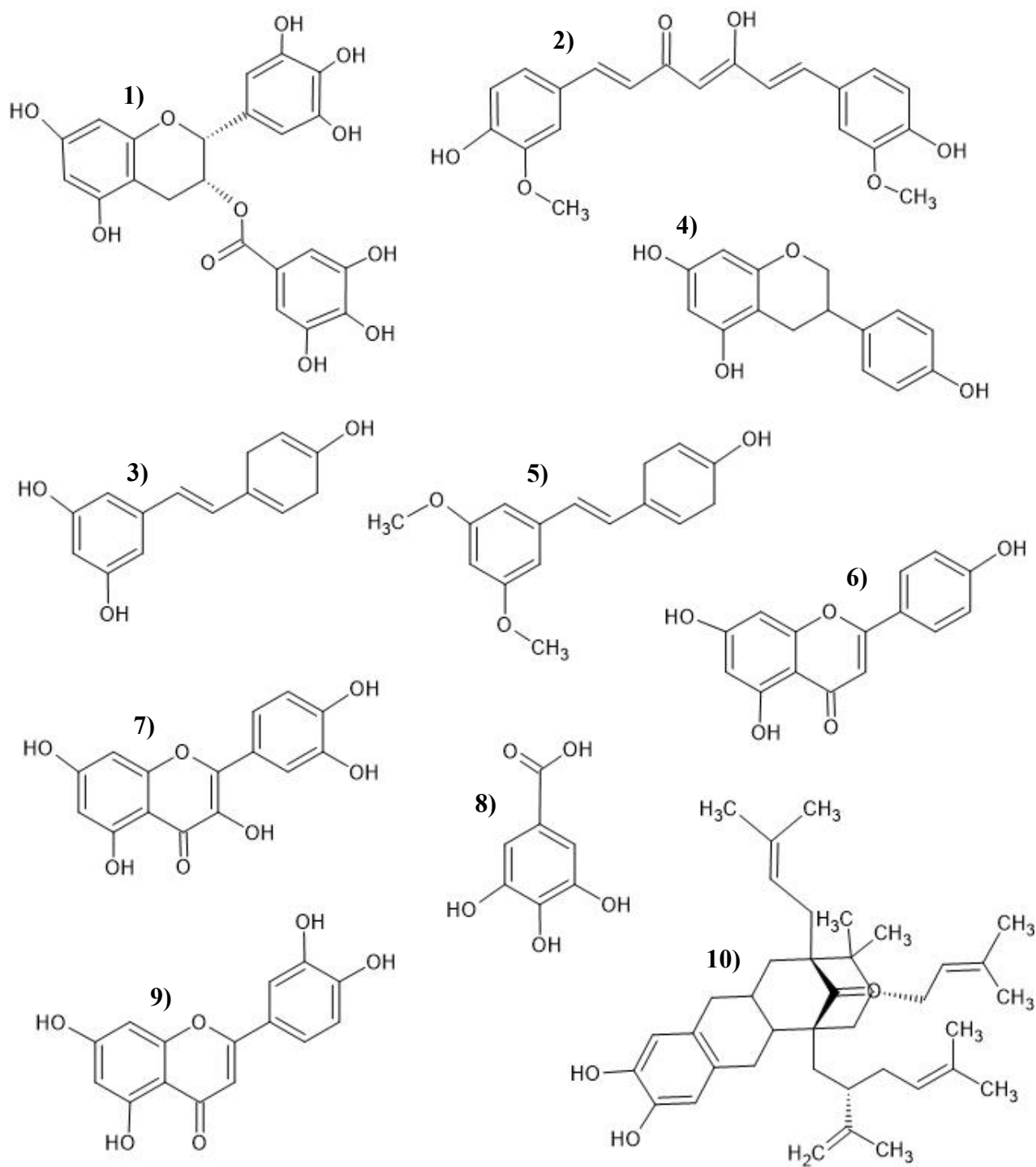
3.1.1.7. Kyselina gallová

Kyselina gallová je velmi běžná fenolická kyselina, kterou lze nalézt napříč celou rostlinnou říší. Ve velké míře je obsažena například v kůře stromů rodu *Quercus*, plodech vinné révy, ale i v mnoha dalších druzích ovoce a zeleniny. Lze ji také získat hydrolyzou velmi běžně se vyskytujících gallotaninů (Pengelly 2004).

První studie, která byla s touto látkou prováděna na buněčných kulturách z pacienta s akutní monocytární leukémií (THP-1), potvrdila její schopnost inhibice aktivity HAT (Kiss, Granica et al. 2012). V další studii prováděné na stejné buněčné linii autoři pozorovali nejen snížení aktivity HAT, ale také zvýšení aktivity HDAC2 (Lee, Lee et al. 2015). Ve stejném roce vyšla i studie přisuzující kyselině gallové schopnost regulace některých miRNA a s nimi spojené modulace buněčných procesů (Paolini, Curti et al. 2015). Opačný efekt na genovou expresi než byl zaznamenán u monocytárních buněčných linií byl zaznamenán v nejnovější studii na buňkách plicního karcinomu (H1299), která dokládá vliv kyseliny gallové na snížení aktivity DNMT1 - při krátkodobém i dlouhodobém vystavení a DNMT3B - pouze při dlouhodobém vystavení, které se projevilo demethylací (Weng, Hung et al. 2018).

3.1.1.8. Další fenolické látky

Mezi další fenolické látky se schopností epigenetické modifikace patří garcinol a luteolin. U obou těchto fytochemikálií byla pozorována schopnost potlačit aktivitu DNMT. Míra inhibice byla v porovnání s EGCG menší, ale stále došlo k více než 50% potlačení jejich běžné aktivity (Fang, Chen et al. 2007). Garcinol se navíc ukázal jako inhibitor HAT in vivo na myších (Monsey, Ruiz et al. 2020), ale i in vitro v buněčných kulturách, kde byl zároveň pozorován jeho vliv na expresi specifických miRNA (Saadat and Gupta 2012). U luteolinu byla u lidských buněčných linií kromě schopnosti snížení exprese všech DNMT sledována i schopnost snížit expresi a aktivitu HDAC1, 2, 3, 6 a 7 (Zuo, Wu et al. 2018).



Obrázek 1 – Fenolické sloučeniny

Chemické struktury fenolických látek: 1 - EGCG, 2 - kurkumin, 3 - resveratrol, 4 - genistein, 5 - pterostilben, 6 - apigenin, 7 - kvercetin, 8 - kyselina gallová, 9 - luteolin, 10 - garcinol.

3.1.2. Ostatní sloučeniny

Chemické zařazení zbylých látek je skutečně pestré (Obrázek č. 2). Schopnost modifikovat epigenetickou informaci lze nalézt například mezi zástupci z řad rostlinných steroidů, organosírových sloučenin nebo alkaloidů.

