

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Klára Viktorinová

**Enzymová syntéza a studium vlastností DNA
modifikovaných na bázích**

Enzymatic synthesis and study of the properties of base-modified
DNA

Bakalářská práce

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

Praha, 2023

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

V Praze dne

.....

Abstrakt

Vliv a specifické interakce chemických modifikací ve velkém žlábků DNA jsou dlouhodobě a systematicky zkoumány. Tato práce se zabývá enzymovou přípravou DNA nesoucí fenylové substituenty na bázích v miligramovém množství. K této syntéze jsou potřeba čtyři 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí elektronově bohatou fenylovou skupinu v pozici 7 u 7-deazapurinů a v pozici 5 u pyrimidinů (**dA^{Ph}TP**, **dG^{Ph}TP**, **dC^{Ph}TP**, **dU^{Ph}TP**), které byly připraveny ve skupině prof. Hocka. Pro uskutečnění enzymové syntézy byla použita DNA polymerasa KOD(exo-), která byla pro účely této práce exprimována.

Všechny čtyři modifikované 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí fenylovou skupinu byly úspěšně inkorporovány do oligonukleotidového řetězce metodou extenze primeru a DNA byla syntetizována v miligramovém měřítku. Jednotlivé produkty byly čištěny pomocí dialýzy a HPLC. Dále byla sledována jejich teplota denaturace na UV-Vis spektrofotometru a jejich struktura spektroskopickou metodou CD. Hlavním cílem těchto a budoucích studií je zejména pochopení různých biologických procesů a bioortogonálních reakcí makromolekul.

Klíčová slova

DNA, modifikace, oligonukleotidy, polymerasy, PEX, PCR, strukturní analýza, CD

Abstract

The influence and specific interactions of chemical modifications in the DNA major groove have been systematically investigated for a long time. This work focuses on the enzymatic preparation of DNA bearing phenyl substituents on bases in milligram scale. For this synthesis, four 2'-deoxyribonucleoside triphosphates bearing an electron-rich phenyl group at position 7 of 7-deazapurines and at position 5 of pyrimidines (**dA^{Ph}TP**, **dG^{Ph}TP**, **dC^{Ph}TP**, **dU^{Ph}TP**) were prepared in prof. Hocek's group. The DNA polymerase KOD(exo-), which was expressed for the purpose of this work, was used to carry out the enzymatic synthesis.

All four phenyl-modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates were successfully incorporated into the oligonucleotide chain using the primer extension and the DNA was synthesized in a milligram scale. The individual products were purified by dialysis and HPLC and their denaturation temperature was further monitored on UV-Vis spectrophotometer and their structure by spectroscopic method CD. The main objective of this and further extensive studies is mainly to understand the various biological processes and bioorthogonal reactions of macromolecules.

[IN CZECH]

Key words

DNA, modifications, oligonucleotides, polymerases, PEX, PCR, structural analysis, CD

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala Ing. Veronice Sýkorové, Ph.D. za její nekonečnou trpělivost a podporu v laboratoři i mimo ni. Dále bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Michalu Hockovi, Ph.D., DSc. za možnost vypracovat práci v jeho výzkumné skupině a za jeho čas a cenné rady. Mé poděkování patří RNDr. Lucii Bednárové, CSc., za interpretaci CD spekter a celému oddělení hmotnostní spektrometrie za měření hmotnostních spekter. Nakonec bych ráda poděkovala členům skupiny prof. Hocka za vytvoření příjemného pracovního prostředí a své rodině a přátelům za podporu při studiu.

Obsah

1. Teoretická část	13
1.1. Struktura a vlastnosti DNA	13
1.2. Syntéza DNA.....	15
1.2.1. Chemická syntéza DNA	15
1.2.2. Enzymová syntéza DNA	16
1.2.2.1. Metoda extenze primeru	17
1.2.2.2. Polymerasová řetězová reakce.....	18
1.3. DNA polymerasy.....	20
1.3.1. KOD DNA polymerasa	21
1.4. 2'-Deoxyribonukleosid trifosfáty modifikované na bázích.....	22
1.4.1. 2'-Deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí fenylovou skupinu na bázích	23
1.5. Studium vlastností DNA pomocí spektroskopické metody cirkulárního dichroismu	23
1.6. Buněčná linie <i>Escherichia coli</i> BL21-AI	24
2. Cíle práce	25
3. Materiál a metody	26
3.1. Materiál	26
3.1.1. Buněčná linie.....	26
3.1.2. Nukleotidy a oligonukleotidy	26
3.1.3. Roztoky	26
3.1.4. Chemikálie	27
3.1.5. Přístroje a purifikační kolony	29
3.2. Metody	30
3.2.1. Exprese KOD(exo-) DNA polymerasy.....	30
3.2.1.1. Kultivace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> BL21-AI.....	30
3.2.1.2. Lýza buněk <i>Escherichia coli</i>	30
3.2.1.3. Izolace KOD(exo-) DNA polymerasy afinitní chromatografií.....	31
3.2.1.4. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného	31
3.2.1.5. Finální purifikace a měření koncentrace KOD(exo-) DNA polymerasy	31
3.2.2. Inkorporace nukleotidů nesoucích fenylovou skupinu do DNA metodou extenze primeru	32
3.2.3. Analýza DNA polyakrylamidovou denaturační elektroforézou	34
3.2.4. Analýza DNA polyakrylamidovou nativní elektroforézou	34
3.2.5. Dialýza vzorků DNA.....	34
3.2.6. Purifikace vysokotlakou kapalinovou chromatografií.....	35

3.2.7. Polymerasová řetězová reakce a následná elektroforéza v agarosovém gelu .	35
3.2.8. Určování molekulové hmotnosti DNA metodou MALDI-TOF.....	37
3.2.9. Určování koncentrace a teploty denaturace připravených oligonukleotidů	37
3.2.10. Určování struktury DNA metodou cirkulárního dichroismu	38
4. Výsledky	39
4.1. Exprese a následná purifikace KOD(exo-) DNA polymerasy	39
4.2. Studium aktivity exprimované KOD(exo-) DNA polymerasy při enzymové syntéze DNA	40
4.2.1. Srovnání aktivity KOD(exo-) DNA polymerasy s aktivitou Vent(exo-) DNA polymerasy užitím metody extenze primeru v semi-preparativním měřítku.	41
4.2.2. Inkorporace nukleotidů nesoucích fenylovou skupinu do oligonukleotidového řetězce metodou extenze primeru	42
4.2.3. Polymerasová řetězová reakce s využitím KOD(exo-) DNA polymerasy ...	44
4.3. Syntéza DNA metodou extenze primeru v preparativním měřítku.....	45
4.3.1. Syntéza DNA metodou extenze primeru ve 162nmol měřítku.....	46
4.3.2. Syntéza DNA metodou extenze primeru v 324nmol měřítku.....	47
4.4. Analýza DNA po provedení purifikace vysokotlakou kapalinovou chromatografií	49
4.4.1. Analýza DNA polyakrylamidovou denaturační elektroforézou.....	49
4.4.2. Analýza DNA polyakrylamidovou nativní elektroforézou	50
4.5. Výpočet koncentrace a měření teploty denaturace DNA	52
4.6. Studium struktury modifikované DNA pomocí cirkulárního dichroismu.....	54
5. Diskuze	56
6. Závěr	58
7. Použitá literatura	59

