

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie



Dora Čermáková

**Enzymová syntéza a studium vlastností DNA nesoucí  
elektron–donorní nebo elektron–akceptorní skupiny na  
nukleobázích**

Enzymatic synthesis and study of the properties of DNA bearing electron–donor or  
electron–acceptor groups on nucleobases

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Veronika Raindlová Ph.D.

Konzultant: prof. Ing. Michal Hocek, CSc., DSc.

Praha, 2025

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

Při tvorbě této práce jsem využila nástroje umělé inteligence (AI) a technologie na nich založené výhradně za účelem jazykové korektury a zvýšení stylistické úrovně textu. Tyto technologie nebyly použity k nahrazení odborných výzkumných aktivit, jako je interpretace dat či formulace vědeckých závěrů.

V Praze dne .....

.....

Dora Čermáková

## Abstrakt

Modifikace nukleových kyselin představují významný nástroj moderní bioorganické chemie umožňující rozšíření jejich přirozených vlastností o nové funkční charakteristiky využitelné ve strukturálních studiích. Tato bakalářská práce se zabývá syntézou a charakterizací modifikovaných 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů obsahující benzodioxolovou elektron-donorní (DOx) nebo difluorfenylovou elektron-akceptorní (2F) modifikaci, a jejich aplikací při enzymové syntéze DNA. Modifikace byly zavedeny do pozice 5 u cytosinu a do pozice 7 u 7-deazaadeninu pomocí Sonogashira cross-coupling reakce. Oba syntetizované trifosfáty byly charakterizovány pomocí NMR a hmotnostní spektrometrie. Pro komplexnější hodnocení vlivu elektronových efektů byly zahrnuty i další nukleosid trifosfáty (dC<sup>OMe</sup>TP a dA<sup>F</sup>TP), které byly syntetizovány ve skupině prof. Michala Hocka.

Byla exprimována rekombinantní termostabilní DNA polymerasa KOD(exo-) v buňkách *E. coli* BL21-AI a společně s dalšími DNA polymerasami – KOD XL, Vent, Vent(exo-) a KOD testována na schopnost inkorporovat modifikované nukleotidy metodou prodlužování primeru (PEX). Enzymová syntéza metodou polymerasové řetězové reakce (PCR) byla testována třemi DNA polymerasami – KOD(exo-), KOD XL a Vent(exo-). Výsledky PEX experimentů ukázaly, že čtyři z pěti testovaných DNA polymeras účinně inkorporují modifikované nukleotidy srovnatelně s přirozenými dNTPs, poskytující produkty o plné délce. Přičemž účinnost syntézy metodou PEX byla potvrzena i hmotnostní spektrometrií. U KOD polymerasy byla pozorována nízká účinnost za vzniku kratších – ne plně syntetizovaných sekvencí. Při metodě PCR došlo k syntéze produktů s modifikacemi u všech třech testovaných DNA polymeras.

Analýzou DNA produktů pomocí cirkulárního dichroismu (CD) a teplotních studií ( $T_m$ ) bylo potvrzeno, že všechny čtyři sledované modifikace zásadně neovlivňují sekundární strukturu DNA ani její teplotu denaturace.

## Klíčová slova

DNA, oligonukleotid, trifosfát, modifikace, enzym, PEX, PCR, biofyzikální vlastnosti

## Abstract

Modification of nucleic acids represents an important tool in modern bioorganic chemistry, enabling the expansion of their natural properties with new functional characteristics that can be utilized in structural studies. This bachelor's thesis focuses on the synthesis and characterization of modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates bearing benzodioxole electron-donating (DOx) and difluorophenyl electron-accepting (2F) functional groups, and their application in enzymatic DNA synthesis. The modifications were introduced at position 5 of cytosine and at position 7 of 7-deazaadenine via Sonogashira cross-coupling reaction. Both synthesized triphosphates were characterized using NMR and mass spectrometry. For a more comprehensive evaluation of the electronic effects, other two nucleoside triphosphates (dC<sup>OMe</sup>TP and dA<sup>F</sup>TP), synthesized in prof. Michal Hock's group, were also included.

Recombinant thermostable DNA polymerase KOD(exo<sup>-</sup>) was expressed in *E. coli* BL21-AI cells and tested along with other DNA polymerases - KOD XL, Vent, Vent(exo<sup>-</sup>) for their ability to incorporate modified nucleotides using primer extension (PEX) method. Enzymatic synthesis by DNA polymerase chain reaction (PCR) was tested with three DNA polymerases – KOD(exo<sup>-</sup>), KOD XL, and Vent(exo<sup>-</sup>). The results from PEX experiments showed that four out of five tested polymerases successfully incorporated modified nucleoside triphosphates, with comparable efficiency to natural dNTPs, providing full-length products which was also confirmed by mass spectrometry. Low efficiency was observed with the KOD polymerase resulting in synthesis of only short and not fully extended sequences. In PCR method, synthesis of products with modifications was observed in all three tested DNA polymerases.

Analysis of DNA products by circular dichroism (CD) and thermal studies ( $T_m$ ) confirmed that all four tested modified dNTPs do not significantly affect neither the secondary structure of DNA nor its melting temperature.

## Key words

DNA, oligonucleotide, triphosphate, modification, enzyme, PEX, PCR, biophysical properties

## Poděkování

Mé největší poděkování patří Ing. Veronice Raindlové, Ph.D. za vedení mé práce, ale také za její všudypřítomnou ochotu a nekonečnou trpělivost. Chtěla bych tímto poděkovat RNDr. Markovi Ondrušovi, Ph.D. za cenné rady při syntéze modifikovaných trifosfátů, pomoc při analýze NMR spekter a za měření UPLC-MS, a také RNDr. Lucii Bednárové, CSc. za měření a interpretaci CD spekter. Mé poděkování patří prof. Ing. Michalu Hockovi, Ph.D., DSc. za možnost vypracování své bakalářské práce v jeho výzkumné skupině. V neposlední řadě nesmím opomenout celý kolektiv výzkumné skupiny prof. Michala Hocka za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Rodině a přátelům děkuji za podporu při studiu.

# Obsah

Úvod.....	11
1. Teoretická část.....	12
1.1. Historie.....	12
1.2. Stavba DNA.....	12
1.3. DNA polymerasy.....	14
1.3.1. KOD DNA polymerasa.....	16
1.4. Syntéza DNA.....	16
1.4.1. PEX.....	17
1.4.2. PCR.....	18
1.5. Syntéza modifikovaných nukleosid trifosfátů.....	19
1.6. DNA modifikace na nukleových bázích.....	21
1.7. Metody analýzy DNA.....	22
1.8. Buněčná linie <i>Escherichia coli</i> BL21-AI.....	23
2. Cíle práce.....	24
3. Materiál a metody.....	25
3.1. Materiál.....	25
3.1.1. Oligonukleotidy.....	25
3.1.2. Nukleosid trifosfáty.....	26
3.1.3. Chemikálie.....	26
3.1.4. Biologický materiál.....	28
3.1.5. Roztoky.....	28
3.1.6. Přístroje a purifikační kolony.....	29
3.2. Metody.....	31
3.2.1. Syntéza 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů dC <sup>DOx</sup> TP a dA <sup>2F</sup> TP.....	31
3.2.2. Expres KOD (exo-) DNA polymerasy.....	32
3.2.2.1. Kultivace buněk <i>Escherichia coli</i> BL21-AI.....	32
3.2.2.2. Spuštění exprese proteinu.....	32
3.2.2.3. Lýza buněk.....	32
3.2.2.4. Separace KOD (exo-) DNA polymerasy pomocí afinitní chromatografie.....	33
3.2.2.5. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného... ..	33
3.2.2.6. Purifikace a měření koncentrace KOD(exo-) DNA polymerasy.....	33
3.2.3. Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou prodlužování primeru.....	34
3.2.4. Separace DNA produktů polyakrylamidovou denaturační elektroforézou.....	34
3.2.5. Syntéza templátu Pveg z plasmidu metodou polymerasové řetězové reakce.....	34
3.2.6. Inkorporace modifikovaných dNTPs metodou polymerasové řetězové reakce.....	35
3.2.7. Separace DNA produktů horizontální elektroforézou v agarosovém gelu.....	35
3.2.8. Analýza DNA.....	35

3.2.8.1.	Měření molekulové hmotnosti metodou MALDI-TOF a metodou UPLC-MS .....	36
3.2.8.2.	Určování teploty denaturace připravených oligonukleotidů .....	36
3.2.8.3.	Určování formy DNA metodou cirkulárního dichroismu .....	36
4.	Výsledky .....	37
4.1.	Syntéza modifikovaných trifosfátů .....	37
4.1.1.1.	Charakterizace syntetizovaných nukleosidů a nukleosid trifosfátů .....	37
4.1.1.2.	Výtěžek syntézy modifikovaných nukleosid trifosfátů .....	42
4.2.	Expres KOD(exo-) DNA polymerasy .....	43
4.3.	Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou extenze primeru (PEX) .....	45
4.3.1.	Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou PEX s templátem o délce 19 nukleotidů .....	45
4.3.2.	Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou PEX s templátem o délce 31 nukleotidů .....	50
4.4.	Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou polymerasové řetězové reakce .....	54
4.4.1.1.	Syntéza templátu Pveg pomocí polymerasové řetězové reakce .....	54
4.4.1.2.	Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou PCR s templátem Temp <sup>Pveg</sup> .....	55
4.5.	Analýza DNA .....	59
4.5.1.	Měření molekulové hmotnosti metodou MALDI-TOF a metodou UPLC-MS .....	59
4.5.2.	Studium vlivu modifikace na strukturu DNA metodou cirkulárního dichroismu .....	62
4.5.3.	Studium vlivu modifikací DNA na teplotu denaturace .....	63
5.	Diskuse .....	64
6.	Závěr .....	66
7.	Citovaná literatura .....	67

## Seznam zkratek

6-FAM	6-karboxyfluorescein
A	adenin
APS	persíran amonný
MeCN	acetonitril
bp	páry bází
CD	cirkulární dichroismus
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dGMP	2'-deoxyguanosin monofosfát
dNTP	2'-deoxyribonukleosid trifosfát/y
dACTG	směs dATP, dGTP, dCTP, dTTP
dPAGE	denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza
dsDNA	dvouvláknová DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	elektrosprejová ionizace
eq	ekvivalent
exo-	bez exonukleasové aktivity
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
g	gravitační zrychlení
G	guanin
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
His-tag	polyhistidinová značka
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (z angl. High Resolution Mass Spectrometry)
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
LB	Lysogeny broth
M <sub>w</sub>	molekulová hmotnost [Da]

min	minuta
MALDI-TOF	laserová ionizace za přítomnosti matrice s detektorem doby letu
MS	hmotnostní spektrometrie
NIC	buněčná kultura před zahájením exprese proteinu (z angl. noninduced cells)
NMR	nukleární magnetická rezonance
nt	nukleotid
OD <sub>600</sub>	optická denzita měřená při 600 nm
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerasová řetězová reakce
PEX	extenze primeru
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	rotace za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsíranu sodného
T	thymin
TEAB	hydrogenuhličitan triethylamonný
TBE	tris-borát-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylen-1,2-diamin
T <sub>m</sub>	teplota denaturace
TMAC	tetramethylammonium chlorid
TPPTS	trisulfonát trifenyfosfinu sodného
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPLC	ultra vysoko účinná kapalinová chromatografie
UV-Vis	ultrafialovo-viditelná oblast elektromagnetického záření

# Úvod

Nukleové kyseliny představují klíčové biomolekuly, které zajišťují uchovávání, přenos a expresi genetické informace. Jejich chemická modifikace umožňuje rozšíření biologické funkce o specifické fyzikálně-chemické vlastnosti, což otevírá nové možnosti jejich využití nejen v oblasti molekulární biologie a biomedicíny, ale také v rozvíjející se oblasti molekulární elektroniky. Jedním z progresivních směrů tohoto výzkumu je zavádění elektron-donorových a elektron-akceptorových substituentů na nukleobáze DNA. Tyto modifikace mohou ovlivňovat šíření náboje v molekule DNA, stabilitu dvoušroubovicové struktury i interakce jednotlivých párů bází.

Zatímco klasická chemická syntéza modifikovaných nukleotidů je často limitována nízkým výtěžkem a nekompatibilitou s určitými typy modifikací (zejména v případě větších substituentů nebo delších sekvencí), enzymová syntéza poskytuje efektivní a flexibilní alternativu. Umožňuje selektivní inkorporaci modifikovaných 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů (dNTP) do DNA řetězce pomocí termostabilních DNA polymeras, a to za podmínek blízkých fyziologickým. Pro charakterizaci vzniklých modifikovaných DNA struktur jsou nezbytné pokročilé analytické techniky, jako je spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD), která umožňuje sledovat změny sekundární struktury DNA, nukleární magnetická rezonance (NMR) pro detailní analýzu strukturních interakcí. Dále se využívají metody hmotnostní spektrometrie (MS) ke stanovení přesné molekulové hmotnosti syntetizovaných oligomerů a fluorescenční spektroskopie pro studium dynamiky interakcí modifikovaných DNA sekvencí s jinými biomolekulami.

Cílem této práce bylo syntetizovat 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí specifické modifikace ( $dC^{DOx}TP$  a  $dA^{2F}TP$ ), exprimovat termostabilní KOD(exo-) DNA polymerasu z buněk *Escherichia coli* BL21-AI a studovat schopnost této polymerasy, společně s dalšími vybranými enzymy, inkorporovat tyto modifikované nukleotidy metodami prodlužování primeru (PEX) a polymerasové řetězové reakce (PCR). Následně pak analyzovat biochemické a biofyzikální vlastnosti vzniklých DNA produktů, včetně vlivu zavedených modifikací na jejich strukturu a teplotu denaturace.

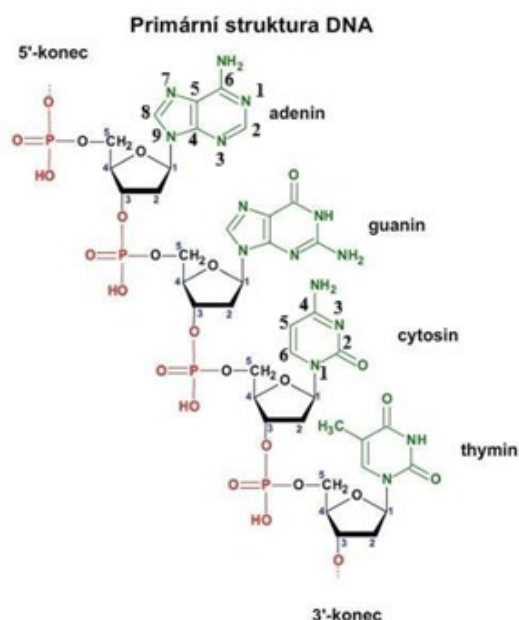
# 1. Teoretická část

## 1.1. Historie

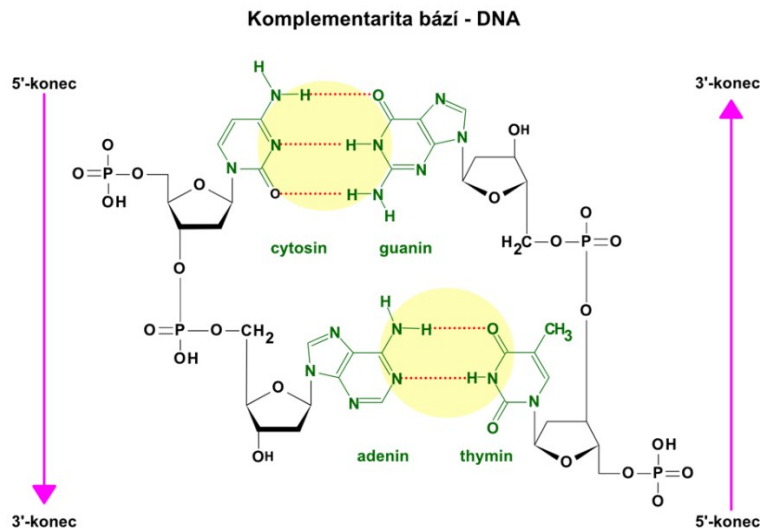
První DNA byla izolována švýcarským chemikem Friedrichem Miescherem, ten z hnisu obvazů svých pacientů extrahoval látku „nuklein“, nicméně role této látky byla objevena až později. Velmi významným pokrokem na poli studia DNA byl objev její dvoušroubovicové struktury, tento objev učinili v roce 1953 biologové Francis Crick a James Watson. Vysvětlili párování bází na základě komplementarity a popsali způsob přenosu genetické informace. Crick následně popsal centrální dogma molekulární biologie, které popisuje přenos genetické informace od DNA přes RNA až k proteinům [1].

## 1.2. Stavba DNA

Molekula DNA je dlouhý polymer tvořen jednotkami nukleotidů, ty jsou tvořeny vždy třemi složkami: kyselinou fosforečnou, pěti uhlíkatým monosacharidem 2'-deoxyribosou a dusíkatou bází [2]. Kyselina fosforečná a 2'-deoxyribosa tvoří kostru DNA a díky kovalentním vazbám drží dlouhý řetězec pohromadě [3]. DNA obsahuje čtyři typy dusíkatých bází. Mezi purinové patří adenin a guanin, zatímco cytosin a thymin se řadí mezi pyrimidinové báze (obrázek č. 1). Dusíkaté báze se spojují vodíkovými můstky na základě principu komplementarity. Guanin se váže na cytosin třemi vodíkovými můstky, zatímco adenin se spojuje s thyminem dvěma [2].



Obrázek 1: Primární struktura DNA. Upraveno, obrázek dostupný z [4]. Jednotlivé nukleotidy jsou spojené fosfodiesterovou vazbou, která vzniká mezi fosfátovou skupinou navázanou na 5. uhlíku pentózy jednoho nukleotidu a hydroxylovou skupinou na 3. uhlíku pentózy následujícího nukleotidu.



Obrázek 2: Komplementarita bází. Upraveno, obrázek dostupný z [4]. Řetězec DNA má dva konce – na jednom se nachází hydroxylová skupina (-OH) na 3. uhlíku cukru (označovaný jako 3' konec) a na druhém je fosfátová skupina připojená k 5. uhlíku cukru (tzv. 5' konec). Jednotlivé nukleotidy jsou mezi sebou propojeny vodíkovými můstky. Adenin se páruje s thyminem pomocí dvou vodíkových vazeb a guanin s cytosinem pomocí třech.

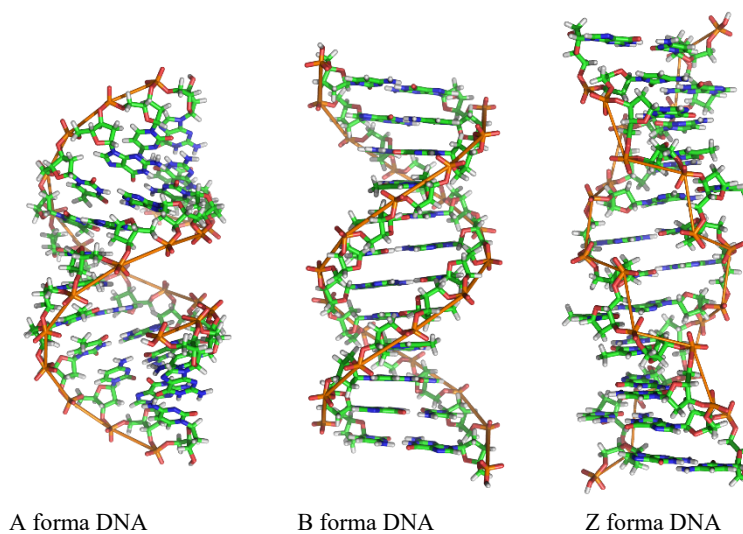
DNA je charakteristická svou dvoušroubovicovou strukturou (nazývanou také jako double helix) složenou ze dvou antiparalelních řetězců (obrázek č. 2). Směr řetězce je určen podle orientace fosfátové skupiny, ta je vždy připojena na 5' konec, naopak na 3' konci je připojena volná hydroxylová skupina. Antiparalelní uspořádání znamená, že jeden řetězec běží směrem 5' → 3' zatímco druhý řetězec běží opačně 3' → 5'. Tato antiparalelní orientace umožňuje správnou replikaci a čtení genetické informace. Jednotlivé řetězce jsou vzájemně spojeny vodíkovými vazbami mezi nukleotidy [1] [2].

DNA může existovat v různých strukturálních formách v závislosti na podmínkách prostředí a sekvenci nukleotidů. U všech forem DNA platí, že páteř tvoří cukr-fosfátová kostra a sekundární struktura drží pohromadě díky vodíkovým vazbám.

Nejběžnější formou, kterou nalezneme v živých buňkách je B forma DNA (obrázek č. 3), jedná se o pravotočivou dvoušroubovici, která obsahuje 10 páru bází na jednu otáčku s délkou 3,4 nm. Každý pár bází vytváří specifické asymetrické prostorové uspořádání širšího velkého a užšího malého žlábků. Velký žlábek je schopen specificky interagovat s proteiny, malý žlábek interaguje s proteiny nespecificky a podílí se na stabilizaci struktury DNA [3].

Další, i když za fyziologických podmínek méně častou formou DNA, je A forma. Tato forma pravotočivé dvoušroubovice se častěji vyskytuje v prostředí s nižší vlhkostí. Oproti B formě je širší a kratší s 11 páry bází na jednu otáčku a délkou 2,3 nm [5].

Forma Z je levotočivá dvoušroubovice. Tato DNA má specifické zigzag uspořádání páteře, což jí snadno odlišuje od běžnějších B a A forem DNA. Šířku má pouze 1,8 nm, což je nejméně z výše zmíněných forem. Na jednu otáčku připadá 12 párů bází a délka otáčky činí 4,6 nm. Z forma DNA se vyskytuje zřídka, zejména ve střídajících se purin-pyrimidinových párech, při určitých iontových koncentracích nebo se objevuje při různých buněčných procesech (např. transkripce, regulace exprese genů) [6]



Obrázek 3: Formy DNA, dostupné z [7] pravotočivá A forma (vlevo), pravotočivá B forma (uprostřed), levotočivá Z forma (vpravo)

Mezi další velmi vzácné formy DNA patří pravotočivá C forma, která vzniká při specifické vlhkosti a v přítomnosti  $\text{Li}^+$  a  $\text{Mg}^{2+}$  iontů, dále pak D forma, které se vyskytuje v případě nízké koncentrace guaninu [5].