3.1.2.1. Sulforafan

Sulforafan patří mezi isothiokyanáty, které vznikají hydrolýzou glukosinolátů běžně obsažených v rostlinách z rodu *Brassica*. Konkrétním prekurzorem sulforafanu je glukorafanin, který je v největší míře obsažený v brokolici (Fahey, Zalcmann et al. 2001).

V souvislosti s epigenetickými modifikacemi u něj byla pozorována schopnost *in vitro* inhibovat aktivitu HDAC, díky přímé interakci s jejich aktivním místem, a tak zvýšit hladinu acetylovaných histonů v globálním i lokálním měřítku (Myzak, Karplus et al. 2004). Inhibice HDAC byla dále pozorována i při výzkumech probíhajících *in vivo* na myších i lidech (Myzak, Dashwood et al. 2006, Myzak, Tong et al. 2007). Studie zaměřující se na jiný typ epigenetické modifikace ukázala, že sulforafan má také vliv na metylaci DNA. Poté, co jím byly ošetřeny lidské buněčné kultury, došlo u některých specifických genů k metylaci, zatímco u jiných k demethylaci (Wong, Hsu et al. 2014). V další studii také *in vitro* bylo podrobněji popsáno, že k demethylaci dochází inhibicí DNMT, zejména DNMT1 a DNMT3A, což vede k místně specifické demethylaci CpG ostrovů (Meeran, Patel et al. 2010).

3.1.2.2. Fenethyl-isothiokyanát

Dalším isothiokyanátem se schopností epigenetické modifikace je fenethyl-isothiokyanát (PEITC). Jeho prekurzorem je glukonasturtiin, který lze v největší míře nalézt u potočnice lékařské (*Nasturtium officinale*) (Fahey, Zalcmann et al. 2001).

PEITC se ukázal jako látka úspěšně reaktivující umlčené geny. Tohoto efektu dosahuje díky své schopnosti selektivní metylace a demethylace. Po ošetření PEITC došlo v buněčných kulturách ke zvýšení metylace na lysinu 4 histonu H3 (methylace tohoto místa značí aktivní chromatin), zatímco u lysinu 9 téhož histonu došlo ke snížení metylace (methylace tohoto místa značí naopak heterochromatin) (Kondo, Shen et al. 2004). Další studie ukázala, že rozsah demethylace navozené PEITC byl ve srovnání s komerčně užívaným demetylačním činidlem azacytidinem dokonce vyšší. Dále zde byl pozorován více jak dvojnásobný nárůst v množství acetylovaných histonů H3 a inhibice HDAC 1 vedoucí k dalšímu rozvolnění chromatinu (Wang, Beklemisheva et al. 2007). V pozdější studii se ukázalo, že PEITC inhibuje nejen HDAC 1, ale i HDAC 2, 3 a 6 a snižuje hladinu DNMT1, 3A a 3B. To vše vedoucí k již zmíněné

demetylace a reaktivaci umlčených genů (Boyanapalli, Li et al. 2016). Při studiu PEITC ve spojitosti s microRNA byla po ošetření touto látkou zaznamenána upregulace a dowregulace několika miRNA ve dvou odlišných lidských buněčných kulturách (Zhang, Shu et al. 2016).

3.1.2.3. Merkaptan

Allyl merkaptan je malá organosírová sloučenina získávaná z česneku a některých jiných zástupců z rodu *Allium*. Ve spojení s epigenetickými modifikacemi byla u této látky pozorována schopnost inhibice HDAC. Konkrétně byla zkoumána in vitro kompetiční inhibice lidských HDAC8, do jejichž katalytických míst merkaptan pasuje. Ta vedla k acetylaci histonů H3 i H4 (Nian, Delage et al. 2008).

3.1.2.4. Triptolid

Triptolid je diterpenoidní triepoxid, běžně používaný v tradiční čínské medicíně a poprvé vyizolovaný z druhu trojkřídlec Wilfordův (*Tripterygium wilfordii*) (Kupchan, Dailey et al. 1972).

Studie in vitro na kultuře lidských buněk odhalila jeho schopnost snižovat metylaci konkrétních histonů přes downregulaci histonových methyltransferáz SUV39H1 a EZH2 (Zhao, Chen et al. 2010). Na inhibici histonové metyltransferázy EZH2 se zaměřil další výzkum, ve kterém byla po ošetření triptolidem naměřena signifikantně nižší hladina EZH2 mRNA (Tamgue, Chai et al. 2013). Kolektiv autorů zabývající se triptolidem v roce 2010 se zaměřil i na prokázání jeho schopnosti zvýšení acetylace histonů H3 a H4 přes downregulaci HDAC 8 ve stejném typu buněčné kultury (Zhao, Zeng et al. 2010). Dalším prokázaným epigenetickým mechanismem této látky se ukázala být regulace miRNA. Studie prováděná in vivo na myších ukázala změnu ve 14 a 15 miRNA v závislosti na typu implantovaných buněk, z čehož nejvýraznější byla upregulace miR-142-3p sledována v obou buněčných liniích (MacKenzie, Mujumdar et al. 2013). Problém při in vivo studiích představovala špatná rozpustnost triptolidu ve vodě. Je rozpustný hlavně v organických rozpouštědlech, která jsou pro většinu organismů toxická. Tato překážka byla řešena syntézou derivátu triptolidu, který byl pojmenován minnelid, jehož rozpustnost ve vodě je vysoká, a představuje tak jeho náhradu v budoucích studiích (Chugh, Sangwan et al. 2012).

3.1.2.5. Guggulsteron

Guggulsteron je fytoosteroid obsažený v pryskyřici rostliny *Commiphora mukul* (Tripathi, Malhotra et al. 1984). Studie soustředící se na jeho schopnost epigenetické modifikace potvrdila, že poté, co jím byly ošetřeny buněčné kultury, zde došlo ke signifikantnímu snížení exprese DNMT1 a HDAC1. Předpokládanou demetylaci u vybraných genů se však zaznamenat nepodařilo (Mirza, Sharma et al. 2013).

3.1.2.6. Withaferin A

Withaferin A je steroidní lakton izolovaný z rostlin čeledi *Solanaceae* (Abraham, Kirson et al. 1968). V buněčných kulturách vykazuje schopnost snižovat expresi DNMT1 a HDAC1. Demetylaci konkrétních genů, na které se autoři studie zaměřili, se u něj prokázat nepovedlo (Mirza, Sharma et al. 2013). V další studii byly buněčné kultury ošetřeny withaferinem A, sulforafanem a jejich kombinací. Nejvýraznější reakce byla zaznamenána právě při kombinaci daných látek a jejím výsledkem byla snížená exprese HDAC1, 2 a 3, ale také opačný efekt zvýšení hladiny globální metylace (Royston, Paul et al. 2018).