Seznam zkratek

°C	stupně celsia
6-FAM	6-karboxyfluorescein
APS	persíran amonný
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CD	cirkulární dichroismus
Cy5	cyanin 5
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleosid trifosfát/y
dN ^{Ph} TP	2'-deoxyribonukleosid trifosfát/y nesoucí fenylovou skupinu na bázi
dPAGE	denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza
dsDNA	dvouvláknová DNA
DTT	1,4-dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
exo-	bez exonukleasové aktivity
For	přímý (z angl. forward)
FT	průtok (z angl. flow-through)
g	gravitační zrychlení
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
K _m	Michaelisova konstanta
KOD	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>
LB	Luria Broth
M	molekulová hmotnost [Da]

min	minuta
MALDI-TOF	laserová ionizace za přítomnosti matrice s detektorem doby letu
NIC	buněčná kultura před zahájením exprese proteinu (z angl. non-induced cells)
NMR	nukleární magnetická resonance
nt	nukleotid
OD ₆₀₀	optická denzita měřená při 600 nm
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerasová řetězová reakce
PEX	extenze primeru
Rev	reverzní (z angl. reverse)
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	rotace za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
ssDNA	jednovláknová DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEAB	hydrogenuhličitan triethylamonný
TBE	tris-borát-EDTA
TCP	buněčná kultura s exprimovaným proteinem (z angl. total cell protein)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylen-1,2-diamin
T _m	teplota denaturace
TMAC	tetramethylamoniumchlorid
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Vis	ultrafialovo-viditelná oblast elektromagnetického záření
Vent	<i>Thermococcus litoralis</i>
V _{max}	maximální rychlost
ε ₄₉₅	molární absorpční koeficient při vlnové délce 495 nm [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]

Úvod

DNA modifikovaná na bázích je v posledních letech předmětem mnoha studií, které slouží k bližšímu pochopení biologických procesů. Významnými DNA sekvencemi, které využívají modifikace, jsou například takzvané aptamery. Tyto sekvence mají schopnost se vázat na cílové molekuly a mají proto velký potenciál v objevování nových terapeutických látek.

Modifikované DNA oligonukleotidy jsou připravovány chemicky nebo enzymově. Využití chemické syntézy je v současné době limitováno vysokými náklady a často vyžaduje hlubší technické zkušenosti. Klasickou enzymovou syntézou lze běžně připravit piko- či nanomolární množství DNA, které je ovšem nedostačující pro rozsáhlejší a ucelenější strukturní studie, zahrnující např. vliv modifikací na konformační změny nebo strukturní rozdíly. K celkovému určení vlastností modifikovaných oligonukleotidů pak může být použita celá škála spektroskopických a spektrometrických měření (NMR, CD, UV-Vis, MALDI-TOF), krystalografie nebo molekulové modelování.

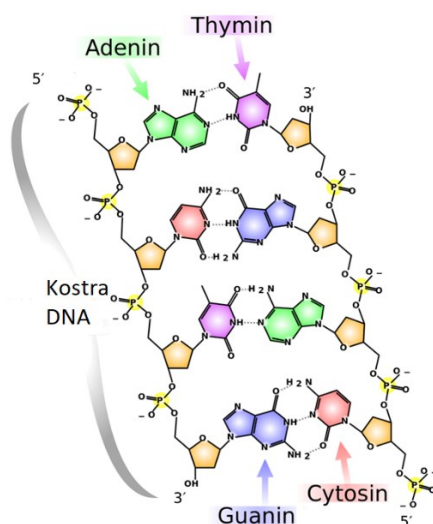
Cílem této práce je příprava miligramových množství modifikované DNA pro studium vlastností a struktury modifikované DNA. Pro experimenty byla vybrána fenylová modifikace, která má hydrofobní charakter a vysokou elektronovou hustotu. Z tohoto důvodu je fenylová modifikace vhodná pro studium vlivu modifikací na konformační změny, teplotu denaturace dvoušroubovice a pro další podrobnější popis 3D struktury takto modifikované DNA.

1. Teoretická část

1.1. Struktura a vlastnosti DNA

Nukleové kyseliny byly poprvé izolovány v roce 1869 z jadra leukocytů [1]. Jsou lineárními polymery nukleotidů, které obsahují buď ribosové zbytky ve formě ribonukleové kyseliny (RNA) nebo deoxyribosové zbytky ve formě deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Jsou nositelkou genetické informace, což z nich dělá jedny z nejdůležitějších molekul na Zemi [2]. Struktura DNA byla poprvé popsána J. D. Watsonem a F. H. C. Crickem v roce 1953 [3]. Watson a Crick interpretovali rentgenové snímky pořízené R. Franklin a M. Wilkinsem a zjistili, že DNA je tvořena dvěma vlákny, která mají dvoušroubovicovou helikální strukturu [4].

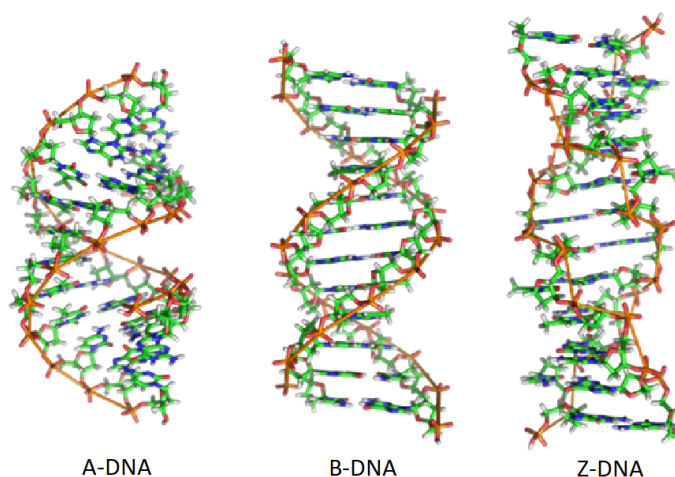
Vlákná DNA jsou držena pohromadě pomocí vodíkových vazeb mezi bázemi na jednotlivých řetězcích. Párována je vždy jedna pyrimidinová báze s jednou purinovou bází. Na základě množství jednotlivých bází v DNA bylo zjištěno, že adenin je párován s thyminem a guanin s cytosinem. Kostra jednotlivých vláken je tvořena fosfátem a cukrem 2'-deoxyribosou [3]. Jednotlivé nukleotidy se skládají z 2'-deoxyribosy, která je na svém prvním atomu uhlíku vázána N-glykosidickou vazbou na dusíkatou bázi. 3' nebo 5' pozice 2'-deoxyribosy je esterifikována na fosfátovou skupinu (viz obrázek 1). Nukleosidy jsou tvořeny pouze 2'-deoxyribosou a dusíkatou bází. Oproti nukleotidům tedy postrádají fosfátovou skupinu [2].



Obrázek 1: Struktura DNA, převzato a upraveno z [5]. Na obrázku je zobrazena část dvoušroubovice DNA. Kostra je tvořena 2'-deoxyribosou a fosfátem, jednotlivá vlákna jsou propojena vodíkovými můstky mezi dusíkatými bázemi.