### 1.3. DNA polymerasy

Replikace DNA je základní biologický proces, při kterém buňka vytváří přesnou kopii své DNA před dělením, aby zajistila předání genetické informace dceřiným buňkám. Tento proces začíná rozpletením dvoušroubovice pomocí enzymu helikasy, který rozruší vodíkové vazby mezi dusíkatými bázemi. Na uvolněných vláknech poté DNA polymerasy syntetizují nová komplementární vlákna připojováním vhodných nukleotidů podle principu párování bází (A-T,

C-G). DNA polymerasy nejen zajišťují růst nových řetězců, ale také opravují chyby, čímž přispívají k vysoké přesnosti replikace [8] [9].

V 60. letech byla poprvé objevena DNA polymerasa v lyzátech *E. coli*. Tento objev poskytl biochemický základ pro model replikace DNA, který vytvořili Watson a Crick. Později bylo zjištěno, že identifikovaná DNA polymerasa, dnes známá jako DNA polymerasa I, není hlavním enzymem odpovědným za replikaci DNA v *E. coli*. Ukázalo se, že prokaryotické i eukaryotické buňky obsahují několik různých DNA polymeras, které mají specifické úkoly v replikaci a opravě DNA. Další typy DNA polymeras byly objeveny díky experimentu s mutantní *E. coli*, která neobsahovala DNA polymerasu I, ukázalo se, že i tento mutant byl schopen růstu. To vedlo ke zjištění, že DNA polymerasa I není nutná pro replikaci, ale významně se podílí na opravě DNA. Díky dalším experimentům s *E. coli* byly objeveny i další typy DNA polymeras [10].

Na základě sekvence aminokyselin lze DNA polymerasy rozdělit do několika skupin: A, B, C, X, Y a RT. Skupina A se dále dělí podle replikativní nebo opravné funkce. Replikativní DNA polymerasy syntetizují novou DNA na základě komplementarity bází k templátu a opravné polymerasy kontrolují nově nasyntetizovaná vlákna a opravují případné chyby v párování bází díky své 3' → 5' i 5' → 3' exonukleasové aktivitě. Mezi DNA polymerasy zajišťující replikaci DNA skupiny A patří eukaryotická mitochondriální DNA polymerasa  $\gamma$  a T7 DNA polymerasa. Mezi ty s opravnou funkcí patří DNA polymerasa I z *E. coli* a Bst DNA polymerasa I z *Bacillus stearothermophilus* [11] [12].

DNA polymerasy skupiny B jsou velmi přesné v syntéze vedoucího i opoždujícího vlákna DNA a také velmi účinně opravují chyby díky 3' → 5' exonukleasové aktivitě, řadí se mezi ně *E. coli* DNA polymerasa II, Pfu DNA polymerasa izolována z *Pyrococcus furiosus* [12].

Skupina C zahrnuje DNA polymerasy podílející se na replikaci bakteriálního genomu. Příkladem je DNA polymerasa III z *E. coli*.

Na opravě DNA po chemickém, oxidativním nebo radiačním poškození se podílejí DNA polymerasy patřící do skupiny X, příkladem jsou pol  $\beta$ , pol  $\mu$ , pol  $\lambda$ .

Rodina RT zahrnuje eukaryotické telomerasy a reverzní transkriptázy nalezené ve virech, které využívají RNA jako templát pro syntézu řetězce DNA [13].

DNA polymerasy jsou komplexní enzymy s několika podjednotkami, které se komplexně podílí na replikaci. Jejich funkcí je inkorporace volného nukleotidu na základě komplementarity dusíkatých bází. Před samotným začátkem syntézy nového DNA je zapotřebí primer. Krátký

úsek RNA, který poskytuje volný 3' hydroxylový konec, na který může DNA polymerasa navázat první nukleotid. Syntéza probíhá vždy ve směru  $5' \rightarrow 3'$ , což znamená, že nové nukleotidy se připojují k 3' hydroxylové skupině rostoucího řetězce [14].

Exonukleasová aktivita DNA polymerasy umožňuje opravu chyb při syntéze DNA. Polymerasy mohou mít dva typy exonukleázové aktivity:  $5' \rightarrow 3'$  a  $3' \rightarrow 5'$  [15].

$3' \rightarrow 5'$  exonukleasová aktivita (známá jako proofreading) je schopna odstranit chybný nukleotid, který je omylem přidán polymerasou na 3'-OH konec nově syntetizovaného řetězce. Tento chybný nukleotid obvykle není komplementární k templátové bázi, a proto nevytváří správné vodíkové vazby, což vede k jeho detekci a následnému odstranění. DNA polymerasa má také specifickou  $5' \rightarrow 3'$  exonukleasovou aktivitu, která je velmi důležitá v opravě DNA. Tato aktivita umožňuje postupné odstraňování nukleotidů z 5' konce a je využívána zejména k odstranění ribonukleotidových primerů během replikace DNA [16].

### 1.3.1. KOD DNA polymerasa

KOD DNA polymerasa má ve srovnání s jinými DNA polymerasami nižší chybovost, což je důležité pro aplikace vyžadující vysokou přesnost replikace. Pochází z hypertermofilního archea *Thermococcus kodakaraensis* a řadí se do archeální skupiny B DNA polymeras [17]. Je stabilní při vysokých teplotách, což umožňuje její využití při amplifikaci DNA s vysokým obsahem nukleotidů G a C, její vyšší rychlost prodlužování řetězce umožňuje efektivnější amplifikaci [18]. Pro specifické aplikace byly vyvinuty další varianty této DNA polymerasy, jednou z nich je KOD(exo-) DNA polymerasa. Absence  $3' \rightarrow 5'$  exonukleasové aktivity zvyšuje její citlivost a efektivitu i při nižších koncentracích enzymu [19]. Optimalizovanou směsí dvou předchozích DNA polymeras je KOD XL DNA polymeras [20], která je tolerantní k modifikovaným nukleotidům při enzymové syntéze.

V experimentech s modifikovanou DNA se také často využívá Vent DNA polymerasa. Ta je izolována z termofilního archea *Thermococcus litoralis* a také patří do archeální B skupiny DNA polymeras [21]. I u této DNA polymerasy existuje varianta bez  $3' \rightarrow 5'$  exonukleasové aktivity, která je vhodnější pro syntézu modifikované DNA pomocí metody PCR [22].

## 1.4. Syntéza DNA

Existují dva způsoby syntézy DNA, chemická a enzymová. Chemická syntéza DNA probíhá postupným připojováním jednotlivých nukleotidů ve směru  $3' \rightarrow 5'$ . Proces začíná ukotvením prvního nukleotidu na pevný nosič, ke kterému se přidávají fosforamiditové monomery. Každý cyklus syntézy zahrnuje čtyři kroky: odstranění chránící skupiny (deprotektce), spojování

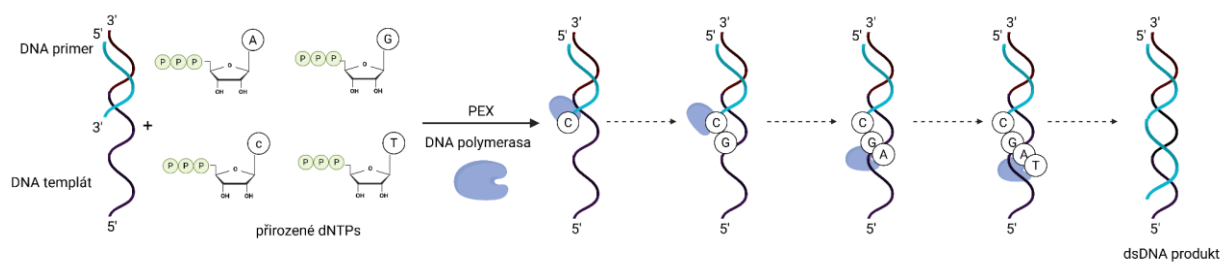
nukleotidů (coupling), zakončení neúspěšných řetězců (capping) a stabilizaci fosfátové vazby oxidací. Po dokončení syntézy se DNA uvolní z nosiče a odstraní se zbývající chránící skupiny, čímž vznikne finální oligonukleotidová sekvence. Chemická syntéza není vhodná pro syntézu dlouhých oligonukleotidů a také často není kompatibilní s modifikacemi [23].

Druhou variantou syntézy je enzymová syntéza, která probíhá ve směru  $5' \rightarrow 3'$  a využívá DNA polymerasu pro inkorporaci přirozených nebo případně modifikovaných 2'-deoxynukleosid trifosfátů do rostoucího řetězce DNA. Existují dva hlavní typy enzymové syntézy: metoda prodlužování primeru (PEX) a polymerasová řetězová reakce (PCR). Výchozím bodem syntézy je primer, krátký úsek DNA, obvykle dlouhý 15–25 nukleotidů. Ten je postupně prodlužován začleňováním dNTPs dle komplementarity k templátu [24] [25].

Mnoho DNA polymeras bylo testováno na použití při enzymové syntéze modifikovaných nukleotidů. Jako nejvhodnější se ukázaly být termostabilní DNA polymerasy bez  $3' \rightarrow 5'$  exonukleasové aktivity, například KOD XL nebo Vent(exo–).

#### 1.4.1. PEX

Základní a nejjednodušší metodou enzymové syntézy je metoda prodlužování primeru (PEX). Při této metodě je využíván templát a k němu komplementární primer. Kvůli vizualizaci při vyhodnocování výsledků musí být primer na 5' konci označen, buď fluorescenčně nebo radioaktivně. DNA polymerasa inkorporuje 2'-deoxyribonukleotid na základě komplementarity (viz obrázek č. 4). Touto metodou je možné připravit i DNA s modifikovanými nukleotidy. Pokud je jeden z přirozených dNTP (dATP, dGTP, dCTP a TTP) nahrazen modifikovaným nukleotidem, každá nukleobáze v nově syntetizovaném řetězci ponese danou modifikaci. Vyhodnocení PEX metody probíhá pomocí gelové elektroforézy, ta prokáže za použití pozitivní kontroly (pouze přirozené dNTP), negativní kontroly (absence konkrétního přirozeného, případně modifikovaného dNTP), že došlo ke správné inkorporaci modifikovaného nukleotidu [26].



Obrázek 4: Metoda PEX, za použití DNA polymerasy dochází k připojování přirozených dNTPs podle komplementarity primeru k templátu. Obrázek vytvořen v programu Biorender.

### 1.4.2. PCR

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla poprvé použita americkým chemikem K. B. Mullisem. Tento objev vedl k výraznému pokroku v mnoha odvětvích [27]. Touto metodou lze vytvořit mnoho kopií z jednoho původního vlákna DNA, to lze využít v diagnostice, monitorování onemocnění i během vědeckého výzkumu [28]. Každý cyklus PCR je složen ze tří kroků – denaturace, navázání primeru (annealing) a elongace. Cyklus těchto tří kroků se opakuje 25–50×. Během jednotlivých cyklů dochází k exponenciálnímu navyšování množství vzorku DNA (obrázek č. 5).

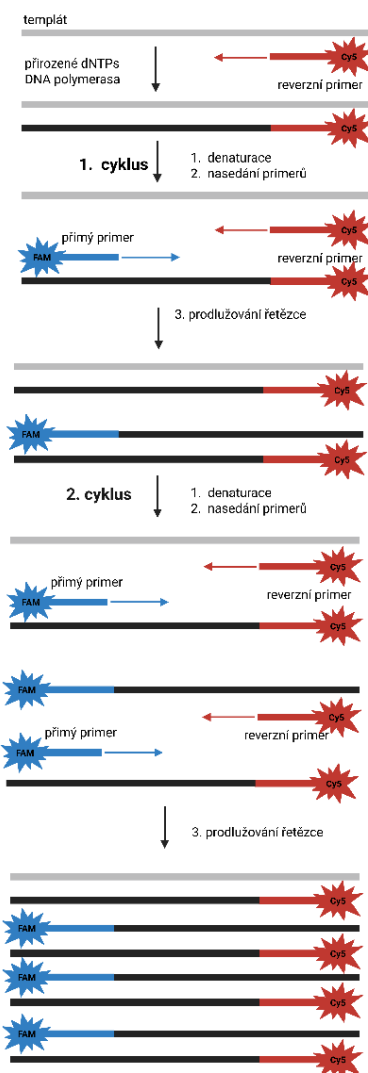
Prvním krokem PCR je denaturace, kdy dojde pomocí vysoké teploty (95 °C) k rozvolnění vodíkových vazeb mezi bázemi komplementárních nukleotidů, a tím k rozvolnění DNA řetězců. V dalším kroku je reakční směs ochlazena na teplotu kolem 60 °C a dochází k nasedání primerů na specifickou sekvenci templátové DNA. Posledním krokem cyklu je elongace, kdy dochází k připojování volných nukleotidů termostabilní DNA polymerasou a syntetizuje se nové vlákno. Tato syntéza probíhá při teplotě kolem 72 °C [29].

PCR metoda probíhá v termocykleru, ten umožňuje střídání teplot v přesně daných časových intervalech. K detekci se využívá elektroforéza v agarovém gelu s obarvením pomocí interkalačního roztoku (např. ethidium bromidu) a následná vizualizace v UV světle [30]. Kvůli opakovaným změnám teplot se pro metodu PCR používají termostabilní DNA polymerasy například Taq polymerasa [31] nebo Vent DNA polymerasa.

Metodou PCR lze také syntetizovat vlákno s modifikovanými nukleotidy. K amplifikaci DNA se jako substráty využívají 2'-deoxyribonukleotidy, které jsou během syntézy inkorporovány do nově vznikajícího řetězce a v následujících cyklech slouží jako templát pro další syntézu. Přítomnost modifikovaných nukleotidů však může komplikovat proces čtení templátu, což klade zvýšené nároky na výběr vhodné DNA polymerasy. Pro amplifikaci modifikované DNA se proto doporučuje volba DNA polymeras s vyšší tolerancí k těmto úpravám, neboť běžně používaná Taq polymerasa je vůči chemickým modifikacím značně senzitivní a její účinnost je tím výrazně omezena. Mezi nejčastěji používané DNA polymerasy při tomto procesu patří KOD XL a Vent(exo–) DNA polymerasy.

Pro zvýšení účinnosti a specifity amplifikace zejména modifikované DNA se mohou do PCR reakční směsi přidávat aditiva. Některé aditiva pomáhají snižovat tvorbu sekundárních struktur v templátové DNA, což zvyšuje dostupnost templátu pro polymerasu a tím zlepšuje amplifikaci cílové DNA. To je zvláště užitečné při amplifikaci oblastí bohatých na GC páry. Příkladem

takových aditiv je betain nebo DMSO. Jiná aditiva mohou omezit nespecifické vazby primerů, čímž snižují amplifikaci nespecifických produktů a zvyšují specifitu PCR. Formamid se váže do velkého a malého žlábků DNA, destabilizuje dvoušroubovici DNA a snižuje teplotu tání DNA, což umožňuje použití nižší teploty pro nasedání primerů. [32]. Přidáním TMAC do PCR reakce dochází ke zvýšení specifity amplifikace a snižuje tvorbu nespecifických produktů [33]. Při použití aditiv do PCR reakcí je nutná jejich optimalizace koncentrace pro konkrétní aplikace.

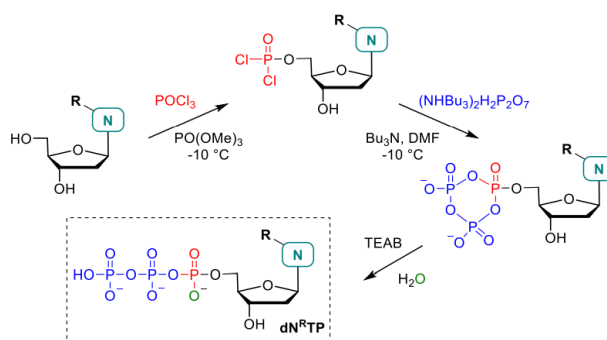


Obrázek 5: Jednotlivé kroky PCR. Primery jsou na 5' konci označeny fluorescenční značkou, přímý primer FAM a reverzní Cy5. Obrázek vytvořen v programu Biorender.

## 1.5. Syntéza modifikovaných nukleosid trifosfátů

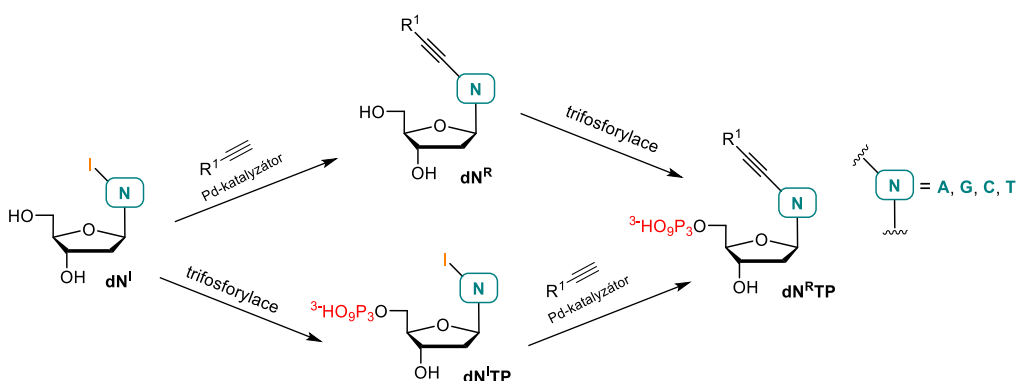
Yoshikawův postup, vyvinutý v roce 1967, je jednou z prvních a nejrozšířenějších metod syntézy nukleosid 5'-trifosfátů (NTP) (obrázek č. 6). Tato metoda umožňuje efektivní připojení trifosfátové skupiny na 5'-hydroxylový konec nukleosidu. Tato reakce zahrnuje tři kroky.

Nukleosid se nejprve převede na svůj 2',3'-O-isopropylidenový derivát, čímž se ochrání hydroxylové skupiny na pozicích 2' a 3' a zvýší se selektivita fosforylace na pozici 5'. Je připravena reakční směs chloridu fosforu ( $\text{POCl}_3$ ) a bezvodého trialkylfosfátu (např. trimethyl- nebo triethylfosfátu), který slouží jako rozpouštědlo a zároveň katalyzuje reakci. Fosfordichloridát se hydrolyzuje vodou, čímž se nahradí chlorové skupiny hydroxylem a vzniká 5'-fosfát. Isopropylidenová chránicí skupina se následně odstraní zahřátím reakční směsi na cca  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , čímž vzniká čistý 5'-nukleotid [34].



Obrázek 6: Fosforylace modifikovaných nukleotidů dle Yoshikawa, obrázek dostupný z [35]. Písmeno *N* značí jednu z nukleobází (*A*, *C*, *T*, *G*), písmeno *R* značí vodík nebo modifikaci.

K modifikaci dNTP se běžně využívají dva přístupy organické syntézy (obrázek č.7). První možností je funkční skupinu nejprve připojit k jodovanému nukleosidu ( $\text{dN}^{\text{I}}$ ) pomocí vhodné cross-coupling reakce (např. Sonogashira) a následně pak probíhá trifosforylační reakce nebo opačným přístupem, kdy se modifikace přímo naváže na jodovaný 2'-deoxyribonukleosid trifosfát ( $\text{dN}^{\text{I}}\text{TP}$ ). Výběr mezi těmito metodami závisí na povaze požadované modifikace a stabilitě trifosfátové skupiny za daných reakčních podmínek [36].



Obrázek 7: Dva přístupy organické syntézy modifikovaných nukleotid trifosfátů. Obrázek vytvořen v programu ChemDraw.

Modifikace jsou nejčastěji vázány do polohy 5 u pyrimidinu a do polohy 7 u 7-deazapurinových bází. 7-deazapurinové báze se od purinu liší chybějícím atomem dusíku v pozici 7. Jsou používány z důvodu vyšší stability. Modifikace v těchto polohách bývají tolerovány DNA polymerasami a nenarušují komplementaritu bází. Jsou směřovány do velkého žlábků a zachovávají B formu DNA [37]. Oproti tomu modifikace v poloze 8 se opakovaným testováním ukázaly jako méně vhodné, dochází ke sterickému bránění, proto jsou tyto polohy využívány pouze pro malé substituenty, například brom nebo methyl [38]. Většina modifikací mírně destabilizuje strukturu a v důsledku toho dochází ke snížení teploty denaturace, přesto byly nalezeny modifikace (hlavně 7-alkynyl-7-deazapuriny), které naopak strukturu DNA stabilizují a teplota denaturace se zvyšuje [37].

Cross-coupling reakce, zejména Suzuki-Miyaura a Sonogashira, představují zásadní metody pro chemickou modifikaci nukleobází. Jedná se o palladiem katalyzované procesy, které umožňují vytváření nových vazeb mezi uhlíkovými atomy – konkrétně mezi halogenovanými nukleosidovými substráty a různými organickými sloučeninami [39].

Suzuki-Miyaura cross-coupling reakce umožňuje spojení halogenovaných nukleosidů s aryl nebo vinylboronovými kyselinami za vzniku modifikovaných nukleosidů [40]. Sonogashira cross-coupling reakce zahrnuje reakci halogenovaných nukleosidů s terminálními alkyny za vzniku alkylnových derivátů [41].

Obě tyto metody byly úspěšně aplikovány na modifikaci nukleotidů, což umožnilo jejich následné začlenění do DNA pomocí enzymových reakcí, jako je PEX nebo PCR.

## 1.6. DNA modifikace na nukleových bázích

Modifikované báze v nukleových kyselinách, ať už v DNA nebo RNA, jsou intenzivně zkoumány pro své široké využití v diagnostice, medicíně, chemii, chemické biologii a materiálovém inženýrství [26].

Důležitým epigenetickým mechanismem, který hraje klíčovou roli v regulaci genové exprese je methylace DNA. U savců tento proces zahrnuje přidání methylové skupiny (-CH<sub>3</sub>) na 5. uhlík cytosinového nukleotidu, čímž vzniká 5-methylcytosin. Tato modifikace může ovlivnit aktivitu genů hned několika způsoby. Může například přitahovat proteiny, které potlačují expresi genů či bránit vazbě transkripčních faktorů na DNA [42].

Deaminací adenosinu vzniká inosin, který je běžně přítomen v transferové RNA, kde umožňuje párování nesplňující podmínky Watson-Crickovského párování bazí s několika kodony, čímž zvyšuje flexibilitu při translaci genetického kódu [43].