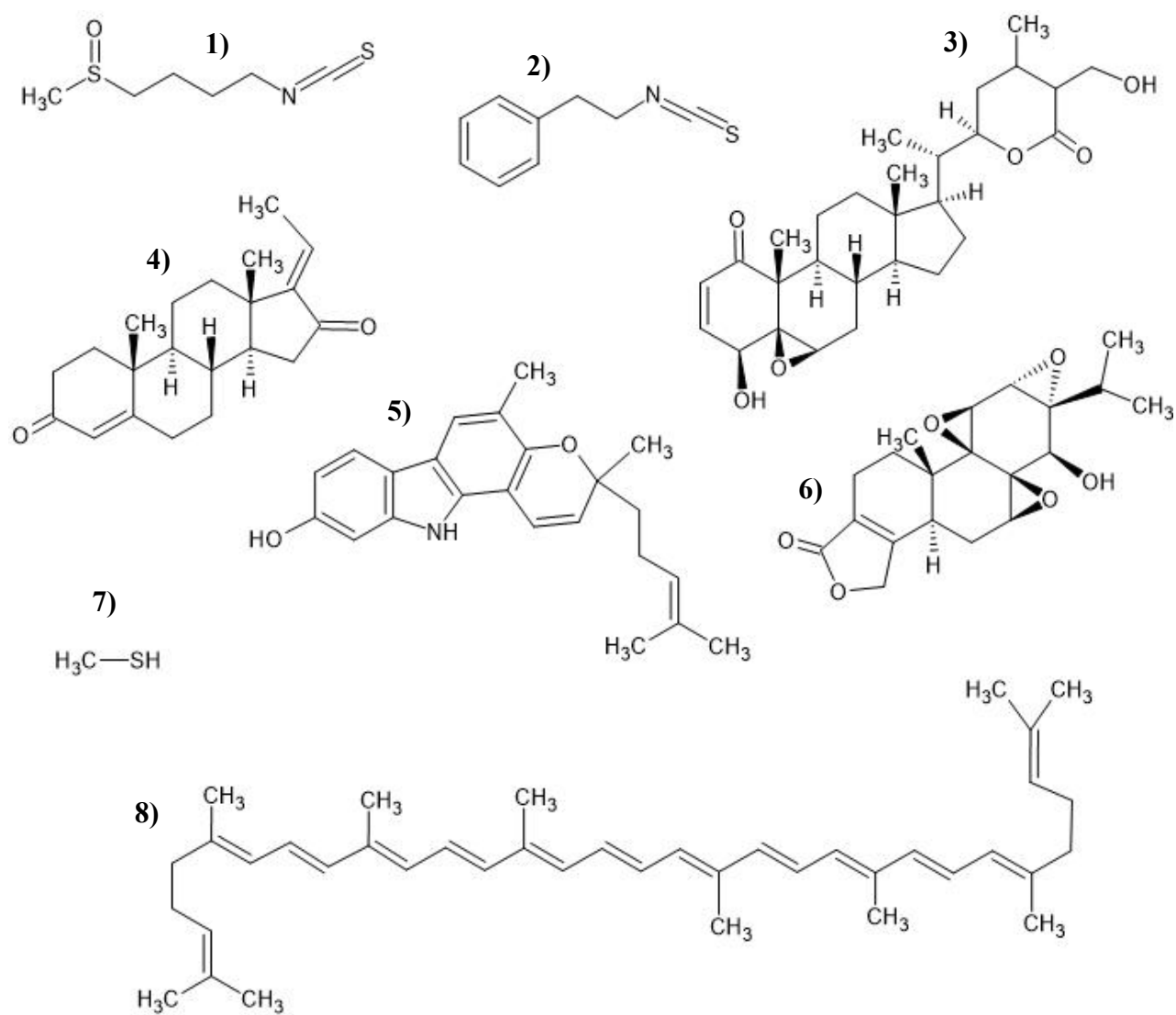
3.1.2.7. Lykopen

Lykopen je jasně červený tetraterpen patřící mezi karotenoidy a využívaný jako barvivo v potravinářském průmyslu. V hojné míře ho můžeme nalézt například v rajčatech a dalším červeném ovoci a zelenině (Di Mascio, Kaiser et al. 1989).

V souvislosti s epigenetickými modifikacemi se ve studii prováděné na lidských tkáňových kulturách ukázala schopnost lykopenu vyvolat genově specifickou demetylaci (King-Batoon, Leszczynska et al. 2008). Podobná studie byla zopakována o pár let později a kromě potvrzení již zjištěného zde byl prokázán inhibiční účinek lykopenu na DNMT3A, kterým mimo jiné autoři vysvětlují genovou specifitu vyvolané demetylace (Fu, Ding et al. 2014).

3.1.2.8. Mahanin

Mahanin je alkaloid obsažený v listech rostliny *Murraya koenigii*. Nejdříve byla u mahaninu sledována schopnost aktivovat expresi u epigeneticky umlčených genů (Jagadeesh, Sinha et al. 2007). Později byl podrobněji objasněn mechanismus reaktivace genů, když se mahanin ukázal jako inhibitor DNMT1 a 3B (Agarwal, Amin et al. 2013).



Obrázek 2 – Ostatní sloučeniny

Chemické struktury ostatních látek: 1 - sulforafan, 2 - fenethyl-isothiokyanát, 3 - withaferin A, 4 - guggulsteron, 5 - mahanin, 6 - triptolid, 7 - merkaptan, 8 - lykopen.

Tabulka 1 - Přehled fytochemikálií

Příložená tabulka představuje stručný přehled zde zmíněných fytochemikálií a jejich epigenetických účinků. Pro přehlednost jsou DNA methyl transferázy (DNMT) označeny modře, histon deacetylázy (HDAC) oranžově, histon acetyltransferázy (HAT) zeleně a histon methyltransferázy (HMT) fialově. Šipky značí, zda-li měla daná látka na enzymy inhibiční nebo naopak stimulační účinek. Pokud se účinek projevil pouze v přítomnosti další látky, je v tabulce označen hvězdičkou.