DNA se vyskytuje ve třech hlavních formách (viz obrázek 2) [6]. První forma, A-DNA, je široká, pravotočivá dvoušroubovice a báze má ostře nakloněné k ose helixu. Dvoušroubovice tvoří velký a malý žlábek, ale malý žlábek je velmi mělký. Obvykle se vyskytuje v prostředí s nižším obsahem vody. Nejčastěji se vyskytující formou je B-DNA. Tato forma je také pravotočivá, ale oproti A-DNA je užší a protáhlejší. Báze jsou umístěny kolmo k helixu, což je důležité pro rozpoznávání DNA enzymy a proteiny. Velký žlábek je oproti malému žlábku širší, ale oba mají srovnatelnou hloubku. Tyto dvě formy mezi sebou mohou za určitých podmínek reverzibilně přecházet.

Poslední forma, Z-DNA, je levotočivá. Malý žlábek je úzký a hluboký, oproti tomu velký žlábek je nepatrný. Většinou je tvořena úseky s opakujícími se sekvencemi, ve kterých se střídají nukleotidy s purinovými a pyridinovými bázemi. Vyskytuje se zejména v prostředí s vysokým obsahem solí. Krátké úseky Z-DNA se mohou vyskytovat v organismech a regulovat expresi [7].



Obrázek 2: *Formy DNA, převzato a upraveno z [8]. Vlevo je zobrazená pravotočivá forma A, uprostřed pravotočivá forma B a vpravo levotočivá forma Z.*

Obě vlákna DNA jsou komplementární, což znamená, že sekvence jednoho vlákna implikuje sekvenci toho druhého. DNA se replikuje semikonzervativně. Replikace DNA je enzymově řízený proces, kdy každé vlákno DNA slouží jako templát pro vytvoření nového komplementárního vlákna. Nové vlákno DNA vzniká vždy ve směru 5' → 3' [2].

1.2. Syntéza DNA

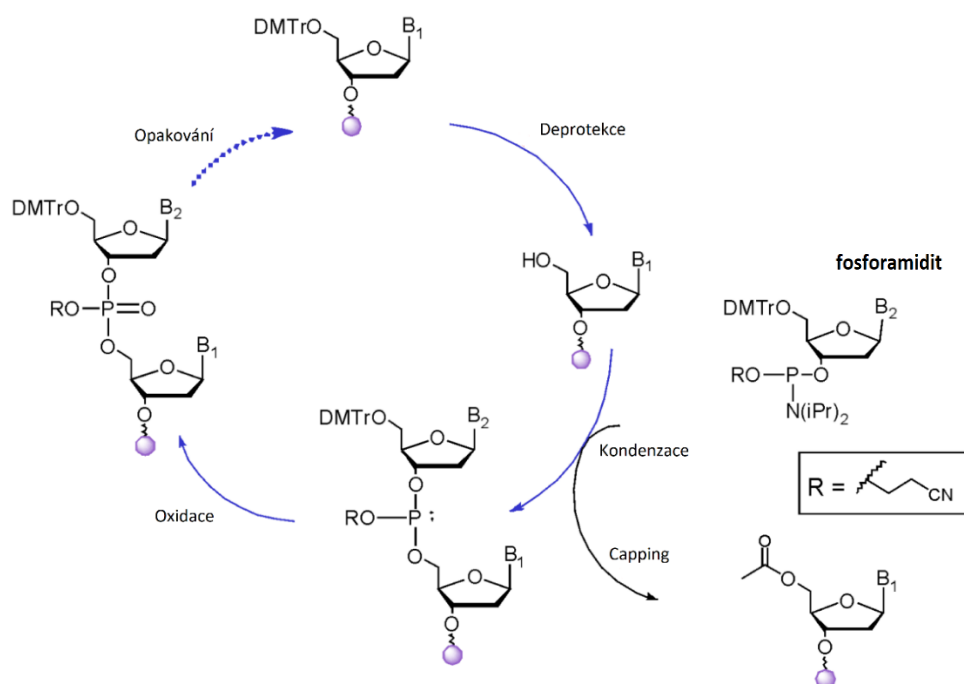
V současné době se využívají dva způsoby syntézy DNA, chemická a enzymová syntéza. Chemická syntéza je vhodná pro přípravu většího množství DNA, ale její nevýhodou je častá nekompatibilita s modifikacemi a při syntéze delších templátů i velmi nízký výtěžek.

1.2.1. Chemická syntéza DNA

Poprvé byla chemická syntéza provedena A. Toddem, který v 50. letech 20. století syntetizoval první dinukleotid [9]. Poté byla více rozvinuta v 70. letech 20. století, kdy došlo k zautomatizování a zdokonalení metod chemické syntézy, které umožnily rychlou a přesnou syntézu DNA. Mimo jiné začala být používána metoda syntézy na pevném nosiči. Příprava oligonukleotidů touto cestou může být využívána jak v malém množství pro biologický výzkum, tak ve velkém množství pro klinické studie [10].

V roce 1976 udělali Letsinger a Lunsford velký pokrok ve vývoji fosforylačních metod, který vedl ke vzniku fosforamiditové metody (viz obrázek 3, str. 16) [11]. Původně byly využívány jako meziprodukty při syntéze oligonukleotidů monoesterové dichloriditidy kyseliny fosforečné [12]. Tyto meziprodukty nahradili Beaucage a Caruthers vysoce reaktivními deoxyribonukleosidovými fosforamiditami [13].

Fosforamiditová metoda je čtyřkroková syntéza a její velkou výhodou je, že je automatizovaná. Stavebními bloky jsou nukleosidové fosforamidity s koncovým 5'-OH [14]. Zatímco podmínky a chránící skupiny stavebních bloků používané v syntéze na pevné fázi byly v průběhu let optimalizovány, chemické reakce původního čtyřkrokového cyklu zůstaly prakticky nezměněné. Fosforamiditové stavební bloky jsou obvykle připravovány podle původního protokolu Beaucageho a Caruthera použitím chlorofosforamiditů nebo fosforamiditů. Produkt musí být purifikován pomocí sloupcové chromatografie. Fosforamidity jsou skladovány v inertním prostředí v -20 °C, aby nedocházelo k jejich oxidaci a hydrolýze [15]. Syntéza fosforamiditovou metodou probíhá, na rozdíl od replikace, od 3' k 5'konci [16].



Obrázek 3: Schéma syntézy DNA fosforamiditovou metodou, převzato a upraveno z [17]. Na obrázku jsou znázorněny 4 hlavní kroky této syntézy: deprotektce, kondenzace, capping a oxidace. Při cappingu je na volnou -OH skupinu navázána acetylová skupina, aby nedocházelo k dalším nevyžádaným reakcím.

1.2.2. Enzymová syntéza DNA

DNA lze připravit i enzymově, kdy jsou pomocí DNA polymerasy jednotlivé 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP) inkorporovány do oligonukleotidového řetězce. Existují dvě hlavní metody enzymové syntézy: metoda extenze primeru (PEX) a polymerasová řetězová reakce (PCR). DNA polymerasa neumí zahájit syntézu nového řetězce, proto je při enzymové syntéze nutná přítomnost primeru. Primer je krátký úsek DNA, který má obvykle okolo patnácti nukleotidů a je komplementární k templátovému vlákně. Nový dNTP se váže na 3'-hydroxylovou koncovou skupinu primeru a dochází tak k prodlužování primeru na základě jeho komplementarity k templátovému vlákně, tedy ve směru od 5' k 3' konci [18].