Mezi významné látky připravené modifikací nukleotidů patří gemcitabin (2',2' difluordeoxycytidin, dFdC), analog pyrimidinového nukleosidu deoxycytidinu, od které ho se odlišuje dvěma atomy fluoru (místo dvou atomů vodíku) v poloze 2' cukru. Gemcitabin je cytostatikum používané v chemoterapii. Po začlenění do DNA způsobuje zastavení syntézy DNA a následně apoptózu nádorových buněk [44].

Tenofovir disoproxil fumarát (TDF) je acyklický nukleotidový analog adenosinmonofosfátu, který se používá v kombinaci s jinými antiretrovirovými látkami k léčbě infekce HIV-1 [45].

## 1.7. Metody analýzy DNA

Pro zkoumání struktury DNA se využívá několik analytických metod, které poskytují detailní informace o její konformaci a stabilitě. Mezi tyto metody patří například rentgenová krystalografie, cirkulární dichroismus (CD), fluorescenční spektroskopie, hmotnostní spektrometrie (MS), měření teploty denaturace a nukleární magnetická rezonance (NMR).

Hmotnostní spektrometrie (MS) je klíčovou analytickou technikou pro studium struktury a vlastností DNA. Mezi její varianty patří zejména MALDI-TOF a UPLC-MS, které umožňují detailní analýzu nukleových kyselin. Metoda MALDI-TOF využívá laserové záření k ionizaci biomolekul, které jsou krystalizovány v matrici organických kyselin. Ionizované molekuly jsou následně urychleny elektrickým polem a separovány podle poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) v analyzátoru času letu (TOF) [46]. Ultra výkonná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS) je analytická technika, která kombinuje vysokou účinnost separace kapalinové chromatografie s citlivostí a specificitou hmotnostní spektrometrie [47].

Další možností pro studium struktury DNA je technika, která sleduje změny v absorpci UV světla při zvyšování teploty, což umožňuje určit teplotu denaturace ( $T_m$ ) DNA. Touto metodou je možné měřit, jak ovlivňuje teplotu denaturace DNA přítomnost ligandu, který je navázán na nukleobáze [48].

Cirkulární dichroismus (CD) je spektroskopická metoda často využívána k analýze chirálních biomolekul, především proteinů a nukleových kyselin. CD měří rozdílnou absorpci levotočivého a pravotočivého kruhově polarizovaného světla, což poskytuje například informace o sekundární struktuře proteinů [49]. Kromě proteinů se metoda CD používá také

k analýze DNA a RNA, přičemž může poskytnout informace o přítomnosti různých konformačních forem, jako jsou B-DNA, A-DNA nebo Z-DNA [50]. Jednotlivé nukleotidy v DNA tvořící glykosidické vazby s 2'-deoxyribosou jsou chirální, to způsobuje, že pro každou formu DNA je specifické spektrum [51].

## 1.8. Buněčná linie *Escherichia coli* BL21-AI

*E. coli* je jednobuněčný mikroorganismus, který je pro lidské oko neviditelný. Své jméno získala podle německého pediatra Theodora Eschericha, jenž ji poprvé identifikoval v roce 1885. Slovo *coli* odkazuje na její přirozené prostředí, kterým je tlusté střevo. Většina kmenů *E. coli* žije neškodně v trávicím traktu lidí i zvířat, kde se podílí na trávení a ochraně před škodlivými mikroby.

Existuje mnoho různých kmenů *E. coli*, které se od sebe liší specifickými povrchovými markery. Nejznámější kmeny *E. coli* jsou bohužel ty, které způsobují onemocnění. Přestože některé kmeny *E. coli* způsobují onemocnění, většina z nich člověku nijak neškodí, některé jsou dokonce prospěšné. Kromě pozitivní role ve střevní mikroflóře se tato bakterie hojně využívá ve vědeckém výzkumu, kde pomohla objasnit základní biologické procesy [52].

Od kmene *E. coli* B byl geneticky modifikován kmen *Escherichia coli* BL21-AI, který je hojně využíván v laboratoři. Byl navržen pro účinnou expresi rekombinantních proteinů, zejména těch, které mohou být toxické pro hostitelskou buňku [53]. Klíčovou vlastností tohoto kmene je absence proteáz Lon a OmpT, které by mohly degradovat exprimované proteiny. Tato absence zajišťuje stabilitu a integritu produkovaných proteinů. U kmene BL21-AI zprostředkovává expresi genů, a následně proteinů, chromozomálně kódovaná bakteriofágová T7 RNA polymerasa. Ta je regulována promotorem P<sub>BAD</sub> [54], který po přidání L-arabiny do kultivačního média indukuje expresi [55]. Přítomnost isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) indukuje gen pro T7 RNA polymerasu [56]. Naopak 1% roztok glukosy potlačuje expresi T7 RNA polymerasy. Dochází ke snížení hladiny cyklického ATP, což vede k nižší aktivitě araBAD promoteru a tím i k nižší expresi T7 RNA polymerasy a cílových genů.

## 2. Cíle práce

- Syntéza 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů nesoucí benzodioxolovou nebo difluorfenylovou modifikací (dC<sup>DOx</sup>TP a dA<sup>2F</sup>TP)
- Exprese KOD(exo-) DNA polymerasy z buněk *E. coli* BL21-AI
- Studium aktivity vybraných termostabilních DNA polymeras při enzymové syntéze DNA metodou PEX a PCR s využitím modifikovaných dN<sup>R</sup>TPs
- Analýza DNA s modifikovanými nukleobázemi metodami CD, MS a testování vlivu přítomné modifikace na nukleobázi na teplotu denaturace DNA

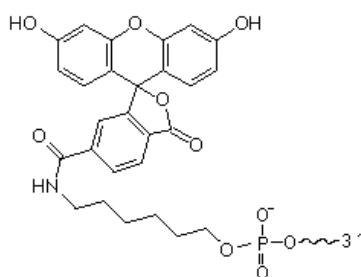
## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

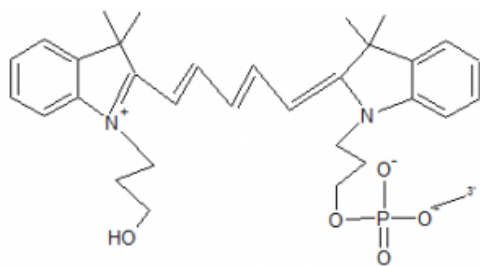
#### 3.1.1. Oligonukleotidy

	Název	Sekvence (5' → 3')	Délka (nt)
Primer	Prim <sup>15nt-FAM</sup> <sup>a)</sup>	CATGGGCGGCATGGG	15
	Prim <sup>FORPveg2</sup>	TAGGGGTTCGCGCACATTTCCCG	25
	Prim <sup>FORPveg2FAM</sup> <sup>a)</sup>	TAGGGGTTCGCGCACATTTCCCG	25
	Prim <sup>REVPveg2</sup>	GGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAG	26
	Prim <sup>REVPveg2Cy5</sup> <sup>b)</sup>	GGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAG	26
Temp	Temp <sup>Oligo1C</sup>	CCCG <u>CCC</u> ATGCCG <u>CCC</u> ATG	19
	Temp <sup>Oligo1A</sup>	CCCT <u>CCC</u> ATGCCG <u>CCC</u> ATG	19
	Temp <sup>31ON</sup>	CTAGCATGAGCTCAGT <u>CCC</u> ATGCCG <u>CC</u> <u>CATG</u>	31
Templát		TAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAA GTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAT TATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGC GTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAAT TCTATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTA CAATAAATGTGTCTAAGCTTGGGTCCCAC CTGACCCCATGCCGAAGTCAAGTGA CGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTC TCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGG CATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAA AGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTT GTCGGTGAACGCTCTCC	339

Pozn.: <sup>a)</sup> fluorescenční značka 6-karboxyfluorescein (6-FAM) navázaná na 5' konci (obrázek č. 8), <sup>b)</sup> fluorescenční značka Cyanine5 (Cy5) navázaná na 5' konci, podtržené úseky označují odpovídající části sekvence primerů a templátu (obrázek č. 9); Temp<sup>Pveg</sup> byl v rámci bakalářské práce izolován z plasmidu, který byl laskavým dárkem doc. Mgr. Libora Krásného Ph.D. (MBÚ AV ČR), ostatní oligonukleotidy byly zakoupeny od firmy Generi Biotech.



Obrázek 8: Struktura 6-karboxyfluoresceinu (6-FAM) dostupná z [57].



Obrázek 9: Struktura Cyanine5 (Cy5) dostupná z [58].

### 3.1.2. Nukleosid trifosfáty

- Přírodní trifosfáty (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), New England Biolabs
- 2'-Deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí modifikaci (dC<sup>OMe</sup>TP, dC<sup>DOx</sup>TP, dA<sup>F</sup>TP, dA<sup>2F</sup>TP), syntetizováno v laboratoři prof. M. Hocka

### 3.1.3. Chemikálie

- Agarosa, Serva
- Arabinosa, Sigma Aldrich
- APS, Sigma Aldrich
- Acetonitril, VWR Chemicals
- Betain, Sigma Aldrich
- Denaturační 25% koncentrát (Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat 25 %, akrylamid a mehylenbisakrylamid v poměru 19:1, 50% močovina), Carl Roth
- DMSO, Eurisotop
- D<sub>2</sub>O, Eurisotop
- DOWEX, Sigma Aldrich
- Glukosa, Serva
- Formamid, Sigma Aldrich
- HCl, Sigma Aldrich
- Glycerol, Thermo Fisher Scientific
- Triton-X-100, Sigma Aldrich
- Kanamycin, Sigma Aldrich
- Imidazol, Sigma Aldrich

- Isobutanol, Sigma Aldrich
- IPTG, Sigma Aldrich
- KOD(exo-) DNA polymerasa, připraveno v laboratoři prof. M. Hocka
- KOD DNA polymerasa, Novagen
- KOD XL DNA polymerasa, Novagen
- SDS, Sigma Aldrich
- Standard na SDS elektroforézu: Color protein standard 10–250 kDa, New England Biolabs
- 100 bp DNA Ladder, Invitrogen
- Vent(exo-) DNA polymerasa, New England Biolabs
- Vent DNA polymerasa, New England Biolabs
- TEMED, Sigma Aldrich
- TEAB, připraven v laboratoři prof. M. Hocka
- TRIS-base, Sigma Aldrich
- TMAC, Sigma Aldrich
- Triton-X-100, Sigma Aldrich
- dA<sup>I</sup>, připraveno v laboratoři prof. M. Hocka dle [59]
- dC<sup>I</sup>, Fluorochem
- 5-ethynylbenzo-1,3-dioxol (DOx), Fluorochem
- 4-ethynyl-1,2-difluorbenzen (2F), Sigma Aldrich
- Pd(OAc)<sub>2</sub>, Fluorochem
- CuI, Fluorochem
- TPPTS, Fluorochem
- Et<sub>3</sub>N, VWR Chemicals
- POCl<sub>3</sub>, Fluorochem
- PO(OMe)<sub>3</sub>, Fluorochem

- $(\text{NH}(\text{Bu}_3))_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , Fluorochem
- NaCl, Lachner
- DMF, Sigma Aldrich
- DMSO, Eurisotop
- Silikagel, Sigma Aldrich

### 3.1.4. Biologický materiál

- Buněčná linie: BL21-AI™ One Shot™ chemicky kompetentní *E. coli*, Thermo Fisher Scientific
- Plasmid – 5080 bp, z *Bacillus subtilis* Pveg konstitutivní promotorový úsek, klonován mezi EcoRI a HindIII, doc. Mgr. Libor Krásný Ph.D. dle [60]

### 3.1.5. Roztoky

- Pufr na horizontální elektroforézu: 0,5× TBE
- Pufr na PAGE: 1× TBE
- Pufr na SDS elektroforézu: 1× TRIS-glycin
- Stop solution (95% formamid; 0,5mM EDTA; 0,025% bromfenolová modř; 0,025% xylencyanolová modř; 0,025% SDS)
- SDS-PAGE loading dye (4% SDS; 20% glycerol; 200mM DTT; 0,01% bromfenolová modř; 0,1M TRIS-HCl, pH 6,8)
- 10% separační gel (30% bisakrylamid; 1M TRIS-HCl, pH = 8,8; 20% SDS; 10% APS; TEMED; H<sub>2</sub>O)
- 5% zaostřovací gel (30% bisakrylamid; 1M TRIS-HCl, pH = 6,8; 20% SDS; TEMED; 10% APS; H<sub>2</sub>O)
- 2 SDS loading dye (4% SDS; 100mM TRIS-HCl; 20mM DTT; 20% glycerol; 10mM EDTA; 0,1% bromfenolová modř)
- 2 × skladovací pufr pro KOD(exo<sup>-</sup>) polymerasu (100mM TRIS-base; 100mM KCl; 2mM DTT; 0,2mM EDTA)
- 10× reakční pufr (1,2M TRIS-base; 100mM KCl; 60mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 15mM MgCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O; 1% Triton-X 100; 0,01% BSA)

- 6× DNA gel loading dye (60mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7,6), 60% glycerol,
- Page Blue™
- LB medium (0,5% kvasinkový extrakt; 1% trypton; 1% NaCl), ÚOCHB AV ČR
- Lyzační pufr (20mM TRIS-base; 500mM NaCl; 10% glycerol; pH = 8.0)
- Eluční pufr (20mM TRIS-base; 500mM NaCl; 10% glycerol; 500mM imidazol)
- Fosfátový pufr (11mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80mM KCl, pH = 7,3)

### 3.1.6. Přístroje a purifikační kolony

- Centrifugy: Eppendorf centrifuge 5810 R; Eppendorf miniSpin; Avanti JXN30
- Inkubátory: Inova40 Orbital Shaker, Innova S44i Shaker
- ÄKTA pure™ 25 chromatography system
- Horizontální elektroforéza, C.B.S. Scientific
- Kolona pro afinitní chromatografii: HisTrap™ High Performance, 1 mL, Cytiva
- Kolona pro UPLC-MS: bioZen Oligo 1,7 μm 2,1×150 mm (Phenomenex)
- Kolona pro HPLC: 5 μM C18 Kinetex
- Cary 100 Bio-Vis spektrofotometr, Varian
- NanoSpectrophotometr N60, Implen
- Skener gelů: Amersham™ Typhoon™ 5, Cytiva
- Termoblok: Eppendorf Thermomixer comfort
- PCR Purification Kit, QIAGEN
- QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAGEN
- SpeedVac, vakuový koncentrátor, Labconco
- SDS elektroforéza, Bio-Rad
- Přístroj na měření MALDI-TOF: UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker) hmotnostní spektrometr s 1 kHz smartbeam II laserovou technologií
- Přístroj na měření UPLC-MS: Agilent 1290 Infinity II
- Přístroj na měření molekulové hmoty : LCQ classic (Thermo-Finnigan) spektrofotometr používající ESI nebo Q-ToF Micro (Waters, ESI source, interní kalibrace lockspray)

- Příklad na měření CD: Jasco-1500
- Vertikální elektroforéza, Jena Bioscience
- Vivaspin 20, 50 000 MWCO, Sartorius
- Vortex: Vornado, Benchmark
- Rotační vakuová odparka, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- Flash chromatografie: Teledyne ISCO CombiFlash, NextGen 300+
- HPLC: Waters modular HPLC system
- NMR: Bruker Avance III 500 MHz spectrometr (500.0 MHz pro  $^1\text{H}$ , 125.7 MHz pro  $^{13}\text{C}$  a 202.4 pro  $^{31}\text{P}$ )
- Lyofilizátor: FreeZone 2,5L; Labconco

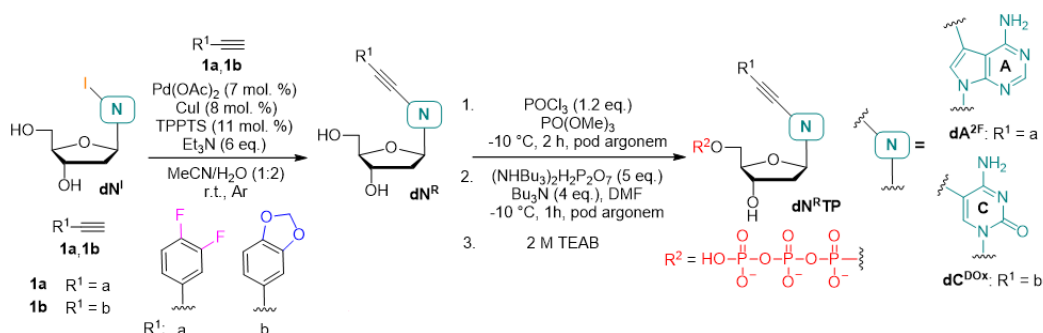
## 3.2. Metody

### 3.2.1. Syntéza 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů dC<sup>DOx</sup>TP a dA<sup>2F</sup>TP

Do reakční zkumavky byl vložen jodovaný nukleosid 5-jodo-2'-deoxycytidin (dC<sup>I</sup>) nebo 7-jodo-7-deaza-2'-deoxyadenosin (dA<sup>I</sup>), příslušný alkyn 5-ethynylbenzo-1,3-dioxol (DOx) nebo 4-ethynyl-1,2-difluorbenzen (2F) (2 eq), CuI (8 mol %), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mol%), TPPTS (11 mol %). Pod argonem byl přidán Et<sub>3</sub>N a rozpouštědlo MeCN/H<sub>2</sub>O v poměru 1:2. Tato směs byla míchána pod argonem přes noc. Směs byla následně odpařena na rotační vakuové odparce a čištěna přes flash chromatografii (DCM/MeOH, 10:1). Čištěním byly získány příslušné nukleosidy dC<sup>DOx</sup> a dA<sup>2F</sup> nesoucí benzodioxolovou (DOx) a difluorfenylovou (2F) modifikaci.

Dalším krokem byla fosforylace dC<sup>DOx</sup> a dA<sup>2F</sup>. Do reakční baňky bylo vloženo dC<sup>DOx</sup> nebo dA<sup>2F</sup>, následně byly pod argonem prikápany 2 mL PO(OMe)<sub>3</sub> a POCl<sub>3</sub> (1,2 eq). Směs byla ochlazena na -10 °C (směs led a NaCl) a ponechána reagovat po dobu 2 hodin. Pod argonem byla připravena směs (NHBU<sub>3</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (5 eq), Bu<sub>3</sub>N (4 eq) a 2 mL DMF, která byla také ochlazena na -10 °C. Tato směs byla poté po kapkách přidávána do reakční směsi a byla ponechána reagovat po dobu 1 hodiny. Po hodině byly do směsi přidány 3 mL 2M TEAB.

Reakční směs byla několikrát odpařena na rotační vakuové odparce do vymizení zápachu Et<sub>3</sub>N a dále čištěna na HPLC za použití kolony Kinetex C18 s gradientem A = 0,1M TEAB ve vodě a B = 0,1M TEAB v 50 % methanolu, v poměru A/B = 95/5 → B = 100 %). Frakce obsahující produkt dA<sup>2F</sup>TP nebo dC<sup>DOx</sup>TP byly převedeny na sodnou sůl za pomoci iontoměniče DOWEX. A po lyofilizaci byly získány výsledné nukleosid trifosfáty dC<sup>DOx</sup>TP a dA<sup>2F</sup>TP.



Obrázek 10: Syntéza 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů. Obrázek vytvořen v programu ChemDraw.

Výsledné produkty byly analyzovány pomocí NMR na přístroji Bruker Avance III 500 MHz spektrometru (500.0 MHz pro <sup>1</sup>H, 125.7 MHz pro <sup>13</sup>C a 202.4 pro <sup>31</sup>P), vzorky byly měřeny v D<sub>2</sub>O. Analýza molekulové hmotnosti pomocí hmotnostní spektrometrie byla provedena servisní skupinou hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR na přístroji LCQ classic

(Thermo-Finnigan) spektrofotometr používající ESI nebo Q-Tof Micro (Waters, ESI source, interní kalibrace lockspray)

### 3.2.2. Exprese KOD (exo<sup>-</sup>) DNA polymerasy

#### 3.2.2.1. Kultivace buněk *Escherichia coli* BL21-AI

Na expresi proteinu byly použity buňky *Escherichia coli* BL21-AI transformované plasmidem genu KOD polymerasy vloženým do vektoru pET28a. Do 200 ml již připraveného LB media bylo pipetováno 200  $\mu\text{L}$  kanamycinu o koncentraci 30  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 2 mL 40% roztoku glukosy. Glukosa byla do LB média přidána kvůli zastavení případné nežádoucí exprese. Kanamycin přidán proto, že gen pro KOD(exo<sup>-</sup>) bývá klonován do plasmidu, který obsahuje také gen rezistence vůči kanamycinu. Do takto připraveného LB media bylo přidáno malé množství kompetentních buněk *E. coli*. Buňky byly ponechány inkubovat (Inova40 Orbital shaker) po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C do viditelného zakalení narostlými buňkami. Tato předkultura byla stočena na centrifuze (Eppendorf centrifuge 5810 R) při 3900 RPM a 4 °C po dobu 20 minut. Kultivace buněk následně probíhala v novém LB mediu. Do 2 L nového LB media byly přidány 2 mL kanamycinu o koncentraci 30  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Sterilní pipetou bylo několik mililitrů media odebráno jako referenční standard pro měření OD<sub>600</sub>. Vzniklé pelety byly resuspendovány v novém LB mediu. Buňky byly následně inkubovány v shakeru (Innova S44i) při teplotě 37 °C, dokud hodnota OD<sub>600</sub> nedosáhla hodnoty 0,5. Opět bylo odebráno několik mililitrů pro následnou SDS elektroforézu.

#### 3.2.2.2. Spuštění exprese proteinu

Po dosažení OD<sub>600</sub> = 0,5 bylo do media přidáno 20 mL 40% arabinosy a 2 mL 1M IPTG (připraven rozpuštěním 2,383 g IPTG v 10 mL Mili-Q H<sub>2</sub>O). Poté pokračovala inkubace (Innova S44i shaker) při 24 °C po dobu 16 hodin. Buňky byly stočeny na centrifuze (Avanti JXN30) při 8 000× g a 4 °C po dobu 20 minut. Po expresi proteinu byl opět odebrán vzorek pro SDS elektroforézu.