Název:	Prokázané epigenetické mechanismy:	Citace:
allyl merkaptan	↓HDAC8	(Nian, Delage et al. 2008)
apigenin	↓DNMT1, 3A a 3B, ↓HDAC1 a 3, 4, 5, 6 a 8, regulace miRNA	(Pandey, Kaur et al. 2012, Paredes-Gonzalez, Fuentes et al. 2014, Ozbey, Attar et al. 2019)
EGCG	↓DNMT1, ↓HDAC, regulace miRNA	(Fang, Wang et al. 2003, Hwang, Park et al. 2005, Choi, Jung et al. 2009, Tsang and Kwok 2010)
garcinol	↓DNMT, ↓HAT, regulace miRNA	(Fang, Chen et al. 2007, Saadat and Gupta 2012, Monsey, Ruiz et al. 2020)
genistein	↓DNMT1, 3A a 3B, ↑HAT, regulace miRNA	(Fang, Chen et al. 2005, Majid, Dar et al. 2010, A Ratovitski 2017)
guggulsteron	↓DNMT1, ↓HDAC1	(Mirza, Sharma et al. 2013)
kurkumin	↓HDAC1, 3 a 8, ↓p300/CBP, regulace miRNA	(Balasubramanyam, Varier et al. 2004, Liu, Chen et al. 2005, Chen, Shu et al. 2007, Sun, Estrov et al. 2008, Bora-Tatar, Dayangaç-Erden et al. 2009)
kyselina gallová	↓DNMT1 a 3B, ↑HDAC2, ↓HAT, regulace miRNA	(Kiss, Granica et al. 2012, Lee, Lee et al. 2015, Paolini, Curti et al. 2015, Weng, Hung et al. 2018)
luteolin	↓DNMT1, 2A a 2B, ↓HDAC1, 2, 3, 6 a 7	(Fang, Chen et al. 2007, Zuo, Wu et al. 2018)
lykopen	↓DNMT3A	(Fu, Ding et al. 2014)
mahanin	↓DNMT1 a 3B	(Aggarwal and Sung 2009)
PEITC	↓DNMT1, 3A a 3B ↓HDAC1, 2, 3 a 6, regulace miRNA	(Wang, Beklemisheva et al. 2007, Boyanapalli, Li et al. 2016, Zhang, Shu et al. 2016)
pterostilben	↓DNMT1* a 3A*, ↓*↑DNMT3B, ↓SIRT1*, regulace miRNA	(Kala, Shah et al. 2015, Su, Lee et al. 2015, Lubecka, Kurzava et al. 2016)
kvercetin	↓DNMT1 a 3B, ↓HDAC1, 2, 3, 6, 7, 10, ↓HAT1, ↓G9A	(Kedhari Sundaram, Hussain et al. 2019)
resveratrol	↓DNMT1, ↓HDAC1, regulace miRNA	(Papoutsis, Lamore et al. 2010, Tili, Michaille et al. 2010, Mirza, Sharma et al. 2013, Kala, Shah et al. 2015)
sulforafan	↓DNMT1 a 3A, ↓HDAC	(Myzak, Karplus et al. 2004, Myzak, Dashwood et al. 2006, Myzak, Tong et al. 2007, Meeran, Patel et al. 2010)
triptolid	↓HDAC8, ↓SUV39H1 a EZH2, regulace miRNA	(Zhao, Chen et al. 2010, Zhao, Zeng et al. 2010, MacKenzie, Mujumdar et al. 2013, Tangue, Chai et al. 2013)
withaferin A	↓DNMT1, ↓HDAC1, 2* a 3*	(Mirza, Sharma et al. 2013, Royston, Paul et al. 2018)

3.2. Studie s fytochemikáliemi prováděné přímo na houbách

O modulaci metabolismu hub fytochemikáliemi se pokusilo již několik výzkumných týmů. Například autoři studie z roku 2004 se zaměřili na schopnost druhu *Juglans regia* inhibovat tvorbu aflatoxinů ve vláknité houbě *Aspergillus flavus*. Poté co byla tato rezistence podrobněji lokalizována do perikarpu, došlo k extrakci látek, které jsou za ni zodpovědné, pomocí polárních rozpouštědel. Jen část látek zodpovědných za rezistenci se podařilo vyizolovat. Autoři navrhli hypotézu, že nevyizolovatelné látky patří mezi hydrolyzovatelné tríslovinny (taniny), které si *Aspergillus* rozkládá pomocí tanáz na kyselinu gallovou a kyselinu ellagovou, se kterými poté pokračovali v experimentech. Na médiu simulující perikarp s 0,2% kyselinou gallovou skutečně došlo k inhibici produkce aflatoxinů o 96 %. U kyseliny ellagové ve stejném množství došlo pouze k 16% inhibici. Zajímavé však je, že po přidání této kyseliny v koncentraci pouze 0,05 % došlo naopak ke stimulaci produkce aflatoxinů a to o 148 %, zatímco kyselina gallová i v této koncentraci tvorbu aflatoxinu stále inhibovala ačkoli ne tak výrazně. Množství produkované biomasy nebyla kyselinou gallovou ovlivněna vůbec, zatímco u kyseliny ellagové došlo pouze k počátečnímu zpoždění růstu mycelia, které však bylo během pár dní dorovnáno. Přestože v samotném článku není epigenetická modifikace zmíněna, sami autoři článku dospěli k závěru, že zde pravděpodobně musí docházet k regulaci na úrovni exprese genů, čemuž nasvědčují i další později provedené studie s kyselinou gallovou (Mahoney and Molyneux 2004).

Cílem autorů další studie bylo aktivování umlčených klastrů sekundárních metabolitů u endofytické houby *Hypoxylon anthochroum*. Tito autoři již pracují s pojmem epigenetika a jako zdroj malých molekul schopných epigenetické modifikace si ve své studii vybrali extrakt z česneku (*Allium sativum*) a z listů kari stromu (*Murraya koenigii*). Po ošetření extraktem z česneku přibýlo na HPLC chromatogramu 19 a po ošetření extraktem z kari listů 11 nových píků signalizujících počet navíc produkovaných látek oproti ničím neošetřené kolonii. Tato změna v produkci sekundárních metabolitů je autory připisována epigenetickému působení allyl merkaptanu, inhibitoru HDAC, v případě extraktu z česneku a mahaninu, inhibitoru DNMT, v případě extraktu z kari listů (Mishra, Kushveer et al. 2020).

K modulaci sekundárního metabolomu další endofytické houby *Colletotrichum gloeosporioides* vyizolované z rostliny *Syzygium cumini* byly použity v této práci již zmíněný kurkumin a resveratrol. Při experimentu bylo zaznamenáno 14 nově syntetizovaných sekundárních metabolitů po ošetření extraktem z kurkumovníku a 20 nově syntetizovaných látek po ošetření extraktem ze slupek hroznového vína (Sharma, Kumar et al. 2017).

4. Diskuse a závěr

V této práci jsou shrnuty informace o osmnácti fytochemikáliích, z toho většina z nich byla studována především ve spojení s rakovinou, a tedy na kulturách z lidských (nádorových) buněk. Houbové i lidské buňky jsou sice v obou případech eukaryotického typu, ale také mají velké množství vlastních specifíků, která nelze ignorovat. Vzhledem ke konzervovanosti epigenomu a enzymů s ním spojených a ze zkušeností s látkami, které již byly testovány i na houbách, můžeme usoudit, že schopnost epigenetické modifikace bude mezi eukaryoty podobná. Tomu nasvědčuje i skutečnost, že ve velkém počtu případů dochází u fytochemikálií ke kompetitivní inhibici hned s několika typy DNMT, HDAC, atd., hovořící o značné nespecifitě katalytických míst (Myzak, Karplus et al. 2004, Hwang, Park et al. 2005, Kedhari Sundaram, Hussain et al. 2019). Přesto vyvozovat ze studií na lidských buňkách přesné mechanismy, kterými bude k modifikacím docházet u buněk houbových není dostatečně opodstatněné a konkrétní účinky těchto látek na houby je třeba experimentálně prověřit.