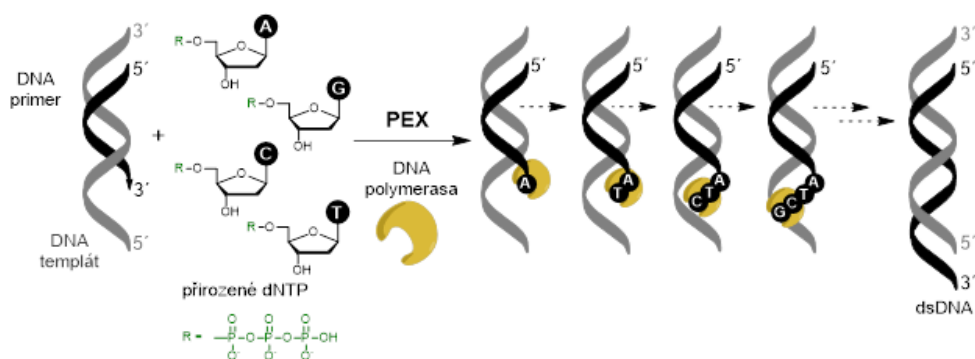
Enzymově lze syntetizovat i modifikovanou DNA. Modifikace jsou zaváděny především do polohy 5 pyrimidinových bází a do polohy 7 7-deazapurinových bází. 7-deazapuriny nahrazují z důvodu vyšší stability puriny a liší se od nich chybějícím atomem dusíku v pozici 7. Při substituci purinů v poloze 8 dochází ke sterickému bránění a modifikace v této poloze nejsou tolerovány DNA polymerasou, proto není tato substituce využívána. Naopak při substituci 7-deazapurinů v pozici 7 směřují zavedené

modifikace do velkého žlábků DNA a jsou tak dobře přístupné pro další případné reakce. Modifikace v této poloze nenarušují párování bází a současně jsou tolerovány DNA polymerasou [19]. Kromě nukleových bází může být modifikována i cukerná složka a fosfát. Fosfátové analogy mají nahrazen kyslík jinou chemickou látkou, jako je například síra. Příkladem jsou 5'-O-(2-thiotrifosfáty), které slouží ke studiu polymeras [20].

Při enzymové syntéze může ve větším měřítku docházet k netemplátové adici 2'-deoxyadenosin trifosfátu [21]. To znamená, že se kromě chtěného produktu tvoří ještě produkt o jeden nukleotid delší. Množství netemplátové adice závisí na sekvenci syntetizovaného oligonukleotidu, na relativním množství dNTP a na době trvání reakce.

1.2.2.1. Metoda extenze primeru

Nejjednodušší metodou enzymové syntézy DNA je PEX (viz obrázek 4). V této metodě je používána DNA polymerasa ke specifickému prodloužení primeru, který je komplementární k sekvenci templátu. DNA polymerasa inkorporuje 2'-deoxyribonukleotidy do řetězce na základě komplementarity. Primer musí být kvůli vizualizaci produktů značen. Může být značen fluorescenčně nebo radioaktivně. Tato metoda je využitelná i pro syntézu modifikované DNA. Pokud je některý z přirozených dNTP nahrazen modifikovaným dNTP na bázi, ponese každá tato nukleobáze v nově syntetizované části řetězce danou modifikaci. Substituován může být i více než jeden typ dNTP [22].

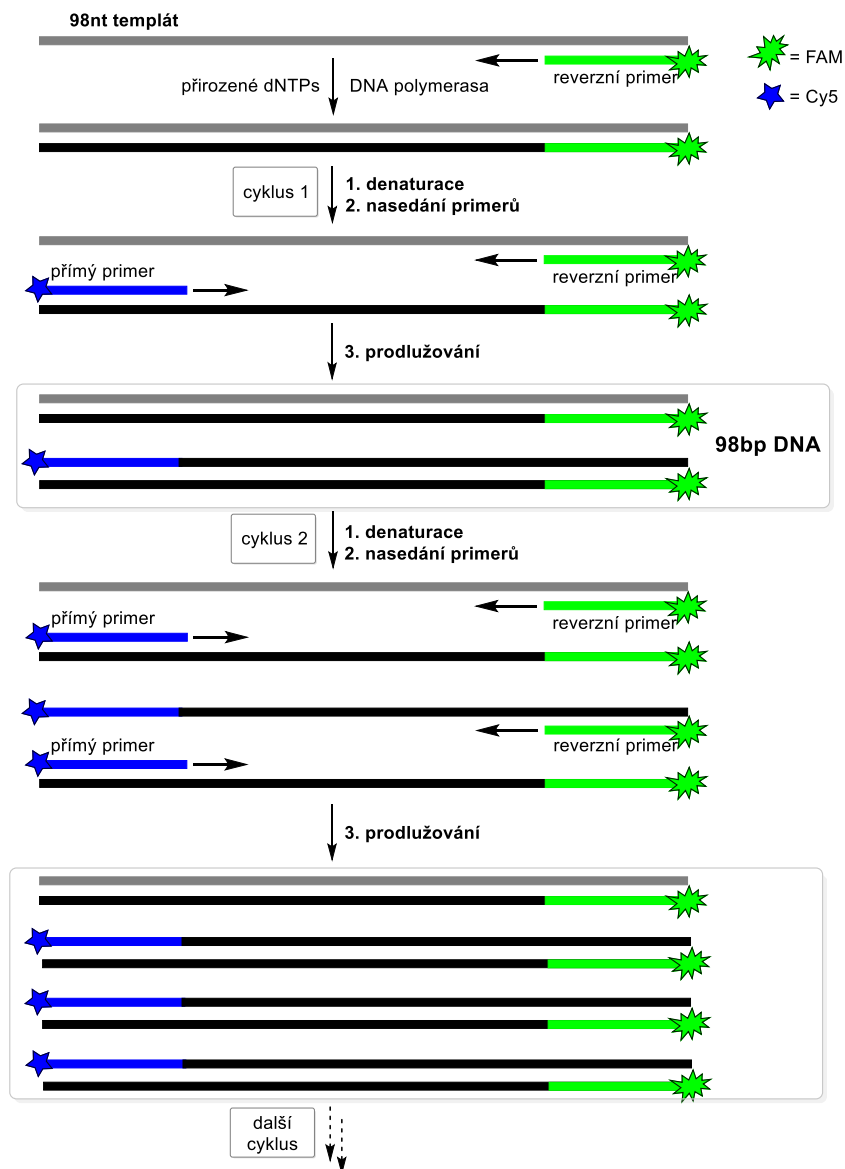


Obrázek 4: Metoda PEX s použitím přirozených dNTP. Při reakci dochází pomocí DNA polymerasy k prodloužování primeru nukleotidy na základě komplementarity k templátovému vlákně.

1.2.2.2. Polymerasová řetězová reakce

Metoda PCR byla poprvé použita K. B. Mullisem k enzymové amplifikaci specifického segmentu β -globinu a HLA-DQ α genu v lidském genomu [23]. PCR je metoda *in vitro* amplifikace, při které se zvyšuje množství cílové sekvence exponenciálně [24]. Umožňuje tak analyzovat i malé množství DNA. PCR bývá využívána k diagnostice genetických onemocnění a pro detekci patogenů, které jsou obtížně kultivovatelné. Dále se využívá například při diagnostice rakoviny, ke zjištění, které geny jsou exprimovány anebo naopak vypnuty [25].