#### 3.2.2.3. Lýza buněk

Peleta, která vznikla po centrifugaci byla resuspendována ve 40 mL lyzačního pufru. Po resuspendaci následovala lýza buněk a denaturace hostitelských proteinů při 80 °C po dobu 1 hodiny (Inova40 Orbital shaker) poté zchlazení buněk na ledu po dobu 20 minut a následné stočení na centrifuze (Avanti JXN30) při 38 000× g po dobu 40 minut. Protein KOD(exo<sup>-</sup>) je termostabilní, to znamená, že se nevysráží, ale zůstává součástí supernatantu, ten byl poté použit na separaci.

#### 3.2.2.4. Separace KOD (exo<sup>-</sup>) DNA polymerasy pomocí afinitní chromatografie

Separace proteinu probíhala na přístroji ÄKTA pure<sup>TM</sup> s použitím kolony HisTrap HP 1 mL a průtokovou rychlostí 1 mL/min. Vzorek byl nanesen na kolonu pomocí lyzačního pufru. Protein byl zachycen na koloně a následně eluován elučním pufrem obsahující imidazol. Imidazol, díky své vyšší afinitě k HisTrap koloně, umožnil uvolnění proteinu a jeho separaci. Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla ověřena pomocí SDS elektroforézy.

#### 3.2.2.5. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

Byl namíchán 10% separační gel, který byl při polymerizaci převrstven 200 µL isobutanolu pro zachování rovného povrchu a pro zajištění polymerizace bez přístupu vzduchu. Po skončení polymerizace (cca po hodině) byl isobutanol odsát filtračním papírem a nad separační gel byl pipetován 5% zaostřovací gel. Vzorky byly před nanesením na gel smíchány v poměru 1:1 s 2× SDS-PAGE loading dye. Poté byly denaturovány zahřátím na 95 °C po dobu 10 minut a následně rychle ochlazeny. Elektroforéza byla provedena v 1× SDS pufru. Protein je díky dodecylsírany sodnému denaturován a má uniformní náboj. Do jamek bylo pipetováno 10 µL vzorků a 5 µL standardu (color protein standard 10–250 kDa). Zaostřování probíhalo po dobu 30 minut při napětí 100 V. Poté bylo napětí zvýšeno na 150 V a separace probíhala dalších 45 minut. Po ukončení byly gely promyty vodou a obarveny PageBlue barvicím roztokem po dobu 60 minut, následně byly opět promyty vodou. Gely byly skenovány na fluorescenčním skeneru Amersham<sup>TM</sup> Typhoon<sup>TM</sup> 5, dle standardu bylo určeno, které frakce obsahovaly exprimovaný protein.

#### 3.2.2.6. Purifikace a měření koncentrace KOD(exo<sup>-</sup>) DNA polymerasy

Pro finální purifikaci a odsolení proteinu byla použita kolona Vivaspin 20, 50 000 MWCO dle následujícího protokolu. Frakce, které obsahovaly protein byly spojeny a pipetovány do kolony následně byly stočeny na centrifuze (Eppendorf centrifuge 5810 R) při 3 900 RPM 32 a 20 °C po dobu 20 minut. Po prvním stočení byl do kolony s proteinem pipetován 2× skladovací pufr pro KOD(exo<sup>-</sup>) polymerasu. Nejprve byly přidány 3 mL tohoto 2x skladovacího pufru a následně postupně ještě třikrát 2 mL. Po každém přidání byl obsah kolony stočen na centrifuze (Eppendorf centrifuge 5810 R) při 3 900 RPM a 20 °C po dobu 20 minut.

Finální koncentrace proteinu byla měřena na přístroji NanoSpectrofotometr N60. Protein byl uchován v roztoku 2× skladovací pufr; 50% glycerol; 1% Triton-X-100), tato směs snižuje povrchové napětí a předchází kompletnímu zamrznutí proteinu, což by vedlo k jeho destrukci.

### 3.2.3. Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou prodlužování primeru

Byla testována aktivita vybraných enzymů při syntéze DNA pomocí metody PEX. Nejprve byly optimalizovány podmínky pouze pro přirozenou DNA. Tyto podmínky byly pak následně využity pro syntézu DNA s modifikovanými dNTPs. Do reakční směsi byl pipetován 10× koncentrovaný reakční pufr, templát, fluorescenčně značený primer, přirozené nukleotidy, případně modifikované nukleotidy, enzym DNA polymerasa, roztok byl poté doplněn Mili-Q vodou na požadovaný objem.

### 3.2.4. Separace DNA produktů polyakrylamidovou denaturační elektroforézou

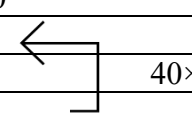
Byl namíchán 12,5% denaturační gel smícháním: 20 mL denaturačního koncentrátu, 20 mL 2× koncentrovaného TBE pufru, 16  $\mu$ L TEMED a 320  $\mu$ L 10% APS. Po polymeraci byl gel zahříván při výkonu 65 W po dobu 50 minut. Vzorke byly připraveny smícháním se stop solution v poměru 1:1 a byly zdenaturovány při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Následně byly vzorky a primer pipetovány do jamek na gel. Separace probíhala při výkonu 42 mA po dobu 35 minut. Po ukončení separace byl gel skenován na fluorescenčním skeneru Amersham™ Typhoon™ 5 a následně vyhodnocen.

### 3.2.5. Syntéza templátu Pveg z plasmidu metodou polymerasové řetězové reakce

Do 200  $\mu$ L reakčních zkumavek bylo pipetováno: 10× koncentrovaný reakční pufr, templát, přímý a zpětný primer, DNA polymerasa, dNTP, směs byla doplněna Mili-Q vodou na požadovaný objem. Reakce byla provedena v duplikátu a probíhala dle metody (tabulka č. 1) v termocykleru typu Biometra TRIO 48.

Tabulka 1: Průběh PCR, teplota a čas při kterých probíhaly jednotlivé kroky.

Krok		Teplota [°C]	Čas [s]
1	Přehřátí komory	80	$\infty$
2	Denaturace	94	180
3	Denaturace	94	60
4	Nasedání primerů	62	60
5	Prodlužování řetězců	72	60
6	Prodlužování řetězců	72	300
7	Ochlazení	4	po ochlazení vyjmutí vzorků z termocykleru



### 3.2.6. Inkorporace modifikovaných dNTPs metodou polymerasové řetězové reakce

Do 200  $\mu\text{L}$  reakčních zkumavek bylo pipetováno: 10 $\times$  koncentrovaný reakční pufr, templát, přímý a zpětný primer s odlišnou fluorescenční značkou, DNA polymerasa, dNTP, případně poté **dC<sup>OMe</sup>TP**, **dC<sup>DOx</sup>TP**, **dA<sup>F</sup>TP**, **dA<sup>2F</sup>TP**, směs byla doplněna Mili-Q vodou na požadovaný objem. Reakce poté probíhala dle metody (tabulka č. 2) v termocykleru typu Biometra TRIO 48.

Tabulka 2: Průběh PCR, teplota a čas při kterých probíhaly jednotlivé kroky.

Krok		Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [s]
1	Přehřátí komory	80	$\infty$
2	Denaturace	94	180
3	Denaturace	94	60
4	Nasedání primerů	68	60
5	Prodlužování řetězců	72	120
6	Prodlužování řetězců	72	300
7	Ochlazení	4	po ochlazení vyjmutí vzorků z termocykleru

### 3.2.7. Separace DNA produktů horizontální elektroforézou v agarosovém gelu

Pro kontrolu správnosti amplifikace byl připraven 1,3% agarosový gel. Gel byl připraven rozpuštěním 0,65 g agarosy v 50 mL 0,5 $\times$  TBE pufru a 5  $\mu\text{L}$  6X Loading dye (60mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7,6), 60% glycerol, 0,003% bromphenol blue, 0,03% xylene cyanol FF). Jako standard byl použit 100 bp DNA Ladder, který obsahuje směs dsDNA o různých délkách (hmotnosti). Vzorky na gel byly připraveny smícháním s 6 $\times$  Loading dye. Na gel bylo pipetováno 8  $\mu\text{L}$  standardu a 5  $\mu\text{L}$  vzorků. Separace probíhala při napětí 110 V po dobu 105 minut. Gel byl následně skenován na skeneru Amersham<sup>TM</sup> Typhoon<sup>TM</sup> 5 a vyhodnocen.

### 3.2.8. Analýza DNA

Pro účely analýzy metodou cirkulárního dichroismu byly vybrané produkty DNA připraveny metodou PEX v semi-preparativním měřítku. Do reakční směsi byl pipetován 10 $\times$  koncentrovaný reakční pufr, templát, fluorescenčně značený primer, přirozené nukleotidy, případně modifikované nukleotidy, DNA polymerasa, roztok byl poté doplněn Mili-Q vodou na požadovaný objem. Po inkubaci byly vzorky čištěny pomocí QIAquick Nucleotide Removal Kit. Následně byly použity k měření molekulové hmotnosti, měření metodou cirkulárního dichroismu (CD) a pro měření teploty denaturace DNA.

### 3.2.8.1. Měření molekulové hmotnosti metodou MALDI-TOF a metodou UPLC-MS

Měření molekulové hmotnosti oligonukleotidů pomocí metody MALDI-TOF bylo provedeno servisní skupinou hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR. Měření probíhalo na přístroji UltrafleXtreme hmotnostním spektrometru s 1kHz smartbeam II laserovou technologií. Matrice se skládala z 3-hydroxypikolinové kyseliny, pikolinové kyseliny a vinanu amonného v poměru 9: 1: 1.

Analýza metodou UPLC-MS byla provedena RNDr. Markem Ondrušem, Ph.D. Byl použit přístroj Agilent 1290 Infinity II za použití kolony bioZen Oligo 1, 7  $\mu\text{m}$  2, 1 $\times$ 150 mm (Phenomenex) při teplotě 60 °C a mobilních fází A = 12 mM Et<sub>3</sub>N, 300 mM HFIP v H<sub>2</sub>O a B = 12 mM Et<sub>3</sub>N, 300 mM HFIP v methanolu s 30minutovým gradientem. 5 % B  $\rightarrow$  100 % B v A. Dekonvoluce LC-ESI-MS spekter probíhala pomocí programu UniDec.

### 3.2.8.2. Určování teploty denaturace připravených oligonukleotidů

Měření absorbance i teploty denaturace vzorků DNA probíhalo na UV-Vis spektrofotometru Cary Bio 100 v rozmezí teplot 25 °C až 95 °C s teplotním krokem 1 °C/min a detekcí při vlnové délce 260 nm v křemenné kyvetě o délce 1 cm.

### 3.2.8.3. Určování formy DNA metodou cirkulárního dichroismu

Cirkulární dichroismus připravené DNA byl měřen RNDr. Lucií Bednárovou, CSc., ze skupiny analytické laboratoře ÚOCHB AV ČR. Spektra cirkulárního dichroismu byla měřena na Jasco 1500 (Tokyo Japonsko) ve spektrálním intervalu 200-350 nm v 1 mm křemenné kyvetě s rychlostí posuvu monochromátoru 10 nm/min, časovou konstantou 8 sekund, a s krokem 0,1 nm s třemi akumulacemi. Po korekci na nulovou linii byla spektra prezentovaná v jednotkách diferenciální molární extinkce ( $\Delta\epsilon$ ) pro koncentrace v přepočtu na pár bází. Numerické zpracování dat bylo provedeno pomocí software CD spektrometru – Sigmaplots.

## 4. Výsledky

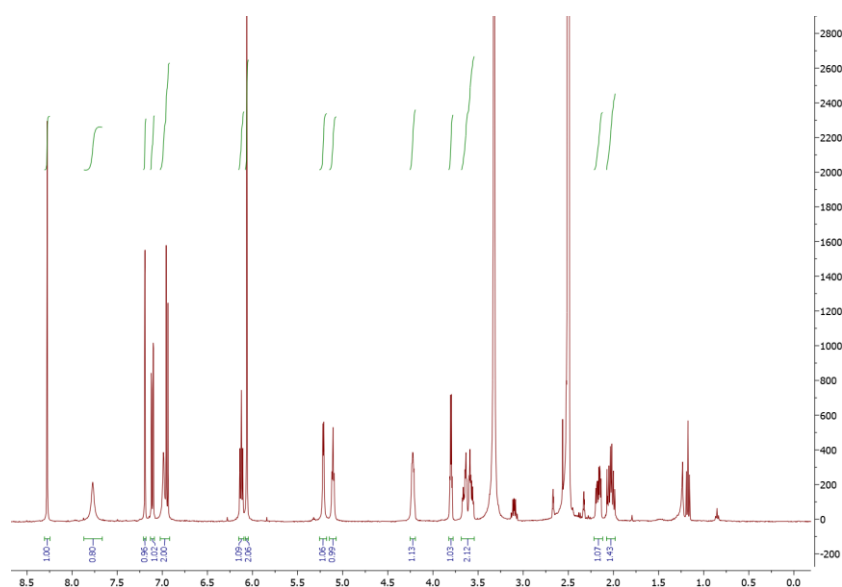
### 4.1. Syntéza modifikovaných trifosfátů

Prvním cílem mé bakalářské práce bylo připravit modifikované 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty  $dC^{DOx}TP$ ,  $dA^{2F}TP$ . Tato syntéza probíhala pomocí Sonogashira cross-coupling reakce jodovaných nukleosidů ( $dC^I$ ,  $dA^I$ ) s příslušnými alkylovými deriváty (DOx, 2F), které byly následně fosforylovány za vzniku nukleosid trifosfátů  $dC^{DOx}TP$  a  $dA^{2F}TP$ . Charakterizace obou produktů byla po přečištění na HPLC, provedena pomocí NMR a MS analýzy s vysokým rozlišením (HRMS).

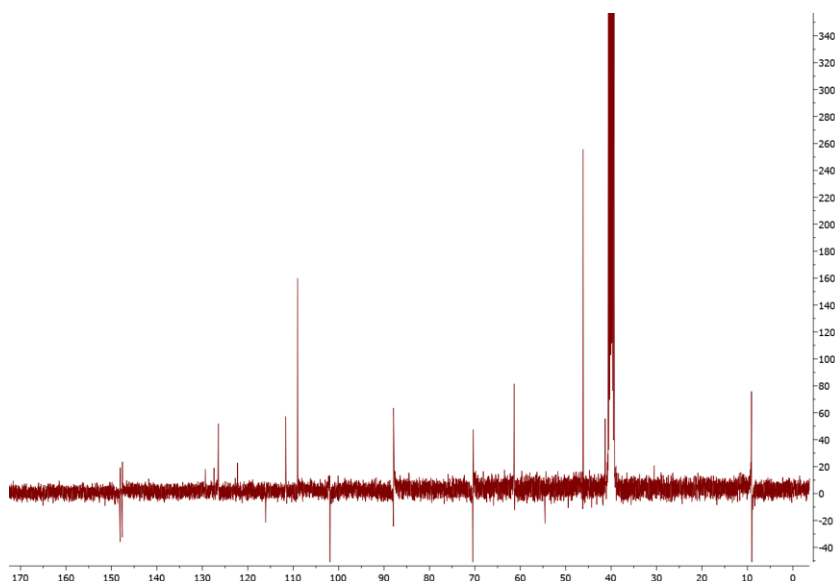
#### 4.1.1.1. Charakterizace syntetizovaných nukleosidů a nukleosid trifosfátů

U modifikovaných nukleosidů  $dC^{DOx}$  a  $dA^{2F}$  byla měřena  $^1H$  a  $^{13}C$  NMR spektra (obrázky č. 11, č. 12, č. 15, č. 16). Nukleosid trifosfáty ( $dC^{DOx}TP$  a  $dA^{2F}TP$ ) byly charakterizovány z naměřených  $^1H$ ,  $^{13}C$  a  $^{31}P\{^1H\}$  NMR spekter (obrázky č. 13, č. 14, č. 17, č. 18) a molekulové hmotnosti všech produktů ( $dC^{DOx}$ ,  $dA^{2F}$ ,  $dC^{DOx}TP$ ,  $dA^{2F}TP$ ) byly ověřeny pomocí HRMS.

#### $dC^{DOx}$



Obrázek 11:  $^1H$  NMR spektrum nukleosidu  $dC^{DOx}$



Obrázek 12:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum nukleosidu  $d\text{C}^{\text{DOx}}$

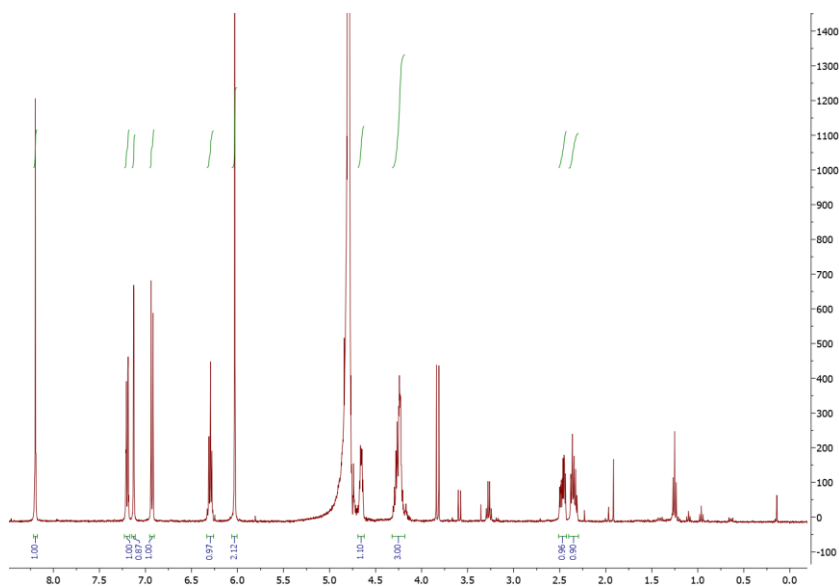
$^1\text{H}$ -NMR (400.1 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 1.97-2.08 (ddd, 1H, H-2'a); 2.13-2.20 (ddd, 1H, H-2'b); 3.58, 3.64 (2 x ddd, 2H-5'); 3.80 (q, 1H, H-4'); 4.22 (dddd, 1H, H-3'); 5.10 (t, 1H, OH-5'); 5.21 (d, 1H, OH-3'); 6.06 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O); 6.12 (t, 1H, H-1'); 6.95 (d, 1H, H-m-Ph); 6.98, 7.76 (2 x brs, 2 x 1H, NH<sub>2</sub>); 7.11 (dd, 1H, H-o-Ph); 7.19 (d, 1H, H-o-Ph); 8.27 (s, 1H, H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR: (125.7 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 41.3 (CH<sub>2</sub>-2'); 61.4 (CH<sub>2</sub>-5'); 70.4 (CH-3'); 85.8 (CH-1'); 87.8 (CH-4'); 94.2 (C5-C≡C-Ph); 101.9 (C-5); 109.0 (CH-m-Ph); 111.5 (CH-o-Ph); 116.1 (C5-C≡C-C); 126.4 (CH-o-Ph); 144.9 (CH-6); 147.6 (C-m-Ph); 148.1 (C-p-Ph); 153.8 (C-2); 164.2 (C-4).

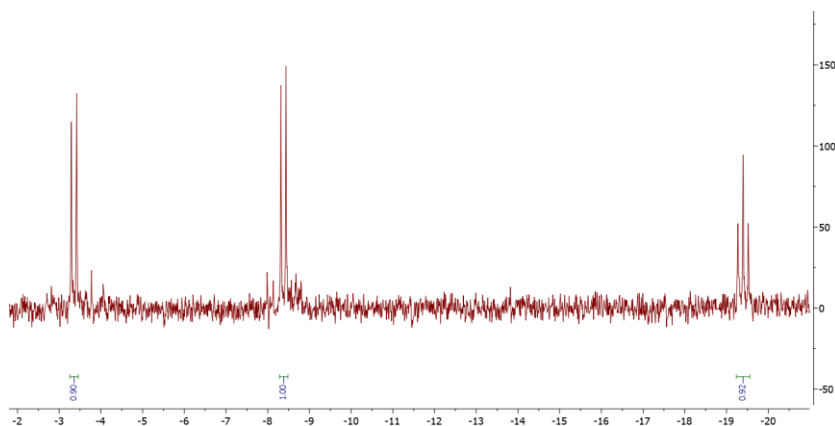
MS (ESI):  $m/z$ : 372.1 [M+H]; 394.1 [M+Na].

HRMS (ESI):  $m/z$ : [M+H] teoreticky vypočítáno pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_3$ : 372.11901, nalezeno: 372.11917; [M+Na] vypočítáno pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}_3\text{Na}$ : 394.10096, nalezeno: 394.10101.

## dC<sup>DOx</sup>TP



Obrázek 13: <sup>1</sup>H NMR spektrum nukleotidu dC<sup>DOx</sup>TP



Obrázek 14: <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR spektrum nukleotidu dC<sup>DOx</sup>TP

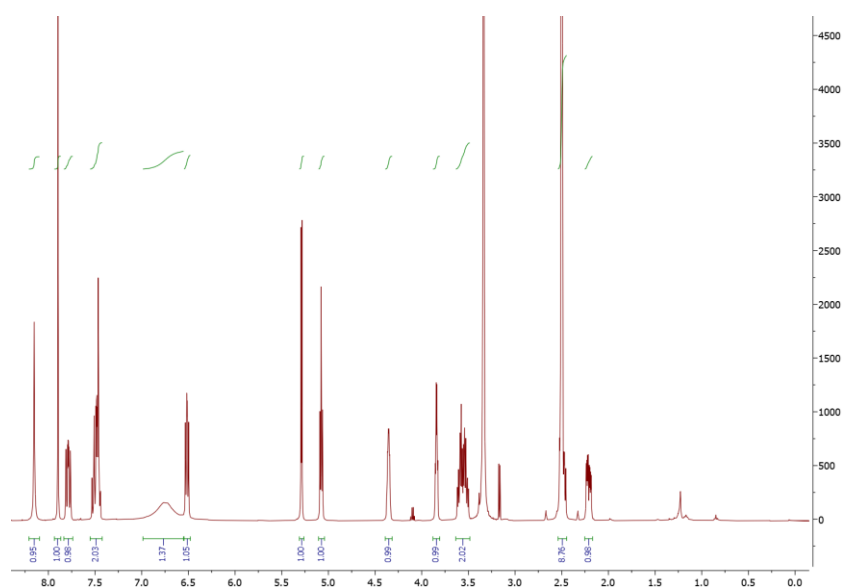
<sup>1</sup>H-NMR (400.1 MHz, D<sub>2</sub>O): 2.30-2.39 (ddd, 1H, H-2'a); 2.43-2.50 (ddd, 1H, H-2'b); 4.19-4.31 (m, 3H, H-4', 2H-5'); 4.65 (dddd, 1H, H-3'); 6.03 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O); 6.29 (t, 1H, H-1'); 6.93 (d, 1H, H-m-Ph); 7.13 (d, 1H, H-o-Ph); 7.20 (dd, 1H, H-o-Ph); 8.19 (s, 1H, H-6).