Ze zde zmiňované nespecifity enzymů i samotného shrnutí fytochemikálií je patrné, že jde o velmi komplexní systém a jedna látka může podporovat i více protichůdných modifikací, které mohou vést jak ke zvýšení genové exprese, tak i k jejímu umlčení v závislosti na odlišných faktorech. Reakce na konkrétní látky se mění například v závislosti na modelových organismech. Příkladem toho je genistein, u kterého byla zaznamenána protichůdná reakce na modelu lidských buněk (Fang, Chen et al. 2005, Majid, Dar et al. 2010) a na myším modelu (Dolinoy, Weidman et al. 2006). Na prasečím modelu pak byla sledována tkáňově specifická odpověď při podání kvercetinu (Burdeos, Blank et al. 2020). Rozdílné odpovědi byly zaznamenány i v závislosti na buněčných liniích po ošetření kyselinou gallovou (Kiss, Granica et al. 2012, Lee, Lee et al. 2015, Weng, Hung et al. 2018). Dalším faktorem se ukázaly být interakce některých látek. Například pterostilben vykazoval při kombinovaném podání s resveratrolem opačné účinky (Kala, Shah et al. 2015), než tomu bylo v případě jeho samotného působení (Lubecka, Kurzava et al. 2016). Při použití hub jako modelových organismů měla na působení azacytidinu vliv i celková hladina metylace, která rozhodovala jestli dojde u biosyntetických klastrů ke zvýšení exprese (Tang, Zhang et al. 2015) nebo naopak k jejímu snížení či úplnému vypnutí (Wilkinson, Kale et al. 2011, Lin, Zhao et al. 2013, Ma, Lu et al. 2018).

Mohlo by působit zvláště, že u některých látek (např. u apigeninu, garcinolu nebo luteolinu), zde navržených jako potenciální modulátory metabolismu hub, byly prokázány antimykotické

vlastnosti (Sung, Lee et al. 2007, Tang, Pan et al. 2013, Singh, Kumar et al. 2014). Avšak právě v podmínkách, kdy se hostitelé aktivně brání houbovým patogenům, jsou na to houby často nuceny reagovat aktivováním za normálních podmínek umlčených genů. Do jaké míry mají tyto látky stimulační nebo naopak inhibiční efekt poté velmi záleží také na jejich množství. Rozdílnost vlivu látky na základě její koncentrace lze sledovat ve studii využívající kyselinu ellagovou jako regulátor tvorby aflatoxinů (Mahoney and Molyneux 2004).

V této práci byly poměrně konkrétně diskutovány výhody modulace houbového metabolismu z hlediska jejich biotechnologického potenciálu. Kromě již zmíněné regulace sekundárního metabolomu nebo vlivu na produkci biomasy byl u epigenetických modifikátor zaznamenán vliv na virulenci houbových patogenů. Houby patří mezi nejvýznamnější patogeny hospodářských rostlin a významné patogeny lidí a zvířat (Jain, Sarsaiya et al. 2019). Na entomopatogenních (Hussain 2018) i fytopatogenních modelech (Chen, Wang et al. 2018) bylo sledováno, jak mohou hostitelé, ale i okolní organismy, regulovat míru virulence u hub. Na základě těchto modelů se nabízí myšlenka, že rostlinami vyvolané postupné snižování virulence pomocí epigenetických modifikací by mohlo představovat cestu hub od parazitismu k endofytismu, který je pro rostliny neškodný a občas dokonce prospěšný. Přednost cílení na epigenom pak představuje jeho plasticita a rychlá odezva, která může ve stresových podmínkách představovat velkou výhodu (Alonso, Ramos-Cruz et al. 2019).

Význam fytochemikálií jako epigenetických modifikátorů spočívá i v jejich finanční dostupnosti. Tyto látky jsou často o mnoho levnější, než komerčně užívaná metylační a acetylační činidla. K hojně dostupným a finančně nenáročným fytochemikáliím patří například kvercetin, merkaptan, kurkumin nebo PEITC. Tyto látky také mohou tvořit odpad potravinářského průmyslu jako například taniny, ze kterých lze získávat kyselinu gallovou a ellagovou.

Možnosti ovlivnit produkci sekundárních metabolitů, biomasy nebo regulovat míru virulence u houbových organismů mají velký biotechnologický potenciál. Modulace metabolismu hub, ať už pomocí fytochemikálií nebo komerčních epigenetických modifikátorů, tak do budoucna představuje velmi atraktivní směr výzkumu, jehož výsledky mohou mít vliv hned na několik výrobních odvětví, ale i na každodenní život.

5. Seznam použité literatury

Abraham, A., et al. (1968). "A chemotaxonomic study of *Withania somnifera* (L.) dun." Phytochemistry **7**(6): 957-962.

Agarwal, S., et al. (2013). "Mahanine restores RASSF1A expression by down-regulating DNMT1 and DNMT3B in prostate cancer cells." Molecular cancer **12**(1): 1-12.

Aggarwal, B. B. and B. Sung (2009). "Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets." Trends in pharmacological sciences **30**(2): 85-94.

Ali, F., et al. (2017). "Health functionality of apigenin: A review." International Journal of Food Properties **20**(6): 1197-1238.

Allfrey, V. G., et al. (1964). "Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **51**(5): 786-797.

Allshire, R. C. and K. Ekwall (2015). "Epigenetic regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe*." Cold Spring Harbor perspectives in biology **7**(7): a018770.

Alonso, C., et al. (2019). "The role of plant epigenetics in biotic interactions." New Phytologist **221**(2): 731-737.

Ancheeva, E., et al. (2020). "Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi." Current medicinal chemistry **27**(11): 1836-1854.

Aramayo, R. and E. U. Selker (2013). "Neurospora crassa, a model system for epigenetics research." Cold Spring Harbor perspectives in biology **5**(10): a017921.

Asai, T., et al. (2012). "Tenuipyrone, a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers." Organic letters **14**(2): 513-515.

Balasubramanyam, K., et al. (2004). "Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription." Journal of Biological Chemistry **279**(49): 51163-51171.

Baldrian, P., et al. (2021). "High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity." Fungal Diversity: 1-9.

Balentine, D. A., et al. (1997). "The chemistry of tea flavonoids." Critical Reviews in Food Science & Nutrition **37**(8): 693-704.

Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." Cell research **21**(3): 381-395.

- Beau, J., et al. (2012). "Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma personii*." Marine drugs **10**(4): 762-774.
- Beck, V., et al. (2005). "Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy?" The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **94**(5): 499-518.
- Bewick, A. J., et al. (2019). "Diversity of cytosine methylation across the fungal tree of life." Nature ecology & evolution **3**(3): 479-490.
- Bills, G. F. and J. B. Gloer (2017). "Biologically active secondary metabolites from the fungi." The Fungal Kingdom: 1087-1119.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes & development **16**(1): 6-21.
- Bora-Tatar, G., et al. (2009). "Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies." Bioorganic & medicinal chemistry **17**(14): 5219-5228.
- Boyanapalli, S. S., et al. (2016). "Epigenetic reactivation of RASSF1A by phenethyl isothiocyanate (PEITC) and promotion of apoptosis in LNCaP cells." Pharmacological research **114**: 175-184.
- Brakhage, A. A. and V. Schroeckh (2011). "Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters." Fungal Genetics and Biology **48**(1): 15-22.
- Burdeos, G. C., et al. (2020). "Influence of quercetin on the global DNA methylation pattern in pigs." Food & Function **11**(9): 7421-7426.
- Catalgol, B., et al. (2012). "Resveratrol: French paradox revisited." Frontiers in pharmacology **3**: 141.
- Deichmann, U. (2016). "Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic." Developmental biology **416**(1): 249-254.
- Di Mascio, P., et al. (1989). "Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher." Archives of biochemistry and biophysics **274**(2): 532-538.
- Dolinoy, D. C., et al. (2006). "Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome." Environmental health perspectives **114**(4): 567-572.
- Duncan, K. W. and J. E. Campbell (2017). "Epigenetic modulators." Cancer **II**: 227-227.
- Dutra, L. A., et al. (2017). "Dietary compound resveratrol is a pan-BET bromodomain inhibitor." Nutrients **9**(11): 1172.
- Dwibedi, V. and S. Saxena (2018). "*Arcopilus aureus*, a resveratrol-producing endophyte from *Vitis vinifera*." Applied biochemistry and biotechnology **186**(2): 476-495.

El-Hawary, S. S., et al. (2018). "Epigenetic modifiers induce bioactive phenolic metabolites in the marine-derived fungus *Penicillium brevicompactum*." Marine drugs **16**(8): 253.

Fahey, J. W., et al. (2001). "The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants." Phytochemistry **56**(1): 5-51.

Fang, M., et al. (2007). "Dietary polyphenols may affect DNA methylation." The Journal of nutrition **137**(1): 223S-228S.

Fang, M. Z., et al. (2005). "Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RAR β , and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy." Clinical Cancer Research **11**(19): 7033-7041.

Fang, M. Z., et al. (2003). "Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines." Cancer research **63**(22): 7563-7570.

Fisch, K., et al. (2009). "Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **36**(9): 1199-1213.

Fu, L.-J., et al. (2014). "The effects of lycopene on the methylation of the GSTP1 promoter and global methylation in prostatic cancer cell lines PC3 and LNCaP." International journal of endocrinology **2014**.

Garcia-Manero, G. and P. Fenaux (2011). "Hypomethylating agents and other novel strategies in myelodysplastic syndromes." Journal of Clinical Oncology **29**(5): 516.

Geisler, S., et al. (2012). "Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes." Molecular cell **45**(3): 279-291.

Grunstein, M. and S. M. Gasser (2013). "Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*." Cold Spring Harbor perspectives in biology **5**(7): a017491.

Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-251.

Hassan, H. E., et al. (2015). "Curcumin and dimethoxycurcumin induced epigenetic changes in leukemia cells." Pharmaceutical research **32**(3): 863-875.

He, C., et al. (2020). "The pattern and function of DNA methylation in fungal plant pathogens." Microorganisms **8**(2): 227.

Hussain, A. (2018). Reprogramming the virulence: Insect defense molecules navigating the epigenetic landscape of *Metarhizium robertsii*, Taylor & Francis.

Hwang, J.-T., et al. (2005). "Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase." Biochemical and biophysical research communications **338**(2): 694-699.

- Hyde, K. D., et al. (2020). "The numbers of fungi: is the descriptive curve flattening?" Fungal Diversity **103**(1): 219-271.
- Hyde, K. D., et al. (2019). "The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially." Fungal Diversity **97**(1): 1-136.
- Chen, Y., et al. (2007). "Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells." Basic & clinical pharmacology & toxicology **101**(6): 427-433.
- Chen, Y., et al. (2018). "Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation." Nature communications **9**(1): 1-14.
- Chinnusamy, V. and J.-K. Zhu (2009). "Epigenetic regulation of stress responses in plants." Current opinion in plant biology **12**(2): 133-139.
- Choi, K.-C., et al. (2009). "Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation." Cancer research **69**(2): 583-592.
- Chugh, R., et al. (2012). "A preclinical evaluation of Minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer." Science translational medicine **4**(156): 156ra139-156ra139.
- Jagadeesh, S., et al. (2007). "Mahanine reverses an epigenetically silenced tumor suppressor gene RASSF1A in human prostate cancer cells." Biochemical and biophysical research communications **362**(1): 212-217.
- Jain, A., et al. (2019). "A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation." Bioengineered **10**(1): 409-424.
- Jha, A., et al. (2010). "Reversal of hypermethylation and reactivation of the RARbeta2 gene by natural compounds in cervical cancer cell lines." Folia Biol (Praha) **56**(5): 195-200.
- Kala, R., et al. (2015). "Epigenetic-based combinatorial resveratrol and pterostilbene alters DNA damage response by affecting SIRT1 and DNMT enzyme expression, including SIRT1-dependent γ -H2AX and telomerase regulation in triple-negative breast cancer." BMC cancer **15**(1): 1-18.
- Kang, S.-K., et al. (2006). "Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3-dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells." Stem cells and development **15**(2): 165-174.
- Karius, T., et al. (2012). "MicroRNAs in cancer management and their modulation by dietary agents." Biochemical pharmacology **83**(12): 1591-1601.
- Kedhari Sundaram, M., et al. (2019). "Quercetin modifies 5' CpG promoter methylation and reactivates various tumor suppressor genes by modulating epigenetic marks in human cervical cancer cells." Journal of cellular biochemistry **120**(10): 18357-18369.

King-Batoon, A., et al. (2008). "Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells." Environmental and molecular mutagenesis **49**(1): 36-45.

Kiss, A. K., et al. (2012). "Epigenetic modulation of mechanisms involved in inflammation: influence of selected polyphenolic substances on histone acetylation state." Food Chemistry **131**(3): 1015-1020.