Při metodě PCR (viz obrázek 5, str. 19) jsou dva oligonukleotidy, primery, komplementární k sekvencím na protilehlých vláknech DNA. Tyto sekvence musí ležet těsně za konci úseku, který je amplifikován [23]. Izolovaná DNA obsahující daný úsek, je krátce zahřívána, aby došlo k její denaturaci. Poté se DNA ochladí v přítomnosti velkého přebytku primerů a dochází k nasednutí primerů na templát. Následně v přítomnosti 2'-deoxyribonukleotidů a pomocí DNA polymerasy dochází k inkorporaci dNTP do každého z obou řetězců na základě komplementarity, tedy k prodlužování primerů. Tímto procesem dochází k replikaci dané sekvence. Cyklus se opakuje 25 až 30krát během několika hodin v automatizovaném procesu, čímž se úsek DNA amplifikuje [26]. Teplota nasedání primerů může výrazně ovlivnit průběh PCR. Při špatně zvolené teplotě dochází k amplifikaci nescifických DNA fragmentů. Pro tuto metodu jsou z důvodu kolísání teplot mezi jednotlivými fázemi cyklu využívány zejména termostabilní polymerasy, jako například Taq polymerasa [27].



Obrázek 5: PCR s 98nt templátem a Cy5 a 6-FAM značenými primery. Cyklus je složen ze tří základních fází: denaturace, nasedání primerů a prodlužování primerů.

Pro amplifikaci modifikované DNA se používají modifikované 2'-deoxyribonukleotidy jako substráty. Ty se začlení do DNA vlákna a toto modifikované vlákno poté slouží jako templát pro další extenzi. Taq polymerasa není kvůli svojí citlivosti na chemické modifikace pro amplifikaci modifikované DNA vhodná. Nejčastěji se pro tento proces využívají KOD polymerasy [28]. KOD polymerasa je vhodná i díky své vysoké rychlosti elongace. Může mít i exonukleasovou aktivitu, která zvyšuje přesnost PCR, na druhou stranu, při použití modifikací, může mít problém s jejich tolerancí [29].

1.3. DNA polymerasy

DNA replikace je velice důležitou funkcí nejen žijících organismů, ale i virů. Zajišťuje přenos genetické informace a integritu genomu. Tento proces se může uskutečnit díky DNA polymerasám, které jsou klíčovými enzymy replikace DNA i dalších opravných procesů DNA [30]. Ačkoliv mají všechny DNA polymerasy podobnou strukturu aktivního místa a podobný chemický mechanismus působení, mohou se lišit například velikostí aktivního místa, flexibilitou nebo přítomností proteinových subdomén. Tyto detaily od sebe odlišují jednotlivé polymerasy a udávají jim specifické vlastnosti a funkce [31].

DNA polymerasy jsou důležité pro tvorbu nových vláken DNA. Jejich funkcí je inkorporace nukleosidmonofosfátů na 3' konec sekvence primeru. K této chemické reakci dochází při různých buněčných procesech. Původně byly polymerasy klasifikovány do dvou skupin dle podobnosti buď k *Escherichia coli* (*E. coli*) Pol I anebo k lidské Pol α [32]. Nyní třídíme savčí polymerasy dle homologie sekvencí do čtyř skupin: A, B, X a Y. DNA polymerasy skupiny A se obvykle účastní replikace mitochondriální DNA a polymerasy skupiny B replikace genomové DNA. Polymerasy patřící do rodiny X mohou zajišťovat opravy DNA a polymerasy skupiny Y spouštějí buněčné procesy, které reagují na chybu v replikaci. Polymerasy podobné *E. coli* Pol I se nyní také dělí do čtyř skupin: Pol I, Pol II, Pol III a Pol β [33].

První detailní informace o polymerasové aktivitě jsou dostupné od poloviny 80. let, díky strukturním studiím DNA polymerasy I z bakterie *E. coli*. Krystalová struktura umožnila zkoumání funkcí a vlastností polymerasy. DNA polymerasa I má dvě hlavní funkce, opravu poškozené duplexní DNA a zpracování Okazakiho fragmentů. Tato monomerní biomolekula má kromě polymerasové aktivity i 3'→5' a 5'→3' exonukleasovou aktivitu, takže může mimo jiné i odstraňovat nukleotidy z řetězce DNA [34].

Exonukleasová aktivita patří mezi důležité funkce DNA. 3'→5' Exonukleasová aktivita je důležitá pro kontrolu správnosti sekvence syntetizovaného vlákna. Tyto exonukleasy hydrolyzují jednovláknové i dvouvláknové DNA, avšak exonukleasová aktivita na dvouvláknové DNA je inhibována přítomností dNTP, které naopak stimulují polymerizaci. 5'→3' Exonukleasy umožňují prodloužení DNA na 3' konci vystřížením části DNA, která brání DNA polymerase v prodlužování řetězce. Mohou také odstraňovat krátké úseky RNA z Okazakiho fragmentů [32].

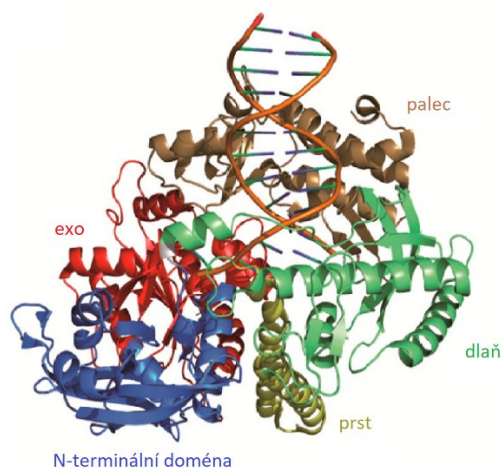
1.3.1. KOD DNA polymerasa

KOD DNA polymerasa má několik možných variant. Často využívané jsou KOD(exo-) DNA polymerasa (viz obrázek 6, str. 22), která postrádá 3'→5' exonukleasovou aktivitu a KOD XL, neboli KOD *Dash*, která představuje mix KOD polymerasy a KOD(exo-) polymerasy [35]. Patří do rodiny archeálních B DNA polymeras a je izolována z termofilního organismu *Thermococcus kodakarensis*. Polymerasy této skupiny dokáží, na rozdíl od A DNA polymeras, inkorporovat C5-modifikované pyrimidiny a C7-modifikované 7-deazapuriny, popřípadě nukleotidy modifikované na 2' deoxyribose, do oligonukleotidového řetězce. Pro PCR se často využívá Taq polymerasa, která se řadí do A DNA polymeras. KOD DNA polymerasa je oproti Taq polymerase termostabilnější a umožňuje rychlejší extenzi a přesnost inkorporace modifikovaných nukleotidů [36].

Studie struktury ukázaly, že KOD DNA polymerasa má oproti A DNA polymerasám větší objem kanálu v blízkosti aktivního místa, tudíž poskytuje více prostoru pro modifikace. KOD DNA polymerasa udržuje DNA po celou dobu v B formě. Má tedy širší velký žlábek, díky kterému je umožněna snazší vazba modifikovaných nukleotidů [37].