<sup>13</sup>C NMR: (125.7 MHz, D<sub>2</sub>O): 39.1 (CH<sub>2</sub>-2'); 64.9 (CH<sub>2</sub>-5'); 70.0 (CH-3'); 85.3 (CH-4'); 86.0 (CH-1'); 92.5 (C5-C≡C-Ph); 108.6 (CH-m-Ph); 111.3 (CH-o-Ph); 115.0 (C5-C≡C-C); 126.5 (CH-o-Ph); 144.0 (CH-6); 147.6 (C-m-Ph, C-p-Ph); 156.0 (C-2); 164.8 (C-4).

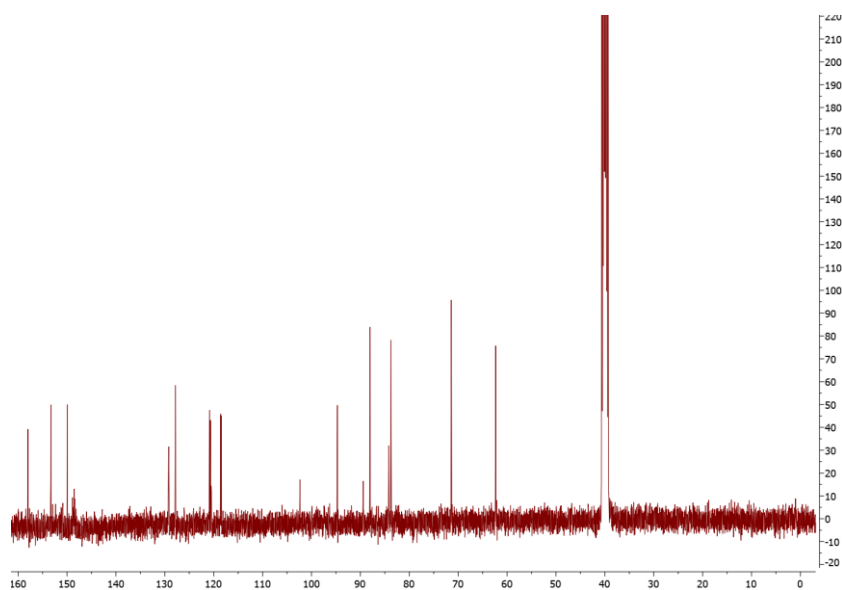
<sup>31</sup>P NMR (202.4 MHz, D<sub>2</sub>O): -19.4 (t, P<sub>β</sub>); -8.4 (d, P<sub>α</sub>); -3.4 (d, P<sub>γ</sub>).

HRMS (ESI): m/z: [M]<sup>-</sup> teoreticky vypočítáno pro C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>15</sub>N<sub>3</sub>Na<sub>3</sub>P<sub>3</sub>: 675.94928, nalezeno: 675.94947; [M-Na+H]<sup>-</sup> teoreticky vypočítáno pro C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>15</sub>N<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>P<sub>3</sub>: 653.96734, nalezeno: 653.96767.

## $dA^{2F}$



Obrázek 15:  $^1H$  NMR spektrum nukleosidu  $dA^{2F}$



Obrázek 16:  $^{13}C$  NMR spektrum nukleosidu  $dA^{2F}$

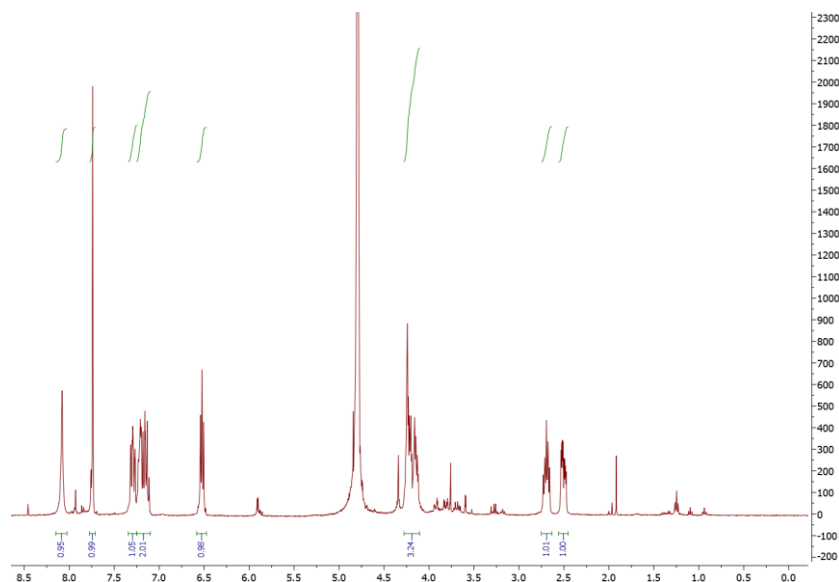
$^1H$ -NMR (400.1 MHz,  $DMSO-d_6$ ): 2.18-2.24 (ddd, 1H, H-2'a); 2.45-2.52 (m, 1H, H-2'b); 3.53, 3.58 (2 x ddd, 2H-5'); 3.84 (q, 1H, H-4'); 4.35 (dddd, 1H, H-3'); 5.07 (t, 1H, OH-5'); 5.29 (d, 1H, OH-3'); 6.51 (t, 1H, H-1'); 6.74 (brs, 2H,  $NH_2$ ); 7.43-7.54 (m, 2H, H-o-Ph, H-m-Ph); 7.78 (m, 1H, H-o-Ph); 7.90 (s, 1H, H-8); 8.15 (s, 1H, H-2).

$^{13}C$  NMR: (125.7 MHz,  $DMSO-d_6$ ): 40.3 ( $CH_2-2'$ ); 62.3 ( $CH_2-5'$ ); 71.3 ( $CH-3'$ ); 83.6 ( $CH-1'$ ); 87.9 ( $CH-4'$ ); 84.1 (C-7); 89.4 (C7-C $\equiv$ C-Ph); 94.6 (C7-C $\equiv$ C-Ph); 102.2 (C-5); 118.5 ( $CH-m-Ph$ ); 120.7 ( $CH-o-Ph$ ); 127.7 ( $CH-8$ ); 129.2 ( $CH-o-Ph$ ); 148.4 151.1 (C-F, C-F); 149.9 (C-4); 153.3 ( $CH-3$ ); 157.9 (C-6- $NH_2$ ).

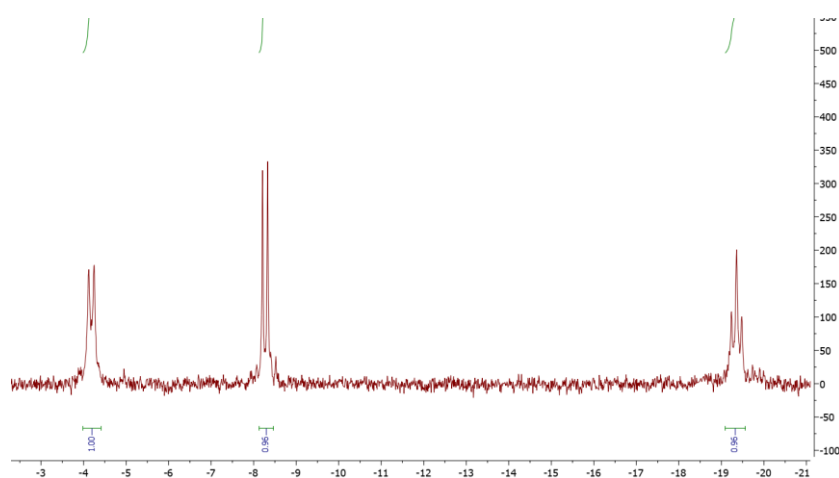
MS (ESI): m/z: 387.1 [ $M+H$ ]; 409.1 [ $M+Na$ ].

HRMS (ESI):  $m/z$ :  $[M+H]$  teoreticky vypočítáno pro  $C_{19}H_{17}O_3N_4F_2$ : 387.12632, nalezeno: 387.12654;  $[M+Na]$  teoreticky vypočítáno pro  $C_{19}H_{16}O_3N_4F_2Na$ : 409.10827, nalezeno: 409.10843.

## **dA<sup>2F</sup>TP**



Obrázek 17:  $^1H$  NMR spektrum nukleotidu dA<sup>2F</sup>TP



Obrázek 18:  $^{31}P\{^1H\}$  NMR spektrum nukleotidu dA<sup>2F</sup>TP

$^1H$ -NMR (400.1 MHz, D<sub>2</sub>O): 2.46-2.54 (ddd, 1H, H-2'a); 2.65-2.74 (m, 1H, H-2'b); 4.10-4.28 (m, 3H, H-4', 2H-5'); 4.73-4.85 (m, 1H, H-3'); 6.52 (t, 1H, H-1'); 7.10-7.30 (m, 3H, H-Ph); 7.74 (s, 1H, H-8); 8.08 (s, 1H, H-2).ff

$^{13}C$  NMR: (125.7 MHz, D<sub>2</sub>O): 38.6 (CH<sub>2</sub>-2'); 65.5 (CH<sub>2</sub>-5'); 70.8 (CH-3'); 82.8 (CH-1'); 85.1 (CH-4'); 81.9 (C-7); 90.1 (C7-C≡C-Ph); 96.2 (C7-C≡C-Ph); 102.7 (C-5); 117.3 (CH-m-Ph); 119.7 (CH-o-Ph); 126.2 (CH-8); 128.0 (CH-o-Ph); 148.5 (C-4); 151.9 (CH-3); 157.1 (C-6-NH<sub>2</sub>).

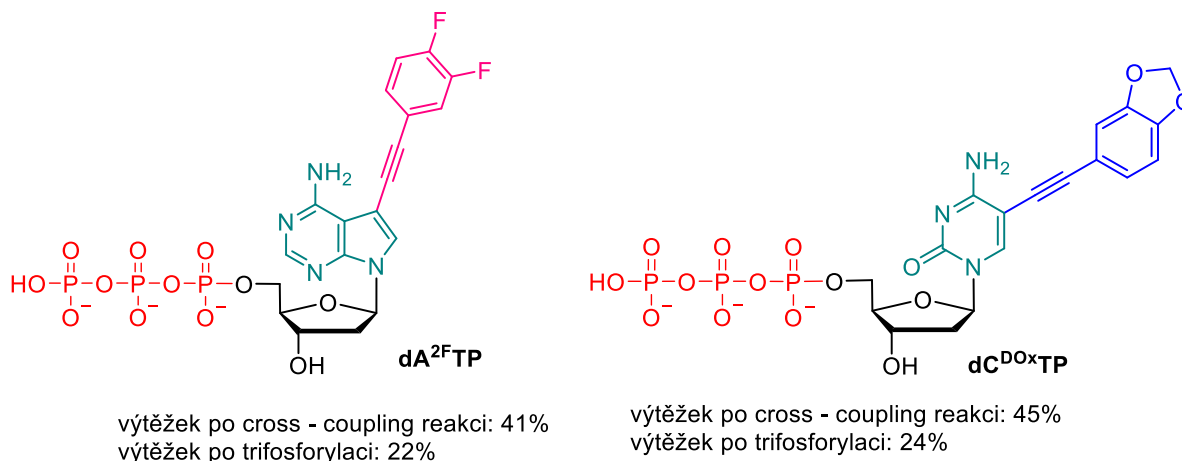
$^{31}P$  NMR (202.4 MHz, D<sub>2</sub>O): -19.4 (t, P<sub>β</sub>); -8.3 (d, P<sub>α</sub>); -4.2 (d, P<sub>γ</sub>).

MS (ESI): m/z: 691.0 [M]<sup>-</sup>; 669.0 [M-Na+H]<sup>-</sup>.

HRMS (ESI): m/z: [M]<sup>-</sup> teoreticky vypočítáno pro C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>O<sub>12</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>P<sub>3</sub>: 690.95660, nalezeno: 690.95688; [M-Na+H]<sup>-</sup> teoreticky vypočítáno pro C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>12</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>P<sub>3</sub>: 668.97465, nalezeno: 668.97497.

#### 4.1.1.2. Výtěžek syntézy modifikovaných nukleosid trifosfátů

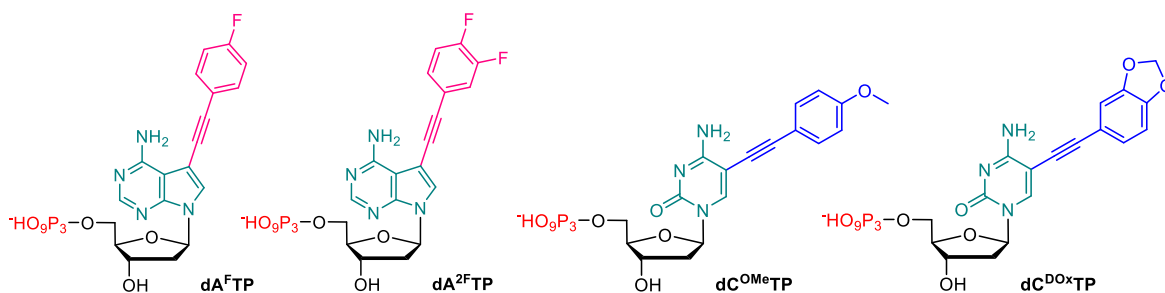
Pro oba syntetizované modifikované trifosfáty byl vypočítán výtěžek.



Obrázek 19: Struktury modifikovaných 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů dC<sup>DOx</sup>TP a dA<sup>2F</sup>TP. Struktury vytvořeny v programu ChemDraw.

Výtěžek po cross-coupling reakci u obou produktů se pohyboval kolem 40 %. A výtěžek po trifosforylační reakci činí u obou produktů kolem 20 %.

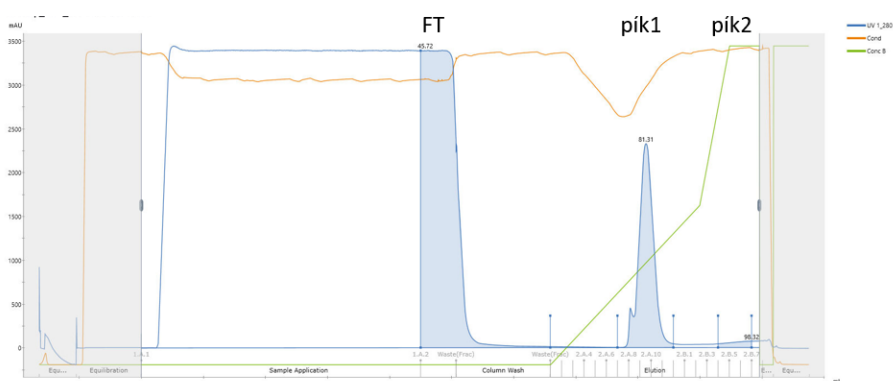
Ke dvojici mnou připravených modifikovaných nukleosid trifosfátů, dA<sup>2F</sup>TP (s difluorfenylovou skupinou vykazující elektron-akceptorní vlastnosti) a dC<sup>DOx</sup>TP (s benzodioxolovou skupinou s elektron-donorním charakterem), byly pro účely rozšíření studie enzymové syntézy doplněny další dvě analogické modifikace: dA<sup>F</sup>TP (s monofluorfenylovou skupinou jako slabším elektron-akceptorem) a dC<sup>OMe</sup>TP (s methoxyfenylovou skupinou vykazující elektron-donorní efekt) (obrázek č. 20).



Obrázek 20: Struktury nukleosid trifosfátů nesoucí elektron-donorní nebo elektron-akceptorní modifikaci. Struktury vytvořeny v programu ChemDraw.

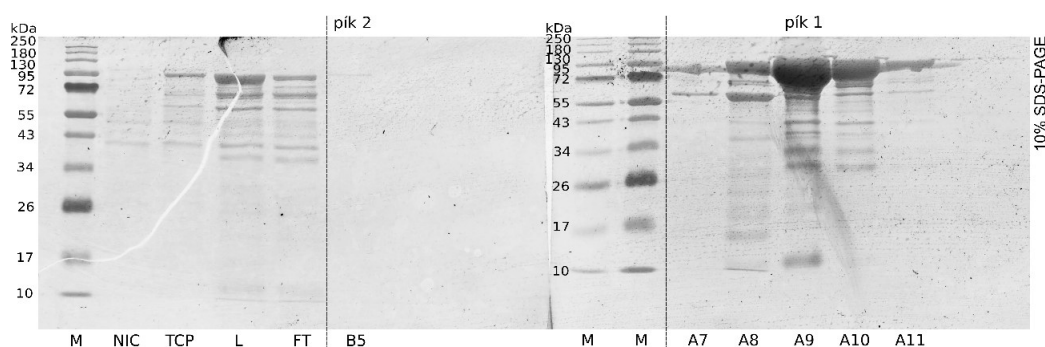
## 4.2. Exprese KOD(exo-) DNA polymerasy

Druhým cílem bakalářské práce bylo exprimovat enzym KOD(exo-) DNA polymerasa z kompetentních buněk *E. coli* BL21-AI. Po expresi byl protein čištěn pomocí afinitní chromatografie (obrázek č.21) Jako první byly detekovány látky, které nevykazovaly afinitu ke stacionární fázi kolony a byly tedy eluovány již na počátku separace. Rekombinantní protein KOD(exo-) obsahuje His-tag sekvenci, která byla navázána na histidinové kotvě přítomné na koloně. S postupným zvyšováním koncentrace elučního činidla, konkrétně imidazolu, docházelo k eluování látek, jež byly původně na koloně zadržovány.



Obrázek 21: Chromatogram purifikace enzymu KOD(exo-) DNA polymerasa na přístroji ÄKTA pure™. FT (z anglického flow-through) je označení pro látky, které nebyly zachyceny na koloně. Pík 1 a pík 2 označují látky, které byly eluovány se zvyšující se koncentrací imidazolu v roztoku elučního činidla.

Přítomnost enzymu KOD(exo-) polymerasy byla potvrzena pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (10% SDS-PAGE), jak je znázorněno na obrázku č. 22. KOD(exo-) polymerasa, jejíž teoretická molekulová hmotnost činí 90 kDa, byla identifikována porovnáním migrační vzdálenosti s komerčně dostupným molekulovým standardem (Color Protein Standard 10–250 kDa).



Obrázek 22: 10% SDS – PAGE, M (z anglického marker) označuje color Protein Standard 10–250 kDa, NIC (z anglického non-induced cells) značí buňky před indukcí exprese proteinu, TCP (z anglického total cell protein) buňky po dokončení exprese proteinu, L (z anglického lysate) buněčný lysát a FT (z anglického flow-through) průtok při purifikaci. Písmena (A, B) následovaná číslem označují frakce sbírané při purifikaci z píků 1 a 2.

Z výsledného gelu (obrázek č. 22) vyplývá, že frakce odpovídající píku 1 obsahuje exprimovaný protein KOD(exo–), což potvrzuje přítomnost dominantního pásu o molekulové hmotnosti v oblasti odpovídající 90 kDa. Ve frakcích druhého píku nebyla přítomnost cílového proteinu detekována.

### 4.3. Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou extenze primeru (PEX)

Třetím cílem mé bakalářské práce byla inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou PEX za využití vybraných termostabilních DNA polymeras a porovnat jejich aktivitu s KOD(exo-), konkrétně byly pro syntézu vybrány další čtyři DNA polymerasy KOD, KOD XL, Vent a Vent(exo-). Nejprve byly optimalizovány podmínky pouze při reakci s přirozenými nukleotidy a poté byla provedena metoda PEX i se všemi čtyřmi modifikovanými dN<sup>R</sup>TPs (dC<sup>OMe</sup>TP, dC<sup>DOx</sup>TP, dA<sup>F</sup>TP, dA<sup>2F</sup>TP).

#### 4.3.1. Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou PEX s templátem o délce 19 nukleotidů

Pro metodu PEX byl zvolen templát o délce 19nt (tabulka č. 3) výsledné podmínky jsou zapsány v tabulce č. 4 pro DNA polymerasy KOD(exo-) a KOD XL a v tabulce č. 5 jsou popsány reakční podmínky pro DNA polymerasy Vent(exo-) a Vent. KOD DNA polymerasa byla testována zvlášť (viz dále). Proběhlé reakce byly vyhodnocovány pomocí 12,5% denaturační polyakrylamidové gelové elektroforézy.

*Tabulka 3: Jednotlivá písmena reprezentují počáteční písmena nukleotidů, podtržené nukleotidy označují komplementární vlákno primeru k templátu, zeleně označený nukleotid označuje, kam je inkorporován nukleotid s modifikací, A<sup>R1</sup>, R1 označuje nukleobáze s přítomnými modifikacemi F a 2F, fialově je označen nukleotid, kam je inkorporován nukleotid s modifikací C<sup>R2</sup>, R2 označuje nukleobáze s modifikacemi OMe a DOx.*

Název	Sekvence	Délka (nt)
Prim <sup>15nt</sup> -FAM <sup>a</sup> )	5' – CATGGGCGGCATGGG – 3'	15
Temp <sup>Oligo1A</sup>	5' – CCC <u>T</u> CCCATGCCGCCCATG – 3'	19
Komplementární vlákno k Temp <sup>Oligo1A</sup>	3' - GGG <u>A</u> <sup>R1</sup> GGGTACGGCGGGTAC – 5'	19
Temp <sup>Oligo1C</sup>	5' – CCC <u>G</u> CCCATGCCGCCCATG – 3'	19
Komplementární vlákno k Temp <sup>Oligo1C</sup>	3' - GGG <u>C</u> <sup>R2</sup> GGGTACGGCGGGTAC – 5'	19

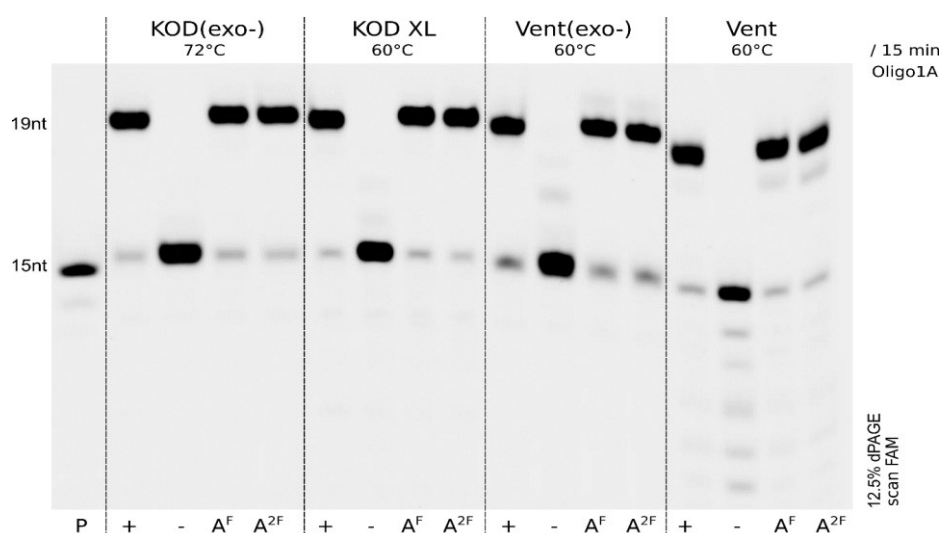
Pozn.: <sup>a</sup>) Primer<sup>15nt</sup>-FAM označen fluorescenční značkou 6-FAM na 5'konci (obrázek č. 8, kapitola 3.1.1.).