Klose, R. J., et al. (2006). "JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation." Nature reviews genetics **7**(9): 715-727.

Kondo, Y., et al. (2004). "Chromatin immunoprecipitation microarrays for identification of genes silenced by histone H3 lysine 9 methylation." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(19): 7398-7403.

Kouzminova, E. and E. U. Selker (2001). "dim-2 encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*." The EMBO journal **20**(15): 4309-4323.

Kress, C., et al. (2001). "Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted?" FEBS letters **494**(3): 135-140.

Kubicek, C. and M. Penttila (1998). "Regulation of production of plant polysaccharide degrading." Trichoderma And Gliocladium, Volume 2: Enzymes, Biological Control and commercial applications **2**: 49.

Kuck, D., et al. (2010). "Novel and selective DNA methyltransferase inhibitors: docking-based virtual screening and experimental evaluation." Bioorganic & medicinal chemistry **18**(2): 822-829.

Kupchan, S., et al. (1972). "Triptolide and triptiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii*." Amer Chem Soc J.

Kurdyukov, S. and M. Bullock (2016). "DNA methylation analysis: choosing the right method." Biology **5**(1): 3.

Langcake, P. and R. Pryce (1977). "A new class of phytoalexins from grapevines." Experientia **33**(2): 151-152.

Lee, H.-C., et al. (2010). "Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi." Molecular cell **38**(6): 803-814.

Lee, W.-J., et al. (2011). "Quercetin induces FasL-related apoptosis, in part, through promotion of histone H3 acetylation in human leukemia HL-60 cells." Oncology reports **25**(2): 583-591.

Lee, W., et al. (2015). "Gallic acid decreases inflammatory cytokine secretion through histone acetyltransferase/histone deacetylase regulation in high glucose-induced human monocytes." Journal of medicinal food **18**(7): 793-801.

Lesjak, M., et al. (2018). "Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives." Journal of Functional Foods **40**: 68-75.

- Li, Y., et al. (2017). "Histone Methyltransferase aflrmtA gene is involved in the morphogenesis, mycotoxin biosynthesis, and pathogenicity of *Aspergillus flavus*." Toxicon **127**: 112-121.
- Lin, J.-Q., et al. (2013). "5-Azacytidine inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*." Annals of Microbiology **63**(2): 763-769.
- Liu, H.-l., et al. (2005). "Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation." Acta Pharmacologica Sinica **26**(5): 603-609.
- Liu, Z., et al. (2009). "Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent." Bioorganic & medicinal chemistry letters **19**(3): 706-709.
- Lubecka, K., et al. (2016). "Stilbenoids remodel the DNA methylation patterns in breast cancer cells and inhibit oncogenic NOTCH signaling through epigenetic regulation of MAML2 transcriptional activity." Carcinogenesis **37**(7): 656-668.
- Ma, Y. J., et al. (2018). "Effects of 5-azacytidine on growth and hypocrellin production of *Shiraia bambusicola*." Frontiers in microbiology **9**: 2508.
- MacKenzie, T. N., et al. (2013). "Triptolide induces the expression of miR-142-3p: a negative regulator of heat shock protein 70 and pancreatic cancer cell proliferation." Molecular cancer therapeutics **12**(7): 1266-1275.
- Mahoney, N. and R. J. Molyneux (2004). "Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(7): 1882-1889.
- Majid, S., et al. (2010). "Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene B-Cell translocation gene 3 in prostate cancer." Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society **116**(1): 66-76.
- Malagnac, F., et al. (1997). "A gene essential for de novo methylation and development in *Ascobolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase structure." Cell **91**(2): 281-290.
- Martin, C. and Y. Zhang (2005). "The diverse functions of histone lysine methylation." Nature reviews Molecular cell biology **6**(11): 838-849.
- Medina-Aguilar, R., et al. (2016). "Methylation landscape of human breast cancer cells in response to dietary compound resveratrol." PLoS One **11**(6): e0157866.
- Medvedeva, Y. A., et al. (2015). "EpiFactors: a comprehensive database of human epigenetic factors and complexes." Database **2015**.
- Meeran, S. M., et al. (2010). "Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines." PLoS One **5**(7): e11457.

- Meja, K. K., et al. (2008). "Curcumin restores corticosteroid function in monocytes exposed to oxidants by maintaining HDAC2." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **39**(3): 312-323.
- Mercer, T. R., et al. (2009). "Long non-coding RNAs: insights into functions." Nature reviews genetics **10**(3): 155-159.
- Mirza, S., et al. (2013). "Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins." Journal of breast cancer **16**(1): 23.
- Mishra, R., et al. (2020). "Stimulation of secondary metabolite production in *Hypoxylon anthochroum* by naturally occurring epigenetic modifiers." Journal of Food Measurement and Characterization **14**(2): 946-962.
- Molyneux, R. J., et al. (2007). "Phytochemicals: the good, the bad and the ugly?" Phytochemistry **68**(22-24): 2973-2985.
- Monsey, M. S., et al. (2020). "Regulation of Garcinol on Histone Acetylation in the Amygdala and on the Reconsolidation of a Cocaine-Associated Memory." Frontiers in behavioral neuroscience **13**: 281.
- Myzak, M. C., et al. (2006). "Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in Apcmin mice." The FASEB journal **20**(3): 506-508.
- Myzak, M. C., et al. (2004). "A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase." Cancer research **64**(16): 5767-5774.
- Myzak, M. C., et al. (2007). "Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects." Experimental biology and medicine **232**(2): 227-234.
- Nian, H., et al. (2008). "Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter." Carcinogenesis **29**(9): 1816-1824.
- Ooi, S. K. and T. H. Bestor (2008). "The colorful history of active DNA demethylation." Cell **133**(7): 1145-1148.
- Ozbey, U., et al. (2019). "Apigenin as an effective anticancer natural product: Spotlight on TRAIL, WNT/ β -catenin, JAK-STAT pathways, and microRNAs." Journal of cellular biochemistry **120**(2): 1060-1067.
- Pandey, M., et al. (2012). "Plant flavone apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo study." Molecular carcinogenesis **51**(12): 952-962.
- Paolini, A., et al. (2015). "Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs." International journal of oncology **46**(4): 1491-1497.

Paredes-Gonzalez, X., et al. (2014). "Apigenin reactivates Nrf2 anti-oxidative stress signaling in mouse skin epidermal JB6 P+ cells through epigenetics modifications." The AAPS journal **16**(4): 727-735.

Pengelly, A. (2004). "The constituents of medicinal plants."

Pfannenstiel, B. T., et al. (2018). "The epigenetic reader SntB regulates secondary metabolism, development and global histone modifications in *Aspergillus flavus*." Fungal Genetics and Biology **120**: 9-18.

Pfannenstiel, B. T. and N. P. Keller (2019). "On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi." Biotechnology advances **37**(6): 107345.