Do rodiny B DNA polymeras patří také často využívaná Vent polymerasa. Obě tyto polymerasy, Vent i KOD, existují i ve variantě bez 3'→5' exonukleasové aktivity. U Vent polymerasy je známo, že varianta bez exonukleasové aktivity je pro syntézu modifikované DNA pomocí metody PCR vhodnější. U KOD polymerasy není u syntézy DNA metodou PCR variantami KOD a KOD(exo-) v inkorporaci modifikovaných nukleotidů žádný signifikantní rozdíl [38]. Při porovnávání reakční kinetiky KOD mutantů s Vent(exo-) polymerasou bylo zjištěno, že KOD polymerasa poskytuje větší V_{max} a K_m v případě bazických analogů a menší V_{max} a K_m v případě chybné inkorporace ve srovnání s Vent(exo-) polymerasou [39]. Tato katalytická vlastnost je využitelná pro enzymovou produkci umělých nukleových kyselin.

Pro inkorporaci modifikovaných nukleotidů se často využívá komerčně dostupná Terminator DNA polymerasa bez exonukleasové aktivity, která má s KOD polymerasou velkou podobnost v sekvenci i ve struktuře. Při porovnání této polymerasy s KOD(exo-) polymerasou bylo zjištěno, že KOD(exo-) polymerasa má lepší účinnost, inkorporuje modifikované nukleotidy přesněji a nedochází k vícenásobné misinkorporaci [36].



Obrázek 6: Struktura KOD(exo-) DNA polymerasy, převzato a upraveno z [40]. Polymerasa je tvořena několika strukturálními částmi: N-terminální doménou, prstem, dlaní, palcem a doménou pro chybějící exonukleasovou aktivitu.

1.4. 2'-Deoxyribonukleosid trifosfáty modifikované na bázích

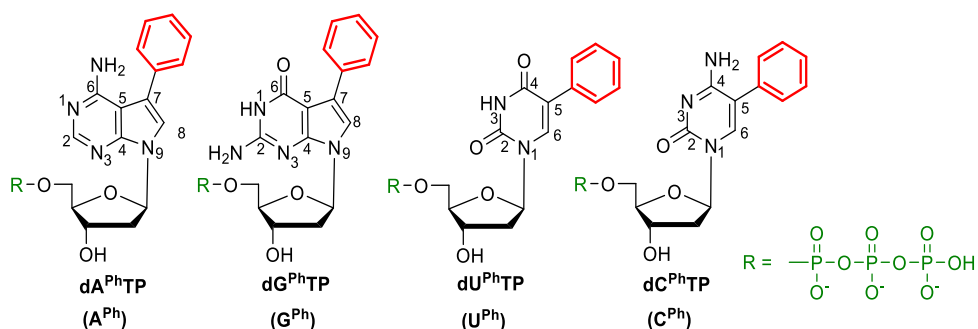
DNA modifikovaná na bázích je v posledních letech předmětem mnoha výzkumů. Modifikované báze mají potenciální využití ve farmaceutickém průmyslu. Často studované jsou C5-modifikované cytosinové báze, které mohou v savcích genomech tvořit epigenetickou informaci a regulovat tak genovou expresi. Methylace cytosinu vede k umlčení genů a regulaci transkripce na úrovni DNA [41].

Modifikované thyminové báze se vyskytují v genomech bakteriofágů a obvykle obsahují velké skupiny připojené na C5 thyminu. Také mohou hrát roli v regulaci v genomu eukaryot. Modifikace guaninu jsou často spojovány s poškozením DNA, jako například oxidace [42], nitrace [43] nebo alkylace [44]. Modifikovaný adenin se může vyskytovat v genomech fágů i vyšších organismů. Je zodpovědný za regulaci replikace, organizaci nukleoidu a chromosomovou segregaci [45].

Nejužívanější metodou, která se používá pro detekci a kvantifikaci modifikovaných nukleotidů, je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro mapování modifikovaných bází v genomech a pro určení jejich biologické role se používají technologie DNA sekvenování [45].

1.4.1. 2'-Deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí fenylovou skupinu na bázích

Fenylová modifikace (viz obrázek 7) je pro syntézu modifikované DNA v miligramovém množství a následné použití pro studium vlivu modifikací na strukturu DNA vhodná hned z několika důvodů. Prvním důvodem je elektronová hustota fenylové skupiny a přítomnost aromatického jádra, které umožňuje studium π - π interakcí s okolními skupinami [46]. Mezi další důvody se řadí hydrofobní charakter a optimální velikost skupiny, které mohou také ovlivňovat vlastnosti a strukturu DNA.



Obrázek 7: dNTP nesoucí fenylovou skupinu na bázi. Vlevo jsou zobrazeny dva nukleotidy nesoucí 7-deazapurinové báze modifikované fenylem v pozici 7 (**dA^{Ph}TP** [47] a **dG^{Ph}TP** [48]) a vpravo dva nukleotidy nesoucí pyrimidinové báze modifikované fenylem v pozici 5 (**dU^{Ph}TP** a **dC^{Ph}TP**) [49].

1.5. Studium vlastností DNA pomocí spektroskopické metody cirkulárního dichroismu

Cirkulární dichroismus (CD) studuje konformace biomolekul na základě rozdílu v absorpci levotočivého a pravotočivého kruhově polarizovaného světla. Tato metoda umožňuje především studovat konformační změny biomolekul v různých podmínkách [50].

Rozdíl v absorpci levotočivého a pravotočivého kruhově polarizovaného světla způsobují chirální sloučeniny. Pyrimidinové a purinové báze jsou samy o sobě achirální, planární a opticky neaktivní heterocykly a proto netvoří signál. Ve formě nukleotidů už však dusíkaté báze v důsledku tvorby glykosidické vazby mezi dusíkatou bází a 2'-deoxyribosou chirální jsou. Díky chiralitě dusíkatých bází existuje pro každou formu DNA jiné spektrum. CD se proto používá především pro určení konformace DNA [51].

1.6. Buněčná linie *Escherichia coli* BL21-AI

E. coli je univerzální bakteriální druh, který má neškodné komenzální varianty i různé patogenní varianty, které mohou způsobovat především střevní onemocnění člověka a dalších zvířecích hostitelů. Tato bakterie je také velmi vhodným modelovým organismem pro studium bakteriální evoluce a adaptace na rozdílné podmínky a niky. Díky mutacím je genom velmi variabilní a umožňuje konkurenceschopnost [52].

E. coli typu B bývá díky absenci některých proteas často využívána pro indukovanou expresi rekombinantních proteinů. Nejčastěji se pro expresi používají kmeny BL21 a BL21(DE3). Od kmene BL21 je odvozen speciální kmen BL21-AI, který může být oproti dvěma zmiňovaným využíván i pro expresi toxických proteinů [53]. U tohoto kmene je exprese proteinů řízena chromosomálně kódovanou bakteriofágovou T7 RNA polymerasou [54], která je regulována promotorem PBAD indukovaným arabinosou. Indukce genu T7 RNA polymerasy je nejčastěji zprostředkována isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG). Exprese T7 RNA polymerasy však může být potlačena přidáním 1% roztoku glukosy, který snižuje hladinu cAMP [55]. Tím je narušena signalizace v buňce a snížena bazální exprese, což zlepšuje schopnost buněk udržet plasmid [56].