Tabulka 4: Složení reakčních roztoku pro PEX s využitím KOD(exo-) a KOD XL DNA polymeras s templátem o délce 19nt

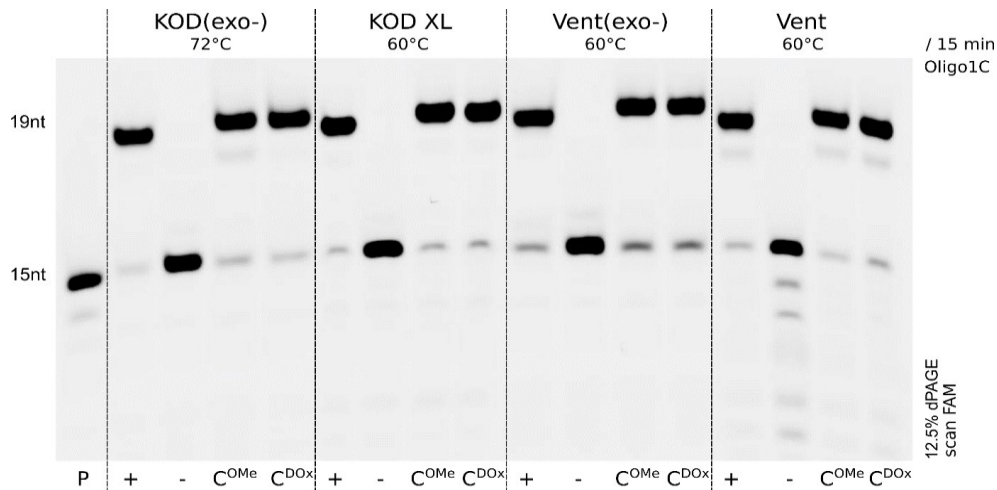
DNA polymerasa	KOD(exo-)						KOD XL					
c (DNA polymerasa)	1.1 $\mu\text{M}$						0.125 U/ $\mu\text{L}$					
$\Sigma(V) = 20 \mu\text{L}$	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>
V (10x pufr) [ $\mu\text{L}$ ]	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V (Prim <sup>15nt</sup> ) (3 $\mu\text{M}$ ) [ $\mu\text{L}$ ]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V (Temp <sup>Oligo1A</sup> ) (3 $\mu\text{M}$ ) [ $\mu\text{L}$ ]	1,2	1,2	1,2	----	----	----	1,2	1,2	1,2	----	----	----
V (Temp <sup>Oligo1C</sup> ) (3 $\mu\text{M}$ ) [ $\mu\text{L}$ ]	----	----	----	1,2	1,2	1,2	----	----	----	1,2	1,2	1,2
V (enzym) [ $\mu\text{L}$ ]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1	1	1	1	1	1
V (dGTP) (0.5 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
V (dATP) (0.5 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	0,8	----	----	----	----	----	0,5	----	----	----	----	----
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (0.5 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	----	----	0,8	----	----	----	0,5	----	----	----	----	----
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (0.5 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	----	----	----	----	----	0,8	----	----	----	----	----	0,8
V (H <sub>2</sub> O) [ $\mu\text{L}$ ]	12,7	13,5	12,7	12,7	13,5	12,7	13,8	14,3	13,8	13,8	14,3	13,8
Reakční podmínky (teplota/ čas inkubace)	72 °C /15 min						60 °C /15 min					

Tabulka 5: Složení reakčních roztoků pro PEX s využitím Vent(exo-) a Vent DNA polymeras s templátem o délce 19nt.

DNA polymerasa	Vent(exo-)						Vent					
c (DNA polymerasa)	0.4 U/ $\mu$ L						0.4 U/ $\mu$ L					
$\Sigma(V) = 20 \mu$ L	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>
V (10x pufr) [ $\mu$ L]	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V (Prim <sup>15nt</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V (Temp <sup>Oligo1A</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	1,2	1,2	1,2	---	---	---	1,2	1,2	1,2	---	---	---
V (Temp <sup>Oligo1C</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	---	---	---	1,2	1,2	1,2	---	---	---	1,2	1,2	1,2
V (enzym) [ $\mu$ L]	1	1	1	1	1	1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
V (dGTP) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
V (dATP) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	0,5	---	---	---	---	---	0,5	---	---	---	---	---
V (dCTP) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	---	---	---	0,5	---	---	---	---	---	0,5	---	---
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	---	---	0,5	---	---	---	---	---	0,5	---	---	---
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	---	---	---	---	---	0,5	---	---	---	---	---	0,5
V (H <sub>2</sub> O) [ $\mu$ L]	13,8	14,3	13,8	13,8	14,3	13,8	14	14,5	14	14	14,5	14
Reakční podmínky (teplota/ čas inkubace)	60 °C / 15 min						60 °C / 15 min					



Obrázek 23: 12,5% dPAGE, (P) označuje na 5'konci fluorescenčně značený primer o délce 15 nt. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky s odpovídajícími přirozenými dNTPs. (-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez obsaženého prvního inkorporovaného dATPs nebo dA<sup>R1</sup>TP (R1 = F, 2F), A<sup>F</sup> a A<sup>2F</sup> označuje vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese danou modifikaci.



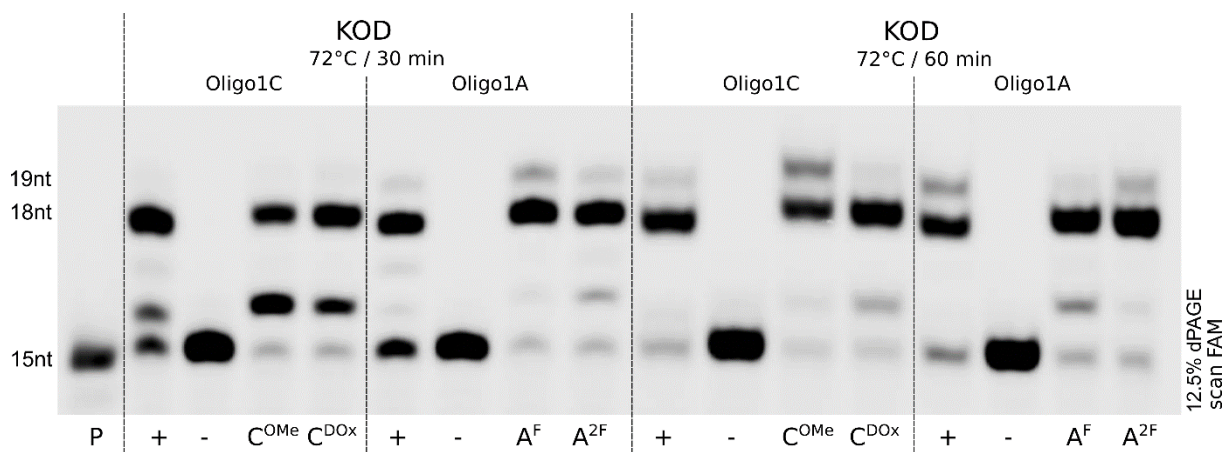
Obrázek 24: 12,5 % dPAGE, (P) označuje na 5'konci fluorescenčně značený primer o délce 15 nt. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky s odpovídajícími přirozenými dNTPs. (-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez obsaženého prvního inkorporovaného dCTP nebo dC<sup>R2</sup>TP (R2 = OMe, DOx). C<sup>OMe</sup> a C<sup>DOx</sup> označuje vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese danou modifikaci.

Na gelu č. 23 a č. 24 lze vidět, že všechny DNA polymerasy KOD(exo-), KOD XL, Vent(exo-) i Vent inkorporují nukleotidy stejně účinně, poskytující plně extendované produkty 19DNA\_C/A, 19DNA\_C<sup>R2</sup> (R2 = OMe, DOx) a 19DNA\_A<sup>R1</sup> (R1 = F, 2F). Také je patrné, že přítomnost modifikací nemá vliv na syntézu produktu, to lze potvrdit porovnáním mobility přirozeného (+) a modifikovaného vlákna (A<sup>F</sup>, A<sup>2F</sup>, C<sup>OMe</sup>, C<sup>DOx</sup>). U vzorků negativních kontrol (-) nedochází k inkorporaci žádného nukleotidu, tím lze dokázat, že nedochází k inkorporaci chybných nukleotidů a, že PEX probíhá správně. Zároveň u negativních kontrol (-) syntetizovaných Vent DNA polymerasou lze pozorovat zkracování primeru v důsledku 3'→5' exonukleázové aktivity této DNA polymerasy. Správnost PEX, respektive plně extendovaných 19DNA produktů, byla poté ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie (tabulka č. 16, kapitola 4.5.1.).

U KOD DNA polymerasy musely být podmínky dále optimalizovány. Bylo přidáváno větší množství enzymu, přirozených dNTPs i modifikovaných dN<sup>R</sup>TPs (R= OMe, DOx, F, 2F) a byl prodloužen čas inkubace (tabulka č. 6).

Tabulka 6: Složení reakčních roztoků pro PEX s využitím KOD DNA polymerasy s templátem o délce 19nt.

DNA polymerasa	KOD					
c (DNA polymerasa)	2,5 U/ $\mu$ L					
$\Sigma(V) = 20 \mu$ L	A+	A-	A <sup>F</sup> /A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> /C <sup>DOx</sup>
V (10x pufr) [ $\mu$ L]	2	2	2	2	2	2
V (Prim <sup>15nt</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	1	1	1	1	1	1
V (Temp <sup>Oligo1A</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	1,2	1,2	1,2	----	----	----
V (Temp <sup>Oligo1C</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	----	----	----	1,2	1,2	1,2
V (enzym) [ $\mu$ L]	1	1	1	1	1	1
V (dGTP) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	1	1	1	1	1	1
V (dATP) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	0,8	----	----	----	----	----
V (dCTP) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	----	----	----	0,8	----	----
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	----	----	0,8	----	----	----
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (0.5 mM) [ $\mu$ L]	----	----	----	----	----	0,8
V (H <sub>2</sub> O) [ $\mu$ L]	13	13,8	13	13	13,8	13
Reakční podmínky (teplota/ čas inkubace)	72 °C / 30 min, 60 min					



Obrázek 25: 12,5 % dPAGE, (P) označuje na 5'konci fluorescenčně značený primer o délce 15 nt. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky s odpovídajícími přirozenými dNTPs. (-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez obsaženého prvního inkorporovaného dNTPs (N = C,A) nebo dN<sup>R</sup>TP (R= OMe, DOx, F, 2F). C<sup>OMe</sup>, C<sup>DOx</sup>, A<sup>F</sup> a A<sup>2F</sup> označuje vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese danou modifikaci.

Jak je z gelu (obrázek č. 25) patrné, i přes zvýšení množství enzymu, dNTPs a prodloužení doby inkubace, KOD DNA polymerasa není schopna syntetizovat plně extendovaný 19DNA produkt, a stále převažuje tvorba 18DNA zkráceného o dGMP. Při kratší, 30minutové inkubaci je z gelu také patrné, že kromě produktu zkráceného o dGMP, vzniká i produkt jen o jeden nukleotid delší, než je primer (16nt), zejména u templátu Oligo1C odpovídající inkorporaci dC<sup>R2</sup>TPs (R2 = OMe, DOx). Při delší době inkubace (60 minut) můžeme pozorovat malé množství 19DNA produktu, ale stále výrazně převyšuje produkt zkrácený o jeden nukleotid (dGMP).

#### 4.3.2. Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou PEX s templátem o délce 31 nukleotidů

*Tabulka 7: Jednotlivá písmena reprezentují počáteční písmena nukleotidů, podtržené nukleotidy označují komplementární vlákno primeru k templátu, žlutě označují pozici nukleotidů, ke kterým je na základě komplementarity bázi inkorporován nukleotid nesoucí modifikaci F a 2F, červeně označené nukleotidy, jsou ty, ke kterým se inkorporuje nukleotid nesoucí modifikaci OMe a DOx.*

Název	Sekvence	Délka (nt)
Prim <sup>15nt</sup> -FAM <sup>a)</sup>	5' – CATGGGCGGCATGGG – 3'	15
Temp <sup>31ON</sup>	5' – CTAGCATGAGCTCAGTCCCATGCCGCCCATG – 3'	31
Komplementární vlákno k Temp <sup>31ON</sup>	3' – GA <sup>R</sup> TC <sup>R</sup> GT <sup>A</sup> TC <sup>R</sup> TC <sup>R</sup> GA <sup>R</sup> GT <sup>C</sup> CA <sup>R</sup> GGGTACGGCGGGTAC – 5'	31

Pozn.: <sup>a)</sup> Primer<sup>15nt</sup>-FAM označen fluorescenční značkou 6-FAM na 5'konci (obrázek č. 8, kapitola 3.1.1.).

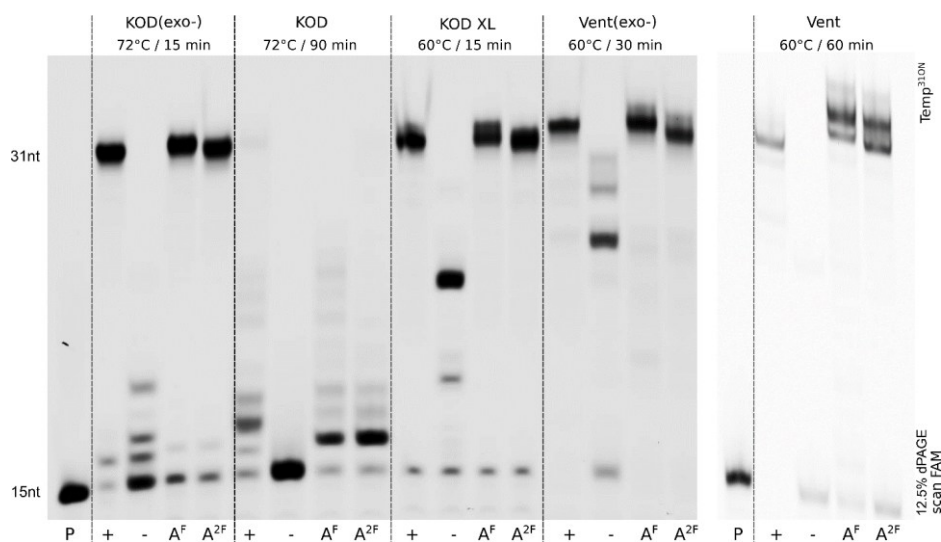
Byla provedena syntéza metodou PEX s templátem o délce 31 nukleotidů (tabulka č. 7). Nejprve byly optimalizovány podmínky pouze s přirozenými nukleotidy a pak byly tyto reakční podmínky aplikovány na reakci s modifikovanými dNTPs. Analýza průběhu syntézy byla provedena na 12,5% denaturační polyakrylamidové gelové elektroforéze (dPAGE) (obrázky č. 26, 27). Oproti PEX s templátem o délce 19nt (kapitola 4.3.1.) byly použity koncentrovanější roztoky dNTPs i dN<sup>R</sup>TPs (R= OMe, DOx, F, 2F). V tabulce č. 8 jsou výsledné reakční podmínky při použití KOD(exo–), KOD a KOD XL a v tabulce č. 9 jsou reakční podmínky pro Vent(exo–) a Vent DNA polymerasy.

Tabulka 8: Složení reakčních roztoků pro PEX s využitím KOD(exo-), KOD a KOD XL DNA polymeras s templátem o délce 31nt.

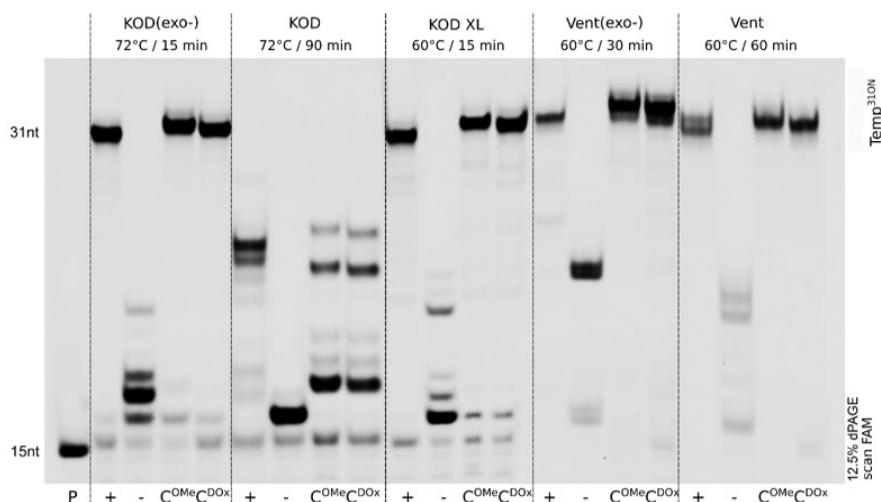
DNA polymerasa	KOD(exo-)						KOD						KOD XL						
	1,1 $\mu$ M						2,5 U/ $\mu$ L						0,125 U/ $\mu$ L						
c (DNA polymerasa)	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	
$\Sigma(V) = 20 \mu\text{L}$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V (10x pufr) [ $\mu\text{L}$ ]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V (Prim <sup>15nt</sup> ) (3 $\mu\text{M}$ ) [ $\mu\text{L}$ ]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V (Temp <sup>310N</sup> ) (3 $\mu\text{M}$ ) [ $\mu\text{L}$ ]	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
V (enzym) [ $\mu\text{L}$ ]	0,5	---	---	0,5	---	---	1,5	---	---	1,5	---	---	---	---	---	0,5	---	---	---
V (ACTG) (4 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	---	---	---	---	0,5	0,5	---	---	---	---	1,5	1,5	---	---	---	---	0,5	0,5	0,5
V (dATG) (4 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V (dCTG) (4 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	---	0,5	0,5	---	---	---	---	1,5	1,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (4 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	---	---	0,5	---	---	---	---	---	1,5	---	---	---	---	---	0,5	---	---	---	---
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (4 mM) [ $\mu\text{L}$ ]	---	---	---	---	---	0,5	---	---	---	---	---	1,5	---	---	---	---	---	---	0,5
V (H <sub>2</sub> O) [ $\mu\text{L}$ ]	14	14	13,5	14	14	13,5	12	12	11	12	12	11	14,5	14,5	14	14,5	14,5	14	14
Reakční podmínky (teplota/ čas inkubace)	72 °C / 15 min						72 °C / 90 min						60 °C / 15 min						

Tabulka 9: Složení reakčních roztoků pro PEX s využitím Vent(exo-) a Vent DNA polymeras s templátem o délce 31nt.

DNA polymerasa	Vent(exo-)						Vent					
c (DNA polymerasa)	2 U / $\mu$ L						2 U / $\mu$ L					
$\Sigma(V) = 20 \mu$ L	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>
V (10x pufr) [ $\mu$ L]	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V (Prim <sup>15nt</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V (Temp <sup>31ON</sup> ) (3 $\mu$ M) [ $\mu$ L]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V (enzym) [ $\mu$ L]	1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	4	4
V (ACTG) (4 mM) [ $\mu$ L]	0,5	----	----	0,5	----	----	1,5	----	----	3	----	----
V (dATG) (4 mM) [ $\mu$ L]	----	----	----	----	0,5	0,5	----	----	----	----	3	3
V (dCTG) (4mM) [ $\mu$ L]	----	0,5	0,5	----	----	----	----	1,5	1,5	----	----	----
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (4 mM) [ $\mu$ L]	----	----	0,5	----	----	----	----	----	1	----	----	----
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (4 mM) [ $\mu$ L]	----	----	----	----	----	0,5	----	----	----	----	----	3
V (H <sub>2</sub> O) [ $\mu$ L]	14	14	13,5	14	14	13,5	12	12	11	8,5	8,5	5,5
Reakční podmínky (teplota/ čas inkubace)	60 °C / 30 min						60 °C / 60 min					



Obrázek 26: 12,5% dPAGE, (P) označuje na 5'konci fluorescenčně značený primer o délce 15 nt. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky s odpovídajícími přirozenými dNTPs. (-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez obsaženého prvního inkorporovaného dNTPs. A<sup>F</sup> a A<sup>2F</sup> označuje vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese danou modifikaci.



Obrázek 27: 12,5% dPAGE, (P) označuje na 5' konci fluorescenčně značený primer o délce 15 nt. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky s odpovídajícími přirozenými dNTPs. (-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez obsaženého prvního inkorporovaného dNTP nebo dN<sup>R</sup>TP. C<sup>OMe</sup>, C<sup>DOx</sup>, označuje vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese danou modifikaci.

Na obrázcích gelu č. 26 a č. 27 je viditelné, že DNA polymerasy KOD(exo-), KOD XL a Vent(exo-) a Vent jsou schopné syntetizovat plně extendované 31DNA, 31DNA\_A<sup>R1</sup> (R1 = F, 2F) a 31DNA\_C<sup>R2</sup> (R2 = OMe, DOx). V případě Vent DNA polymerasy byla při inkorporaci dA<sup>R1</sup>TPs, na gelu pozorována tvorba dvou pásů produktů – 31DNA\_A<sup>F</sup>/A<sup>2F</sup> a delší 32DNA\_A<sup>F</sup>/A<sup>2F</sup>, kde zřejmě dochází k netemplátové adici jednoho nukleotidu navíc. Z porovnání intenzity pásu lze vyvodit, že i v případě inkorporace modifikovaných dNTPs dochází ke stejně účinné syntéze jako v případě syntézy s použitím přirozených dNTPs (+ kontrola).