Prakash, K. and D. Fournier (2017). "Histone code and higher-order chromatin folding: A hypothesis." Genomics and computational biology **3**(2).

Rando, O. J. (2012). "Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code." Current opinion in genetics & development **22**(2): 148-155.

Rapeanu, G., et al. (2014). "Microorganism metabolic activity stimulation by polyphenols." Polyphenols in human health and disease: 513-521.

Ratovitski A, E. (2017). "Anticancer natural compounds as epigenetic modulators of gene expression." Current Genomics **18**(2): 175-205.

Royston, K. J., et al. (2018). "Withaferin A and sulforaphane regulate breast cancer cell cycle progression through epigenetic mechanisms." Experimental cell research **368**(1): 67-74.

Roze, L. V., et al. (2007). "The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster." Molecular microbiology **66**(3): 713-726.

Russo, V. E., et al. (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saadat, N. and S. V. Gupta (2012). "Potential role of garcinol as an anticancer agent." Journal of oncology **2012**.

Sharma, V., et al. (2017). Induction of cryptic metabolite production through epigenetic tailoring in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Syzygium cumini*. Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics, Springer: 169-184.

Sharma, V. K., et al. (2017). "Induction of Cryptic and Bioactive Metabolites through Natural Dietary Components in an Endophytic Fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc." Frontiers in microbiology **8**: 1126.

Shishodia, S., et al. (2005). "Curcumin: getting back to the roots." Annals of the New York Academy of Sciences **1056**(1): 206-217.

Shwab, E. K., et al. (2007). "Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*." Eukaryotic cell **6**(9): 1656-1664.

Singh, G., et al. (2014). "Treatment of dermatophytosis by a new antifungal agent 'apigenin'." Mycoses **57**(8): 497-506.

Soleas, G. J., et al. (1997). "Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?" Clinical biochemistry **30**(2): 91-113.

Su, C.-M., et al. (2015). "Pterostilbene inhibits triple-negative breast cancer metastasis via inducing microRNA-205 expression and negatively modulates epithelial-to-mesenchymal transition." The Journal of nutritional biochemistry **26**(6): 675-685.

Sun, J., et al. (2012). "Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium L.*" Bioorganic & medicinal chemistry letters **22**(20): 6397-6400.

Sun, M., et al. (2008). "Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells." Molecular cancer therapeutics **7**(3): 464-473.

Sung, W.-S., et al. (2007). "Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by lycopene in *Candida albicans*." Journal of microbiology and biotechnology **17**(11): 1797-1804.

Tamgüe, O., et al. (2013). "Triptolide inhibits histone methyltransferase EZH2 and modulates the expression of its target genes in prostate cancer cells." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **14**(10): 5663-5669.

Tang, H.-Y., et al. (2015). "Miniolins A–C, novel isomeric furanones induced by epigenetic manipulation of *Penicillium minioluteum*." Rsc Advances **5**(3): 2185-2190.

Tang, W., et al. (2013). "Garcinol from *Garcinia indica*: chemistry and health beneficial effects." Tropical and Subtropical Fruits: Flavors, Color, and Health Benefits: 133-145.

Tao, X. and P. E. Lipsky (2000). "The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F." Rheumatic Disease Clinics of North America **26**(1): 29-50.

Thoma, F., et al. (1979). "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin." Journal of Cell Biology **83**(2): 403-427.

Tili, E., et al. (2010). "Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF β signaling pathway in SW480 cells." Biochemical pharmacology **80**(12): 2057-2065.

Till, P., et al. (2018). "A long noncoding RNA promotes cellulase expression in *Trichoderma reesei*." Biotechnology for biofuels **11**(1): 1-16.

Tripathi, Y. B., et al. (1984). "Thyroid stimulating action of Z-guggulsterone obtained from *Commiphora mukul*." Planta medica **50**(01): 78-80.

- Tsang, W. P. and T. T. Kwok (2010). "Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells." The Journal of nutritional biochemistry **21**(2): 140-146.
- Waddington, C. H. (1942). "The epigenotype." Endeavour **1**: 18-20.
- Wang, L., et al. (2007). "Dual action on promoter demethylation and chromatin by an isothiocyanate restored GSTP1 silenced in prostate cancer." Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center **46**(1): 24-31.
- Wang, X., et al. (2010). "Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*." Journal of natural products **73**(5): 942-948.
- Wang, Y.-l., et al. (2017). "Pterostilbene suppresses human endometrial cancer cells in vitro by down-regulating miR-663b." Acta Pharmacologica Sinica **38**(10): 1394-1400.
- Weng, Y.-P., et al. (2018). "The inhibitory activity of gallic acid against DNA methylation: application of gallic acid on epigenetic therapy of human cancers." Oncotarget **9**(1): 361.
- Wiesen, J. L. and T. B. Tomasi (2009). "Dicer is regulated by cellular stresses and interferons." Molecular immunology **46**(6): 1222-1228.
- Wilkinson, J. R., et al. (2011). "Expression profiling of non-aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* mutants obtained by 5-azacytosine treatment or serial mycelial transfer." Toxins **3**(8): 932-948.
- Williams, R. B., et al. (2008). "Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome." Organic & biomolecular chemistry **6**(11): 1895-1897.
- Wong, C. P., et al. (2014). "Effects of sulforaphane and 3, 3'-diindolylmethane on genome-wide promoter methylation in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells." PLoS One **9**(1): e86787.
- Workman, J. and R. Kingston (1998). "Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation." Annual review of biochemistry **67**(1): 545-579.
- Yun, M., et al. (2011). "Readers of histone modifications." Cell research **21**(4): 564-578.
- Zerikly, M. and G. L. Challis (2009). "Strategies for the discovery of new natural products by genome mining." ChemBioChem **10**(4): 625-633.
- Zhang, C., et al. (2016). "Phenethyl isothiocyanate (PEITC) suppresses prostate cancer cell invasion epigenetically through regulating microRNA-194." Molecular nutrition & food research **60**(6): 1427-1436.

Zhao, F., et al. (2010). "Triptolide alters histone H3K9 and H3K27 methylation state and induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis in multiple myeloma in vitro." Toxicology **267**(1-3): 70-79.

Zhao, F., et al. (2010). "Effects of triptolide on histone acetylation and HDAC8 expression in multiple myeloma in vitro." Chinese Journal of Cancer Research **22**(2): 148-155.

Zheng, Y., et al. (2013). "microRNAs in parasites and parasite infection." RNA biology **10**(3): 371-379.

Zhou, H., et al. (2010). "Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms." Biology of the Cell **102**(12): 645-655.

Zuo, Q., et al. (2018). "The dietary flavone luteolin epigenetically activates the Nrf2 pathway and blocks cell transformation in human colorectal cancer HCT116 cells." Journal of cellular biochemistry **119**(11): 9573-9582.