2. Cíle práce

- Expres KOD(exo-) DNA polymerasy z buněk *E. coli* BL21-AI
- Studium aktivity KOD(exo-) DNA polymerasy při enzymové syntéze DNA metodami PEX a PCR
- Syntéza DNA modifikované na bázích v miligramovém měřítku pomocí metody PEX
- Studium vlivu fenylové modifikace na teplotu denaturace dvoušroubovice DNA
- Studium struktury DNA modifikované na bázích pomocí CD

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Buněčná linie

BL21-AITM One Shot™ chemicky kompetentní *E. coli*

3.1.2. Nukleotidy a oligonukleotidy

dNTP, N = A, G, C, T, New England Biolabs

dN^{Ph}TP, N = A, G, C, U, syntetizováno ve skupině prof. Hocka

Primery: Prim14nt-5'-6-FAM, Generi Biotech

LT25TH-5'-6-FAM (reverzní), Generi Biotech

LT20-5'-Cy5 (přímý), Generi Biotech

Templáty: 18ON-1A, Generi Biotech

18ON-1G, Generi Biotech

18ON-1C, Generi Biotech

18ON-1T, Generi Biotech

FVL-A, Generi Biotech

3.1.3. Roztoky

10% separační gel (30% bisakrylamid; 1M TRIS-HCl, pH = 8.8; 20% SDS; 10% APS; TEMED; H₂O)

10× reakční pufr (1,2M TRIS-base; 100mM KCl; 60mM (NH₄)₂SO₄; 15mM MgCl₂ × 6 H₂O; 1% triton-X 100; 0.01% BSA)

2× SDS loading dye (100mM TRIS-HCl; 4% SDS; 20% glycerol; 20mM DTT; 10mM EDTA; 0,1% bromfenolová modř)

2× skladovací pufr (100mM TRIS-base; 100mM KCl; 2mM DTT; 0.2mM EDTA)

5% zaostřovací gel (30% bisakrylamid; 1M TRIS-HCl, pH = 6.8; 20% SDS; 10% APS; TEMED; H₂O)

6× native loading dye (0,2% xylencyanolová modř; 0,2% bromfenolová modř; 40% sacharosa)

6× DNA gel loading dye (Thermofisher scientific)

Coomassie Blue Destaining solution (40% methanol; 10% kyselina octová)

Coomassie Blue Staining solution (0,1% Coomassie Brilliant Blue; 50% methanol; 10% kyselina octová)

Eluční pufr (20mM TRIS-base; 500mM NaCl; 10% glycerol; 500mM imidazol)

Fosfátový pufr o koncentraci 11 mM (100mM Na₂HPO₄ : 100mM NaH₂PO₄, poměr 1 : 1; 80mM KCl; pH = 7,3)

LB medium, připraveno na ÚOCHB AV ČR (1% trypton; 0,5% kvasinkový extrakt; 1% NaCl)

Lyzační pufr (20mM TRIS-base; 500mM NaCl; 10% glycerol; pH = 8.0)

Mobilní fáze pro HPLC: A (0,1M TEAB)

B (0,1M TEAB; 20% acetonitril)

C (100% acetonitril)

Pufr na horizontální elektroforézu: 0,5× TBE

Pufr na PAGE: 1× TBE

Pufr na SDS elektroforézu: 1× TRIS-glycin SDS

SDS-PAGE loading dye (4% SDS; 20% glycerol; 200mM DTT; 0,01% bromfenolová modř; 0,1M TRIS-HCl, pH 6,8)

Stop solution (95% formamid; 0,5mM EDTA; 0,025% bromfenol; 0,025% xylencyanolová modř; 0,025% SDS)

3.1.4. Chemikálie

Acetonitril, Sigma Aldrich

Agarosa, Serva

Betain, Sigma Aldrich

Bromfenol, Sigma Aldrich

BSA, Sigma Aldrich

Denaturační 25% koncentrát (Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat 25 %, akrylamid a methylenbisakrylamid v poměru 19:1, 50% močovina), Carl Roth

APS, Sigma Aldrich

Arabinosa, Sigma Aldrich

DMSO, Sigma Aldrich

DTT, Sigma Aldrich

EDTA, Sigma Aldrich

Formamid, Sigma Aldrich

Glukosa, Serva
Glycerol, Thermo Fisher Scientific
HCl, Sigma Aldrich
Imidazol, Sigma Aldrich
Isobutanol, Sigma Aldrich
IPTG, Sigma Aldrich
Kanamycin, Sigma Aldrich
KCl, Sigma Aldrich
KOD(exo-) DNA polymerasa
Ladder (směs oligonukleotidů různých délek), připraveno v laboratoři
Methanol, Sigma Aldrich
MgCl₂, Sigma Aldrich
NaCl, Sigma Aldrich
Na₂HPO₄, Sigma Aldrich
NaH₂PO₄, Sigma Aldrich
Nativní 40% koncentrát akrylamidu a polyakrylamidu v poměru 19:1, Carl Roth
(NH₄)₂SO₄, Sigma Aldrich
Octová kyselina, Sigma Aldrich
Sacharosa, Sigma Aldrich
SDS, Sigma Aldrich
Standard na SDS elektroforézu: color protein standard 10–250 kDa, New England Biolabs
TBE, připraveno na ÚOCHB AV ČR
TRIS-base, Sigma Aldrich
TRIS-glycin, Sigma Aldrich
TRIS-HCl, Sigma Aldrich
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin), Sigma Aldrich
TEAB, připraven v laboratoři
TMAC, Sigma Aldrich
Triton-X-100, Sigma Aldrich
Vent(exo-) DNA polymerasa, New England Biolabs
Xylencyanol, Sigma Aldrich

3.1.5. Přístroje a purifikační kolony

ÄKTA pure™ 25 chromatography system

Cary 100 UV-Vis spektrofotometr, Varian

Centrifugy: Eppendorf miniSpin; Eppendorf centrifuge 5810 R; Avanti JXN30

Dialyzační kolony: Pur-A-Lyzer™, Sigma Aldrich; D-Tube™ Dialyzers, Merck Life Science

Horizontální elektroforéza, C.B.S. Scientific

HPLC: Analyticko-preparativní HPLC, Waters

Inkubátory: Inova40 Orbital Shaker, Inova S44i Shaker

Kolona na HPLC: XBridge Oligonucleotide BEH C18 OBD Column, 130Å, 2.5 µm

Kolona pro afinitní chromatografii: HisTrap™ High Performance, 1 mL, Cytiva
Lyofylizátor, Labconco

NanoDrop1000, ThermoFischer Scientific

NanoPhotometer N60, Implen

PCR Thermal Cycler, Biometra TRIO 48, Jena Bioscience

Přístroj na měření MALDI-TOF: UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker) mass spectrometer with 1 kHz smartbeam II laser technology

PCR Purification Kit, Qiagen

Spektrometr na CD: Jasco-815 s jednotkou Petlierova typu PTC-423S/L

Rotační vakuová odparka Hei-VAP Core HL G3, Heidolph

SDS elektroforéza, Bio-Rad

Skener na gely: Typhoon FLA 9500, GE Healthcare

SpeedVac, vakuový koncentrátor, Labconco

Termoblok: Eppendorf Thermomixer comfort

Vertikální elektroforéza, Jena Bioscience

Vivaspin 20, 50 000 MWCO, Sartorius

Vortex: Vornado, Benchmark

3.2. Metody

3.2.1. Exprese KOD(exo-) DNA polymerasy

3.2.1.1. Kultivace kompetentních buněk *Escherichia coli* BL21-AI

Pro expresi proteinu byly použity kompetentní buňky *E. coli* BL21-AI transformované plasmidem genu KOD polymerasy vloženým do vektoru pET28a. Předkultura byla připravena ve 200 mL již namíchaného LB média. Do LB média bylo pipetováno 200 μ L kanamycinu o koncentraci 30 mg·mL⁻¹ a 2 mL 40% roztoku glukosy. Roztok glukosy byl do LB média přidán pro zastavení předčasné nežádoucí exprese. Následně byly do LB média přidány kompetentní buňky *E. coli*, uchovávané v -80 °C. Buňky byly inkubovány (Inova40 Orbital shaker) 24 hodin při 37 °C. LB médium s narostlou předkulturou bylo stočeno na centrifuze (Eppendorf centrifuge 5810 R) při 3900 RPM a 4 °C po dobu 20 minut.