U KOD DNA polymerasy je viditelné, že není schopna syntetizovat DNA se správným počtem nukleotidů, tato skutečnost byla pozorována již u syntézy kratšího templátu o délce 19nt (kapitola 4.3.1). Reakční podmínky pro tuto DNA polymerasu nebyly dále optimalizovány.

## 4.4. Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou polymerasové řetězové reakce

Tabulka 10: Jednotlivá písmena reprezentují počáteční písmena nukleotidů; podtržené nukleotidy označují komplementární vlákno primeru k templátu; žlutě označené určují pozici nukleotidů, ke kterým je na základě komplementarity bázi inkorporován nukleotid  $A^F$  nebo  $A^{2F}$ ; červeně označené nukleotidy, jsou ty, ke kterým se inkorporuje nukleotid  $C^{OMe}$  nebo  $C^{DOx}$ .

Název	Sekvence	Délka (nt)
Prim <sup>FORPveg2</sup>	5' – TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG – 3'	25
Prim <sup>FORPveg2</sup> FAM <sup>a)</sup>	5' – TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG – 3'	25
Prim <sup>REVPveg2</sup>	5' – GGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAG – 3'	26
Prim <sup>REVPveg2</sup> Cy5 <sup>b)</sup>	5' – GGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAG – 3'	26
Temp <sup>Pveg</sup>	5' - TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCACCTGAC GTCTAAGAAACCAATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAG GCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTATTTGACAA AAATGGGCTCCTGTGTGTACAATAAATGTGTCTAAGCTTGGGTCC CACCTGACCCCATGCCGAAC TCA GAAGTGAAACGCCGTAGCCG CATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCCAGAGTAGGGAACTGC CAGGCATCAAATAAAACGAAA GGCTCA GTCGAAA GACTGGGCC TTTCTTTTATCTGTTGTTGTCTGGTGAACGCTCTCC – 3'	339

a) Prim<sup>FORPveg2</sup>FAM označen fluorescenční značkou 6 - FAM na 5' konci (obrázek č. 8, kapitola 3.1.1.), b) Prim<sup>REVPveg2</sup>Cy5 označen fluorescenční značkou Cy5 (obrázek č. 9, kapitola 3.1.1.)

### 4.4.1.1. Syntéza templátu Pveg pomocí polymerasové řetězové reakce

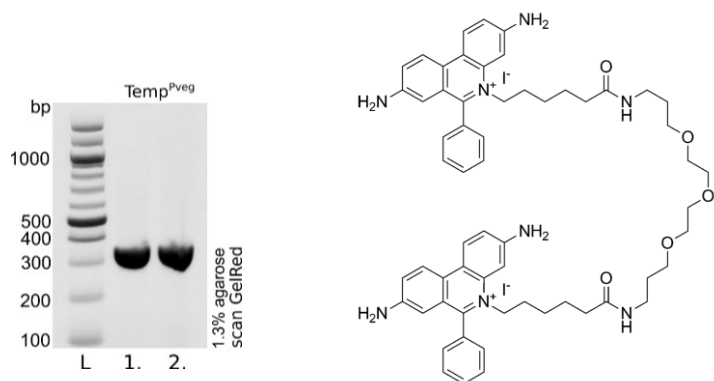
Plasmid (Pveg konstitutivní fragment klonovaný v p770 mezi EcoRI a HindIII) byl použit na PCR amplifikaci příslušného fragmentu o délce 339nt (Temp<sup>Pveg</sup>). Výsledné složení reakčního roztoku dle tabulky č. 11, za podmínek dle tabulky č.1, kapitola 3.2.5. Produkt syntézy byl purifikován pomocí PCR purifikačního kitu. Průběh syntézy byl analyzován na 1,3 % agarosovém gelu s přidavkem interkalačního činidla GelRed kvůli následné vizualizaci. Byla změřena koncentrace na Nanospectrophotometru (tabulka č. 12) a produkt této syntézy o délce 339 nukleotidů byl dále využíván jako templát Temp<sup>Pveg</sup> pro další PCR reakce.

Tabulka 11: Složení reakčního roztoku pro amplifikaci  $Temp^{Pveg}$  pomocí PCR, reakce byla provedena v duplikátu.

$\Sigma(V) = 20 \mu\text{L}$	
DNA polymerasa	KOD XL
c (DNA polymerasa)	2.5U/ $\mu\text{L}$
V (10x pufr) [ $\mu\text{L}$ ]	2
V (Prim <sup>FORPveg 2</sup> ) (20 $\mu\text{M}$ ) [ $\mu\text{L}$ ]	3
V (Prim <sup>REVP/P 2</sup> ) (20 $\mu\text{M}$ ) [ $\mu\text{L}$ ]	3
V (Pveg plasmid) (35.6 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1177Bx [ $\mu\text{L}$ ]	1
V (enzym) [ $\mu\text{L}$ ]	1.2
V (dACTG) (4mM) [ $\mu\text{L}$ ]	0.75
V (H <sub>2</sub> O) [ $\mu\text{L}$ ]	9.05

Tabulka 12: Výsledná koncentrace amplifikované sekvence, která byla nadále používána jako templát pro PCR syntézu (kapitola 4.4.1.2.).

Produkt	c produktu [ng/ $\mu\text{L}$ ]
Temp <sup>Pveg</sup> -1	389.2
Temp <sup>Pveg</sup> - 2	380.6



Obrázek 28: **vlevo:** 1,3% agarosový gel s přidavkem GelRed, L (z anglického ladder) označuje standard obsahující dsDNA o různých délkách., reakce byla provedena v duplikátu, čísla 1. a 2. značí produkty amplifikace pomocí PCR; **vpravo:** struktura interkalačního barviva GelRed, dostupná z [61].

Na výsledném gelu (obrázek č. 28 vlevo) lze vidět pás v oblasti mezi 300 a 400 bp, který potvrzuje, že došlo k amplifikaci produktu o odpovídající délce.

#### 4.4.1.2. Inkorporace modifikovaných nukleotidů metodou PCR s templátem $Temp^{Pveg}$

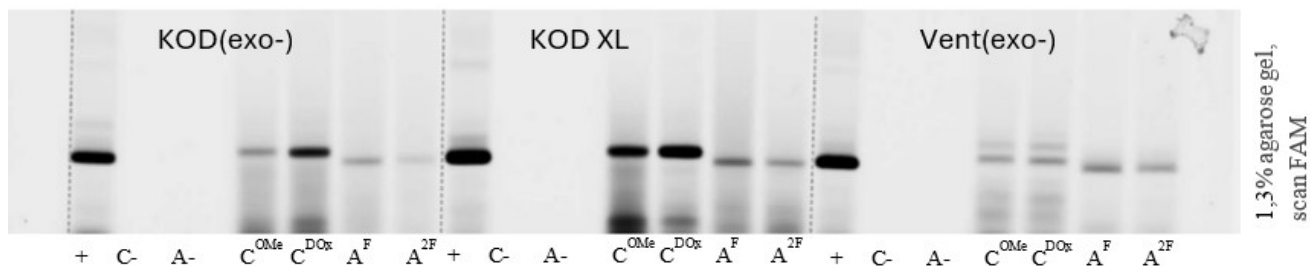
Pro enzymovou syntézu PCR byly vybrány termostabilní DNA polymerasy KOD(exo-), KOD XL a Vent(exo-), jelikož tyto DNA polymerasy bývají pro tuto metodu nejvhodnější. Nejprve byly optimalizovány podmínky pro reakci pouze s přirozenými dNTPs a následně byla provedena syntéza i s modifikovanými dN<sup>R</sup>TPs (R = OMe, DOx, F, 2F), výsledné složení reakčních směsí je zapsáno v tabulce č. 13. Při PCR reakci dochází k exponenciální amplifikaci templátu, proto je při jednotlivých cyklech PCR pro DNA polymerasy náročnější čist templát s modifikovanými nukleobázemi. Pro tuto reakci byly použity dva odlišně fluorescenčně

značené primery: přímý (For) nesoucí fluorescenční značku 6-FAM a reverzní (Rev) nesoucí fluorescenční značku Cy5.

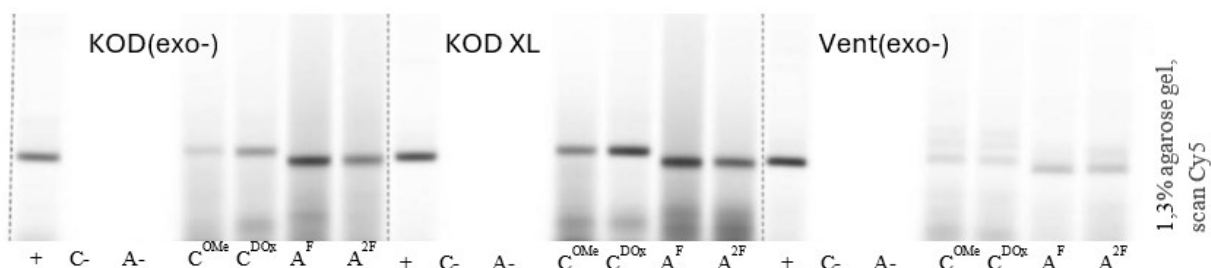
Po dokončení inkubace (tabulka č. 2, kapitola 3.2.6) a následné purifikaci pomocí PCR purifikačního kitu byly produkty amplifikace analyzovány na 1,3% agarosovém gelu. Gel byl skenován na Typhoon pro každou fluorescenční značku odděleně a následně byl gel ponořen na dobu 25 minut do interkalačního fluoroforu GelRed a opět skenován na Typhoon. Výsledkem jsou proto tři obrázky (obrázek č. 29, č. 30, č. 31), každý s jinak fluorescenčně značenými DNA produkty PCR reakce, odpovídajícími prodloužení 6-FAM-značeného primeru (obrázek 29), Cy5-značeného primeru (obrázek 30) a PCR produktů v přítomnosti GelRed. Porovnáním intenzit jednotlivých pásů po vizualizaci všemi fluorofory je zřejmé, že dochází k symetrické amplifikaci obou vláken se stejnou účinností.

Tabulka 13: Složení reakčních roztoků při PCR s využitím KOD(exo-), KOD XL a Vent (exo-) DNA polymeras

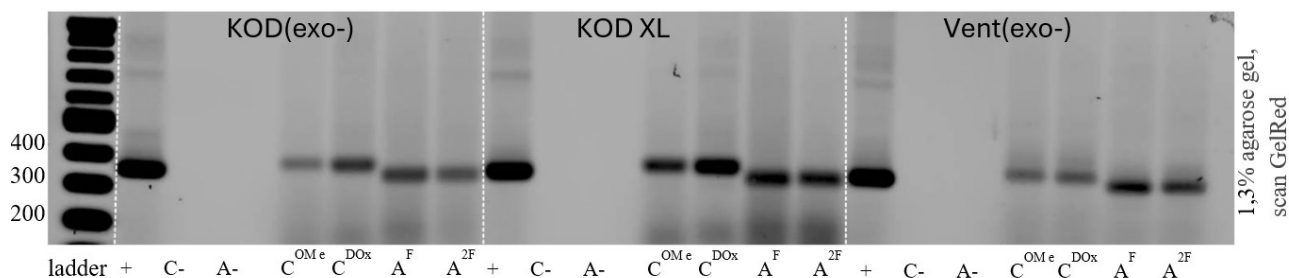
DNA polymerasa	KOD(exo-)						KOD XL						Vent (exo-)					
	1,1 μM						2,5 U/ μL						2 U/ μL					
	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C-	C <sup>OMe</sup> / C <sup>DOx</sup>	A+	A-	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>
c (DNA polymerasa)																		
Σ(V) = 20 μL																		
V (10x pufr) [μL]	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V (Prim <sub>FOR</sub> <sub>Pveg</sub> 2 FAM) (5 μM) [μL]	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
V (Prim <sub>REV</sub> <sub>PP2</sub> Cy5) (5 μM) [μL]	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
V (Temp <sup>Pveg</sup> ) (10 ng/μL) [μL]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V (enzym) [μL]	2	2	2	2	2	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	1	1
V (ACTG) (4 mM) [μL]	1	----	----	1	----	----	1	----	----	1	----	----	1	----	----	1	----	----
V (dATG) (4 mM) [μL]	----	1	1	----	----	----	----	1	1	----	----	----	----	1	1	----	----	----
V (dCTG) (4 mM) [μL]	----	----	----	----	1	1	----	----	----	----	1	1	----	----	----	----	1	1
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (4 mM) [μL]	----	----	----	----	----	1	----	----	----	----	1	1	----	----	----	----	----	1
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (4 mM) [μL]	----	----	1	----	----	----	----	----	1	----	----	----	----	----	1	----	----	----
V (H <sub>2</sub> O) [μL]	8	8	7	8	8	7	8,8	8,8	7,8	8,8	8,8	7,8	9	9	8	9	9	8



Obrázek 29: 1,3% agarosový gel, viditelné produkty označené fluorescenční značkou 6-FAM, vznikly extenzí 6-FAM fluorescenčně značeného přímého primeru. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky pouze s přirozenými dNTPs. (C-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez přítomného dCTP ani dC<sup>R2</sup>TP (R2 = OMe, DOx); (A-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez přítomného dATP ani dA<sup>R1</sup>TP (R1 = F, 2F); (C<sup>OMe</sup>, C<sup>DOx</sup>, A<sup>2F</sup> a A<sup>F</sup>) označuje vzorky, kde dochází k inkorporaci modifikovaných dNTPs spolu s dalšími třemi odpovídajícími přirozenými dNTPs.



Obrázek 30: 1,3% agarosový gel, viditelné produkty označené fluorescenční značkou Cy5, vznikly extenzí Cy5 fluorescenčně značeného přímého primeru. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky pouze s přirozenými dNTPs. (C-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez přítomného dCTP ani dC<sup>R2</sup>TP (R2 = OMe, DOx); (A-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez přítomného dATP ani dA<sup>R1</sup>TP (R1 = F, 2F); (C<sup>OMe</sup>, C<sup>DOx</sup>, A<sup>2F</sup> a A<sup>F</sup>) označuje vzorky, kde dochází k inkorporaci modifikovaných dNTPs spolu s dalšími třemi odpovídajícími přirozenými dNTPs.



Obrázek 31: 1,3% agarosový gel, který byl po separaci barven fluorescenčním barvivem GelRed. Ladder označuje standard obsahující DNA s různým počtem nukleotidů. (+) označuje pozitivní kontrolu, vzorky pouze s přirozenými dNTPs. (C-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez přítomného dCTP ani dC<sup>R2</sup>TP (R2 = OMe, DOx); (A-) označuje vzorek negativní kontroly, vzorky bez přítomného dATP ani dA<sup>R1</sup>TP (R1 = F, 2F); (C<sup>OMe</sup>, C<sup>DOx</sup>, A<sup>2F</sup> a A<sup>F</sup>) označuje vzorky, kde dochází k inkorporaci modifikovaných dNTPs spolu s dalšími třemi odpovídajícími přirozenými dNTPs.

Na výsledných gelech (obrázek č. 29, č. 30 a č. 31) lze vidět, že všechny z použitých termostabilních DNA polymeras jsou schopné amplifikovat i již modifikovanou DNA. Nicméně účinnost amplifikace těchto modifikovaných DNA je menší ve srovnání s amplifikací přirozené DNA. Nejlépe je schopna amplifikovat modifikovanou DNA KOD XL DNA polymerasa.

## 4.5. Analýza DNA

### 4.5.1. Měření molekulové hmotnosti metodou MALDI-TOF a metodou UPLC-MS

Pro měření molekulové hmotnosti byly připraveny vybrané DNA produkty v semi-preparativním měřítku metodou PEX. Reakční podmínky pro syntézu s templátem o délce 19nt s využitím KOD(exo<sup>-</sup>) a Vent DNA polymeras je zapsáno v tabulce č. 14. Pro templát o délce 31nt s využitím KOD(exo<sup>-</sup>) a Vent(exo<sup>-</sup>) a Vent DNA polymeras jsou reakční podmínky zapsány v tabulce č. 15.

Tabulka 14: Složení reakčních roztoků pro PEX v semi-preparativním měřítku s využitím KOD(exo<sup>-</sup>) a Vent DNA polymerasy s templátem o délce 19nt.

DNA polymerasa	KOD(exo <sup>-</sup> )				Vent	
c (DNA polymerasa)	1,1 μM				0,4 U/ μL	
Σ(V) = 60 μL	A+	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C <sup>OMe</sup> /C <sup>DOx</sup>	C+	C <sup>OMe</sup> /C <sup>DOx</sup>
V (10x pufr) [μL]	6	6	6	6	6	6
V (Prim <sup>15nt</sup> ) (10 μM) [μL]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V (Temp <sup>Oligo1C</sup> ) (10 μM) [μL]	----	----	1,8	1,8	1,8	1,8
V (Temp <sup>Oligo1A</sup> ) (10 μM) [μL]	1,8	1,8	----	----	----	----
V (enzym) [μL]	7,5	7,5	7,5	7,5	4	4
V (GTP) (4 mM) [μL]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3
V (dCTP) (4 mM) [μL]	----	----	0,5	----	0,3	----
V (dATP) (4 mM) [μL]	0,5	----	----	----	----	----
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (4 mM) [μL]	----	0,5	----	----	----	----
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (4 mM) [μL]	----	----	----	0,5	----	0,3
V (H <sub>2</sub> O) [μL]	42,2	42,2	42,2	42,2	46,1	46,1
Reakční podmínky (teplota/ čas inkubace)	72 °C /15 min				60 °C /15 min	

Tabulka 15: Složení reakčních roztoků pro PEX v semi-preparativním měřítku s využitím KOD(exo-), Vent(exo-) a Vent DNA polymerasy s templátem o délce 31nt.

DNA polymerasa	KOD(exo-)				Vent(exo-)		Vent	
c (DNA polymerasa)	1,1 μM				2 U/ μL		2 U/ μL	
Σ(V) = 60 μL	A+	A <sup>F</sup> / A <sup>2F</sup>	C+	C <sup>OMe</sup> /C <sup>DOx</sup>	C+	C <sup>OMe</sup> /C <sup>DOx</sup>	C+	C <sup>OMe</sup> /C <sup>DOx</sup>
V (10x pufr) [μL]	6	6	6	6	6	6	6	6
V (Prim <sup>15nt</sup> ) (10 μM) [μL]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V (Temp <sup>31ON</sup> ) (10 μM) [μL]	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
V (enzym) [μL]	5	5	5	5	5	5	10	10
V (ACTG) (4 mM) [μL]	2,5	----	2,5	----	2,5	----	7,5	----
V (dATG) (4 mM) [μL]	----	----	----	2,5	----	2,5	----	7,5
V (dCTG) (4 mM) [μL]	----	2,5	----	----	----	----	----	----
V (dA <sup>F</sup> / dA <sup>2F</sup> ) (4 mM) [μL]	----	2,5	----	----	----	----	----	----
V (dC <sup>OMe</sup> / dC <sup>DOx</sup> ) (4 mM) [μL]	----	----	----	2,5	----	2,5	----	7,5
V (H <sub>2</sub> O) [μL]	42,75	40,25	42,75	40,25	42,75	40,25	32,75	25,25
Reakční podmínky (teplota/ čas inkubace)	72 °C /15 min				60 °C /15 min		60 °C /30 min	

Metodou MALDI-TOF a UPLC-MS bylo ověřeno, zda molekulová hmotnost ( $M_w$ ) u vybraných syntetizovaných DNA produktů metodou PEX odpovídá teoretické molekulové hmotnosti produktů a potvrdit tak správnost inkorporace nukleotidů během enzymové syntézy, respektive potvrdit, že nedochází k inkorporaci nesprávného nukleotidu do rostoucího řetězce DNA.

Tabulka 16: Molekulové hmotnosti dsDNA produktů měřené metodou MALDI-TOF nebo metodou UPLC-MS. V tabulce je uveden použitý templát, následně DNA polymerasa, dsDNA produkt, teoretická molekulová hmotnost [ $M_w$  (teor.)], naměřená molekulová hmotnost [ $M_w$  (real.)], rozdíl molekulových hmotností ( $\Delta$ ).

Templát	DNA polymerasa	dsDNA produkt	$M_w$ (teor.) [Da]	$M_w$ (real.) [Da]	$\Delta$ [Da]
Temp <sup>Oligo1C</sup>	KOD(exo-)	19DNA_C	6488,4	6490,4	2,0
		19DNA_C <sup>OMe</sup>	6619,5	6620,5	1,0
		19DNA_C <sup>DOx</sup>	6633,4	6634,0	0,6
	Vent	19DNA_C	6489,7	6488,4	1,3
		19DNA_C <sup>OMe</sup>	6619,5	6627,9	8,4
		19DNA_C <sup>DOx</sup>	6633,4	6639,7	6,3
Temp <sup>Oligo1A</sup>	KOD(exo-)	19DNA_A	6512,4	6509,0	3,4
		19DNA_A <sup>F</sup>	6628,4	6626,0	2,4
		19DNA_A <sup>2F</sup>	6646,4	6645,0	1,4
Temp <sup>31ON</sup>	KOD(exo-)	31DNA	10154,8	10150,0	4,8
		31DNA_C <sup>OMe</sup>	10679,0	10682,0	3,0
		31DNA_C <sup>DOx</sup>	10734,9	10735,2	0,3
		31DNA_A <sup>F</sup>	10626,9	10619,0	7,9
		31DNA_A <sup>2F</sup>	10698,9	10691,0	7,9
	Vent(exo-)	31DNA	10154,8	10464,0 <sup>a)</sup>	309,2
		31DNA_C <sup>OMe</sup>	10679,0	10984,0 <sup>a)</sup>	305,0
		31DNA_C <sup>DOx</sup>	10734,9	11040,0 <sup>a)</sup>	305,1
	Vent	31DNA	10154,8	10151,0	3,8
		31DNA_C <sup>OMe</sup>	10679,0	10671,0	8
		31DNA_C <sup>DOx</sup>	10734,9	10727,0	7,9

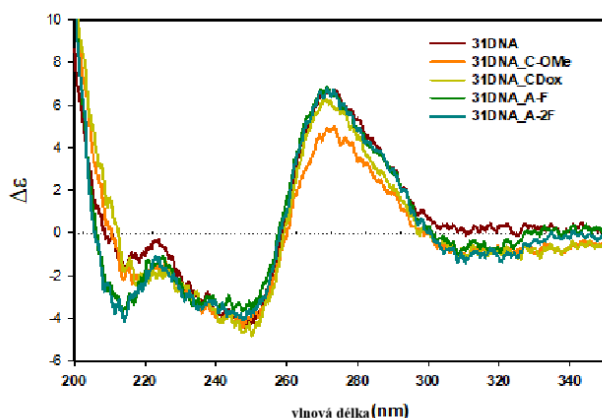
Pozn.: <sup>a)</sup> Syntetizovaný produkt prodloužený o dTMP

Z naměřených hodnot (tabulka č. 16) je patrné, že u PEX reakcí v přítomnosti KOD(exo-) a Vent DNA polymeras dochází k syntéze plně extendovaného produktu jak v případě reakce s přirozenými dNTPs, tak v případě dN<sup>R</sup>Tps nesoucími modifikací (R = OMe, DOx, F, 2F). Dle předpokladů z PAGE gelů (obrázek č. 26 a č. 27, kapitola 4.5.1), naměřené  $M_w$  DNA produktů syntetizovaných pomocí Vent(exo-) DNA polymerasy potvrdily přítomnost produktů 32DNA, 32DNA\_C<sup>OMe</sup> a 32DNA\_C<sup>DOx</sup> vznikajících netemplátovou adicí dTMP.

#### 4.5.2. Studium vlivu modifikace na strukturu DNA metodou cirkulárního dichroismu

Pro studium vlivu modifikace metodou cirkulárního dichroismu (CD) byly připraveny vzorky ve stejném měřítku jako na měření molekulové hmotnosti s KOD(exo-) DNA polymerasou a templátem Temp31<sup>ON</sup>. Složení reakčních směsí je zapsáno v tabulce č. 15., v kapitole 4.5.1.

CD spektra studovaných nukleosid trifosfátů mají negativní a pozitivní maxima v oblasti ~245 nm a ~266 nm porovnatelné intenzity (obrázek č. 32). Tento průběh je charakteristický pro B konformaci DNA [62].



Obrázek 32: Porovnání CD spekter přirozené a modifikované DNA. Křivky jednotlivých DNA s modifikací a přirozené DNA jsou označeny různými barvami. Na vodorovné ose je vynesena vlnová délka ( $\lambda$ ) v hodnotách od 200 nm do 340 nm a na svislé ose je vynesena diferenciální molární extinkce ( $\Delta\epsilon$ ).

Pozorované spektrální změny ve spektrální oblasti 300-320 nm jsou zřejmě důsledkem přítomnosti modifikací v primární struktuře nukleotidů. Porovnáním tvaru křivek vyplývá, že všechny čtyři modifikace (OMe, DOx, F, 2F) mají mírný vliv na prostorovou strukturu DNA, ale z celkového hlediska nedochází ke změně konformace DNA a všechny modifikované DNA, obdobně jako přirozená DNA, zaujímají B konformaci.

### 4.5.3. Studium vlivu modifikací DNA na teplotu denaturace

Pro porovnání denaturačních teplot přirozené a modifikované DNA bylo nutné nejprve vzorky studovaných DNA připravit opět v semi-preparativním měřítku s KOD(exo-) DNA polymerasou a templátem Temp31<sup>ON</sup> (tabulka č. 15, kapitola 4.5.1) a pak naředit tak, aby vykazovaly stejnou hodnotu absorbance.

Tabulka 17: Teploty denaturace přirozené DNA, modifikované DNA a rozdíl mezi nimi ( $\Delta T$ ).

<b>dsDNA</b>	<b>Teplota denaturace [°C]</b>	<b><math>\Delta T</math> [°C]</b>
31DNA	78,5	---
31DNA C <sup>OMe</sup>	79,5	0,25
31DNA C <sup>DOx</sup>	77,5	-0,25
31DNA A <sup>F</sup>	78,8	0,08
31DNA A <sup>2F</sup>	78,9	0,10

$$\Delta T = \frac{T_m(\text{modifikované DNA}) - T_m(\text{přirozené DNA})}{n}; n = 4 \text{ (počet modifikací)} \quad (\text{rovnice č. 4.1.})$$

Na základě experimentálních dat týkajících se teploty denaturace (tabulka č. 17) modifikované DNA a jejího porovnání s teplotou denaturace přirozené DNA lze konstatovat, že zavedení modifikovaných bází nevede k výrazné změně teploty denaturace, což naznačuje, že tyto modifikace zásadním způsobem neovlivňují stabilitu dvoušroubovicové struktury. Pro ověření a potvrzení získaných výsledků a vzhledem k odchylkám při měření by bylo vhodné provést opakování daného experimentu za stejných podmínek.

## 5. Diskuse

Cílem této bakalářské práce byla syntéza dvou modifikovaných nukleosid trifosfátů, konkrétně  $dC^{DOx}TP$  a  $dA^{2F}TP$ , a jejich aplikace při studiu enzymové syntézy prostřednictvím metod extenze primeru (PEX) a polymerasové řetězové reakce (PCR). Benzodioxolová (DOx) modifikace byla navázána do pozice 5 u cytosinu a difluorfenylová (2F) do polohy 7 u 7-deazaadeninu pomocí Sonogashira cross-coupling reakce. Syntetizované nukleosid trifosfáty byly charakterizovány metodou NMR a pomocí hmotnostní spektrometrie. Výťažky po cross-coupling reakci a následném čištění flash chromatografií se pohybovaly kolem 40 % a výťažky po následné trifosforylaci se pohybovaly kolem 20 %. Nižší výtěžek cross-coupling reakce je přisuzován jen částečnou konverzí na produkty a následným čištěním flash chromatografií. Nižší výtěžek fosforylační reakce je většinou způsoben možnou přítomností vlhkosti, která inaktivuje fosforylační činidlo  $POCl_3$ , ale také částečnou hydrolyzou trifosfátů během zpracovávání a během HPLC separace. Tyto výťažky, respektive izolovaná množství  $dC^{DOx}TP$  a  $dA^{2F}TP$ , jsou nicméně dostačující pro potřebné biochemické experimenty.

Za účelem rozšíření této studie a komplexnější analýzy vlivu elektronových efektů modifikací na nukleobázích byly k výše uvedeným modifikovaným nukleotidům doplněny další dva trifosfáty. Spolu s  $dC^{DOx}TP$ , jenž představuje trifosfát s elektron-donorní substitucí, byl zařazen také trifosfát  $dC^{OMe}TP$  nesoucí methoxyfenylovou skupinu. Pro reprezentaci elektron-akceptorních modifikací byl do studie kromě  $dA^{2F}TP$ , dále zahrnut trifosfát  $dA^F TP$  nesoucí monofluorfenylovou skupinu.

Z transformovaných buněk *E. coli* BL21-AI byla exprimována KOD(exo-) DNA polymerasa. Tento kmen buněk je hojně využíván pro expresi rekombinantních proteinů, zejména z důvodu: (a) indukce exprese pomocí IPTG, umožňující přesnou kontrolu nad produkcí proteinu (b) díky genetickým úpravám má nízkou úroveň vlastní exprese, zvyšující výtěžnost rekombinantního proteinu. KOD(exo-) DNA polymerasa byla úspěšně exprimována jako fúzní protein s připojeným His-tag, což umožnilo její úspěšnou separaci pomocí afinitní chromatografie.

Účinnost KOD(exo-) a dalších čtyř termostabilních DNA polymeras – KOD, KOD XL, Vent a Vent(exo-), byla nejprve testována metodou PEX s využitím dvou různě dlouhých templátů. Templát o délce 19 nukleotidů, u kterého dochází k inkorporaci pouze jedné modifikované báze a dále templát o délce 31 nukleotidů, u kterého byly inkorporovány čtyři modifikace do vznikajícího vlákna. Při této syntéze došlo ke vzniku plně extendovaných produktů nesoucí modifikaci u čtyř DNA polymeras – KOD(exo-), KOD XL, Vent a Vent(exo-). Z analýzy

PAGE gelů bylo patrné, že tyto DNA polymerasy inkorporují modifikované nukleobáze se stejnou účinností jako při použití přirozených dNTPs. Tento výsledek byl následně potvrzen pomocí hmotnostní spektrometrie. Výjimka byla pozorována u KOD DNA polymerasy, kde nedocházelo k syntéze plně extendovaného produktu ani při použití přirozených dNTPs. Možným vysvětlením by mohlo být, že KOD DNA polymerasa je spíše konstruována pro amplifikaci dlouhých templátů [63], což znamená, že její aktivita při enzymové syntéze krátkých sekvencí může být nižší, a to může vést k neúplné amplifikaci nebo nízkému výtěžku produktu.

Metodou PCR byla testována inkorporace přirozených dNTPs i modifikovaných dN<sup>R</sup>TPs (R = OMe, DOx, F, 2F) za použití tří termostabilních DNA polymeras, konkrétně KOD(exo-), KOD XL a Vent(exo-). U všech DNA polymeras došlo k syntéze produktu i za použití modifikovaných dN<sup>R</sup>TPs, avšak s nižší účinností než v případě syntézy přirozené DNA. Vzhledem k tomu, že u PCR dochází k amplifikaci již modifikovaného vlákna, může být čtení takového templátu pro DNA polymerasy náročnější.

Templát o délce 31nt byl použit pro syntézu jak přirozené 31DNA, tak modifikovaných 31DNA\_C<sup>OMe</sup>, 31DNA\_C<sup>DOx</sup>, 31DNA\_A<sup>F</sup>, 31DNA\_A<sup>2F</sup> ve větším měřítku pro měření pomocí CD a stanovení teploty denaturace. Analýza metodou CD prokázala zachování B konformace u všech testovaných DNA nesoucí jak dvě elektron-donorní (OMe, DOx), tak dvě elektron-akceptorní (F, 2F) modifikace. Což je v souladu s předchozí studií provedenou ve skupině prof. Hocka, prokazující, že i hypermodifikovaná forma DNA si zachovává charakteristickou B konformaci [25]. Ze stanovených teplot denaturace ( $T_m$ ) modifikovaných DNA a jejich porovnáním s přirozenou DNA lze usoudit, že nedochází k žádné výrazné změně vlivem modifikací. Pro získání optimálních výsledků by bylo zapotřebí daný experiment za daných podmínek zopakovat.

## 6. Závěr

- Byly připraveny dva 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí benzodioxolovou a difluorfenylovou modifikaci ( $dC^{DOx}TP$ ,  $dA^{2F}TP$ ) v dostačujícím množství pro následné enzymové studie.
- Byla úspěšně exprimována termostabilní KOD(exo-) DNA polymerasa z transformovaných buněk *E. coli* BL21 – AI.
- Metodou PEX byly syntetizovány produkty přirozených a modifikovaných DNA o délce 19- a 31nt za využití čtyř modifikovaných dNTPs ( $dC^{DOx}TP$ ,  $Dc^{OMe}TP$ ,  $dA^F TP$ ,  $dA^{2F}TP$ ) s pěti termostabilními DNA polymerasami, z čehož čtyři z těchto DNA polymeras se ukázaly být vhodné pro účinnou syntézu plně extendovaných produktů. Zároveň došlo k inkorporaci modifikovaných  $dN^R TP$ s ( $R = OMe, DOx, F, 2F$ ) metodou PCR u třech testovaných termostabilních DNA polymeras.
- Byla stanovena molekulová hmotnost přirozené a modifikované DNA o délce 19- a 31nt. Metodou cirkulárního dichroismu bylo potvrzeno, že modifikace nemají vliv na sekundární strukturu DNA zachovávající stále B formu. Bylo dokázáno, že přítomnost modifikací zásadním způsobem neovlivňuje teplotu denaturace DNA.

## 7. Citovaná literatura

- [1] L. Pray, „Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick,” *Nature Education*, roč. 1, č. 1, 2008.
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts a P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4. vyd., New York: Garland Science, 2002, kap. „The Structure and Function of DNA“.
- [3] D. W. Ussery, „A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid,” *Danish Technical University*, Lyngby, Denmark, 2002.
- [4] Primární struktura DNA, Komplementarita bází, dostupné z URL: <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>
- [5] S. Aryal, „Different Forms of DNA: A-form, B-form, Z-form,” *Microbe Notes*, 2022.
- [6] R. Hardison, „B-Form, A-Form, and Z-Form of DNA,” *The Pennsylvania State University*, 2021.
- [7] Formy DNA, dostupné z URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:A-DNA,\\_B-DNA\\_and\\_Z-DNA.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png)
- [8] F. Akram, F. I. Shah, R. Ibrar, T. Fatima, I. ul Haq, W. Naseem, M. A. Gul, L. Tehreem, G. Haider, *Bacterial thermophilic DNA polymerases: A focus on prominent biotechnological applications, Analytical Biochemistry*, roč. 671, 2023.
- [9] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4. vyd., „DNA Replication Mechanisms,” New York: Garland Science, 2002.
- [10] G. M. Cooper, „DNA Replication,” *The Cell: A Molecular Approach*, 2. vyd., Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
- [11] J. Fileé, P. Forterre, T. Sen-Lin a J. Laurent, „Evolution of DNA Polymerase Families: Evidences for Multiple Gene Exchange Between Cellular and Viral Proteins,” *Journal of Molecular Evolution*, roč. 54, č. 6, 2002.
- [12] A. Mandal, „DNA Polymerase Families,” *News-Medical*, 2023.
- [13] T. Koppal, „Getting to Know the DNA Polymerase Family,” *Biocompare*, 2021.
- [14] BBC Bitesize, „DNA replication,” *BBC Bitesize*, 2024.

- [15] New England Biolabs, „What does exonuclease activity mean for a DNA polymerase?“, *NEB*, 2023.
- [16] N. V. Bhagavan a C.-E. Ha, „DNA Replication, Repair, and Mutagenesis,“ *Essentials of Medical Biochemistry* (2. vyd.), San Diego: Academic Press, 2011
- [17] H. Hoshino, Y. Kasahara, H. Fujita, M. Kuwahara, K. Morihira, S. Tsunoda a S. Obika, „Consecutive incorporation of functionalized nucleotides with amphiphilic side chains by novel KOD polymerase mutant,“ *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, roč. 26, č. 2, 2016.
- [18] H. Mizuguchi, M. Nakatsuji, S. Fujiwara, M. Takagi a T. Imanaka, „Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase,“ *Journal of Biochemistry*, roč. 126, č. 4, 1999
- [19] K. A. Nichols, „KOD DNA polymerase: a custom fit for emergent technology-driven applications,“ *Dx Dialogue*, 2021.
- [20] Novagen, KOD XL DNA polymerase User protokol, EMD Chemicals, Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2011.
- [21] N. F. Cariello, J. A. Swenberg, a T. R. Skopek, „Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis,“ *Nucleic Acids Research*, roč. 19, č. 15, 1991.
- [22] New England Biolabs, Vent DNA polymerase User protokol, *New England Biolabs*, 2025.
- [23] M. Behlke, „DNA Synthesis: Chemical, Enzymatic, or Both?“, *BioProcess International*, 2023.
- [24] P. Ménová, J. Daňová a M. Hocek, „Jak syntetizovat umělé DNA, navíc s modifikovanými bázemi,“ *Vesmír*, roč. 94, č. 2, s. 90–91, 2015.
- [25] M. Ondruš, V. Sýkorová, L. Bednářová, R. Pohl a M. Hocek, „Enzymatic synthesis of hypermodified DNA polymers for sequence-specific display of four different hydrophobic groups,“ *Nucleic Acids Research*, roč. 48, č. 21, 2020.
- [26] M. Hocek, „Příprava DNA s modifikovanými bázemi enzymatickou syntézou,“ *Chemické listy*, roč. 108, č. 4, 2014.
- [27] R. A. Kondratas, „History of the Polymerase Chain Reaction Videohistory Collection,“ *Smithsonian Institution Archives*, 1992–1993.

- [28] Roche Diagnostics, „Historie PCR,” *Roche Diagnostics*, 2023.
- [29] K. Kadri, „Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications,” in *Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science*, M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Baltă a S. Enany, Eds., London: IntechOpen, 2019.
- [30] N. Khehra, I. S. Padda a C. J. Swift, „Polymerase Chain Reaction (PCR),” *StatPearls*, 2025.
- [31] R. Amils, „Taq Polymerase,” in *Encyclopedia of Astrobiology*, M. Gargaud, R. Amils, J. Cernicharo, H. J. Cleaves II, W. M. Irvine, D. L. Pinti a M. Viso, Eds., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.
- [32] J. Redig, „Just What Do All These Additives Do?,” *Bitesize Bio*, 2021.
- [33] Gene Link, „PCR Additives & Enhancers,” *Gene Link*, n.d., 2014.
- [34] M. Yoshikawa, T. Kato a T. Takenishi, „A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides,” *Tetrahedron Letters*, roč. 8, č. 50, 1967.
- [35] M. Ondruš, „Approaches to the enzymatic synthesis of hypermodified DNA polymers,” disertační práce, *Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*, 2023.
- [36] P. Ménová, H. Cahová, M. Vrábel a M. Hocek, „Synthesis of Base-Modified dNTPs Through Cross-Coupling Reactions and Their Polymerase Incorporation to DNA,” *Methods in Molecular Biology*, roč. 1973, 2019.
- [37] M. Hocek, „Synthesis of Base-Modified 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphates and Their Use in Enzymatic Synthesis of Modified DNA for Applications in Bioanalysis and Chemical Biology,” *The Journal of Organic Chemistry*, roč. 79, 2014.
- [38] H. Macíčková-Cahová a M. Hocek, „Cleavage of adenine-modified functionalized DNA by type II restriction endonucleases,” *Nucleic Acids Research*, roč. 37, č. 22, 2009.
- [39] M. Hocek a P. Silhár, „Palladium-catalyzed cross-coupling reactions in C6 modifications of purine nucleosides,” *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2007.
- [40] L. Jedinák, R. Zátopková, H. Zemánková, A. Šustková a P. Cankař, „The Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction of Halogenated Aminopyrazoles: Method Development, Scope, and Mechanism of Dehalogenation Side Reaction,” *The Journal of Organic Chemistry*, roč. 82, č. 1, 2017.

- [41] N. Li, R. K. Lim, S. Edwardraja a Q. Lin, „Copper-free Sonogashira cross-coupling for functionalization of alkyne-encoded proteins in aqueous medium and in bacterial cells,” *Journal of the American Chemical Society*, roč. 133, č. 39, 2011.
- [42] L. Moore, T. Le a G. Fan, „DNA Methylation and Its Basic Function,” *Neuropsychopharmacology*, roč. 38, 2013.
- [43] M. C. Owens, C. Zhang a K. F. Liu, „Recent technical advances in the study of nucleic acid modifications,” *Molecular Cell*, roč. 81, č. 20, 2021.
- [44] Biomers.net, „Phosphorylation – Various Modifications,” *biomers.net*.
- [45] M. Louie, C. Hogan, A. Hurley, V. Simona, C. Chung, N. Padte, P. Lamy, J. Flaherty, D. Coakley, M. Di Mascio, A. S. Perelson a M. Markowitz, „Determining the antiviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naive chronically HIV-1-infected individuals,” *AIDS*, roč. 17, č. 8, 2003.
- [46] M. E. Dueñas a M. Trost, „MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century,” *Biochemical Journal*, roč. 44, č. 5, 2022.
- [47] J. Hummel, S. Segu, Y. Li, S. Irgang, J. Jueppner a P. Giavalisco, „Ultra performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry for the analysis of plant lipids,” *Frontiers in Plant Science*, roč. 2, 2011.
- [48] A. Marchand, F. Rosu, R. Zenobi a V. Gabelica, „Thermal Denaturation of DNA G-Quadruplexes and Their Complexes with Ligands: Thermodynamic Analysis of the Multiple States Revealed by Mass Spectrometry,” *Journal of the American Chemical Society*, roč. 140, č. 39, 2018.
- [49] A. J. Miles, R. W. Janes a B. A. Wallace, „Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review,” *Chemical Society Reviews*, roč. 50, č. 15, 2021.
- [50] J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renciuik a M. Vorlíčková, „Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA,” *Nucleic Acids Research*, roč. 37, č. 6, 2009.
- [51] Y. Tor, K. Gehring, D. Fabris, M. Egli, A. A. Korostelev, T. D. Craggs, A. Pyne, K. T. Gagnon, J. K. Watts, T. E. Cheatham III a N. G. J. Richards, „Nucleic Acids in Chemistry and Biology,” *Royal Society of Chemistry*, 4. vyd., 2022.
- [52] American Society for Microbiology, „FAQ: E. Coli: Good, Bad, & Deadly: ‘What is true for E. coli is true for the elephant’,” *American Society for Microbiology*, Washington (DC), 2011.

- [53] Thermo Fisher Scientific, „One Shot™ BL21(AI) Chemically Competent *E. coli* – User Manual,” *Thermo Fisher Scientific*, 2025.
- [54] N. Bhawsinghka, K. F. Glenn a R. M. Schaaper, „Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BL21-AI,” *Microbiology Resource Announcements*, roč. 9, 2020.
- [55] VectorBuilder, „pBAD Bacterial Recombinant Protein Expression Vector,” *VectorBuilder*, 2025.
- [56] F. W. Studier, „Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures,” *Protein Expression and Purification*, roč. 41, č. 1, 2005.
- [57] Struktura 6-karboxyfluoresceinu dostupná z URL:  
<https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/6-fam/>
- [58] Struktura Cy5 dostupná z URL: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/cy5/>
- [59] P. Čapek, H. Cahová, R. Pohl, M. Hocek, C. Gloeckner a A. Marx, „An Efficient Method for the Construction of Functionalized DNA Bearing Amino Acid Groups through Cross-Coupling Reactions of Nucleoside Triphosphates Followed by Primer Extension or PCR,” *Chem. Eur. J.*, roč. 13, 2007.
- [60] L. Krásný, R.L. Gourse, „An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation“ *EMBO J.*, 2004
- [61] Stuktura GelRed dostupná z URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/GelRed>
- [62] N. Berova, P. L. Polavarapu, K. Nakanishi a R. W. Woody, „Comprehensive Chiroptical Spectroscopy: Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules,” *John Wiley & Sons, Inc.*, 2012.
- [63] H. Hashimoto, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue a Y. Kai, „Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1,” *Journal of Molecular Biology*, roč. 306, č. 3, 2001.