Kultivace pokračovala ve 2 L čerstvého LB média. Do nového LB média byly přidány 2 mL kanamycinu o koncentraci 30 mg·mL⁻¹. Pipetou bylo odebráno několik mililitrů LB média, které byly později použity jako referenční standard pro měření OD₆₀₀. Následně byla v LB médiu resuspendována peleta. Buňky byly inkubovány při 37 °C (Innova S44i shaker). Když hodnota OD₆₀₀ dosáhla hodnoty 0,7, bylo přidáno 20 mL 40% roztoku arabinosy a 2 mL 1M IPTG (připraveno rozpuštěním 2.383 g IPTG v 10 mL MiliQ H₂O). Indukcí IPTG byla v buňkách *E. coli* zahájena exprese KOD(exo-) polymerasy. Následně 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. Před zahájením exprese proteinu a následně i po jejím dokončení byly odebrány vzorky pro SDS elektroforézu.

3.2.1.2. Lýza buněk *Escherichia coli*

Peleta získaná centrifugací byla resuspendována ve 40 mL lyzačního pufru (20mM TRIS-base; 500mM NaCl; 10% glycerol; pH = 8.0). Následovala lýza buněk a denaturace hostitelských proteinů (Inova40 Orbital shaker) při 80 °C po dobu 1 hodiny. Preparát byl umístěn na 20 minut na led. Poté byl stočen na centrifuze (Avanti JXN30) při 38 000× g po dobu 40 minut. KOD(exo-) polymerasa je termostabilní protein, tudíž se nesráží a zůstává jako součást supernatantu. Sérologickou pipetou byl odebrán 1 mL lyzátu pro SDS elektroforézu.

3.2.1.3. Izolace KOD(exo-) DNA polymerasy afinitní chromatografií

Separace proteinu obsaženého v supernatantu probíhala na přístroji ÄKTA pureTM s použitím kolony HisTrap HP 1 mL a průtokovou rychlostí 1 mL/min. K nanášení vzorku na kolonu byl použit lyzační pufr (viz kapitola 3.2.1.2.). Protein byl zachycen na koloně a následně byl eluován elučním pufr (20mM TRIS-base; 500mM NaCl; 10% glycerol; 500mM imidazol). Imidazol obsažený v pufru má vyšší afinitu k HisTrap koloně, tudíž je protein z kolony uvolněn a separován. Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla vyhodnocována pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).

3.2.1.4. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

Nejprve byl připraven 10% separační gel (30% bisakrylamid; 1M TRIS-HCl, pH = 8.8; 20% SDS; 10% APS; TEMED; H₂O), který byl při polymerizaci převrstven 200 μ L isobutanolu pro zachování rovného povrchu a pro zajištění polymerizace bez přístupu vzduchu. Po dokončení polymerizace byl isobutanol odsát filtračním papírem a nad separační gel byl pipetován 5% zaostřovací gel (30% bisakrylamid; 1M TRIS-HCl, pH = 6.8; 20% SDS; 10% APS; TEMED; H₂O).

Vzorky byly před nanášením na gel připraveny smícháním s 2 \times SDS-PAGE loading dye v poměru 1:1. Poté byly zdenaturovány při teplotě 95 °C po dobu 10 minut a následně prudce zchlazeny. Elektroforéza probíhala v 1 \times SDS pufru. Dodecylsírany sodný denaturuje protein a udává mu uniformní náboj. Do jamek bylo pipetováno po 10 μ L jednotlivých vzorků a 5 μ L standardu (color protein standard 10–250 kDa). Elektroforéza probíhala po dobu 30 minut při napětí 100 V, poté bylo napětí zvýšeno na 150 V. Po separaci byly gely obarveny v Coomassie Blue barvicím roztoku po dobu 40 minut, následně byly přes noc ponořeny do Coomassie odbarvovacího roztoku. Další den byly gely skenovány na fluorescenčním skeneru Typhoon FLA 9500, čímž bylo dle standardu určeno, které frakce po provedení afinitní chromatografie obsahovaly exprimovaný protein.

3.2.1.5. Finální purifikace a měření koncentrace KOD(exo-) DNA polymerasy

Purifikace a odsolování bylo provedeno užitím kolony Vivaspin 20, 50 000 MWCO dle následujícího protokolu. Frakce obsahující protein byly spojeny, pipetovány do Vivaspin kolony a stočeny na centrifuze (Eppendorf centrifuge 5810 R) při 3 900 RPM

a 20 °C po dobu 20 minut. Eluční pufr byl vyměněn za 2× skladovací pufr pro KOD(exo-) polymerasu (100mM TRIS-base; 100mM KCl; 2mM DTT; 0.2mM EDTA). Nejprve byly do kolony s proteinem pipetovány 3 mL 2× skladovacího pufru a následně stočeny na centrifuze (Eppendorf centrifuge 5810 R) při 3 900 RPM a 20 °C po dobu 20 minut. Poté byly postupně přidány třikrát 2 mL 2× skladovacího pufru. Po každém přidání byl obsah kolony centrifugován za stejných podmínek jako poprvé.

Finální koncentrace proteinu byla měřena na nanodropu s použitím metody Protein A280. Protein byl uchovávan v roztoku (2× skladovací pufr; 50% glycerol; 1% triton-X-100). Glycerol a triton-X-100 snižují povrchové napětí a zamezují tak zamrzání proteinu v roztoku, čímž předchází jeho destrukci.

3.2.2. Inkorporace nukleotidů nesoucích fenylovou skupinu do DNA metodou extenze primeru

Aktivita exprimované KOD(exo-) polymerasy byla testována při syntéze přirozené i modifikované DNA (viz tabulka 2, str. 33) pomocí metody PEX (viz obrázek 8, str. 33). Do reakčních zkumavek byl pipetován 10× koncentrovaný reakční pufr (1.2M TRIS-base; 100mM KCl; 60mM (NH₄)₂SO₄; 15mM MgCl₂ × 6 H₂O, 1% triton-X-100, 0.01% BSA), templát, fluorescenčně značený primer (viz tabulka 1, str. 33), KOD(exo-) DNA polymerasa, přirozené nukleotidy (dNTP) a v případě syntézy modifikované DNA i 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty nesoucí fenylovou skupinu (**dN^{Ph}TP**). Reakční roztok byl doplněn MiliQ H₂O na požadovaný objem.

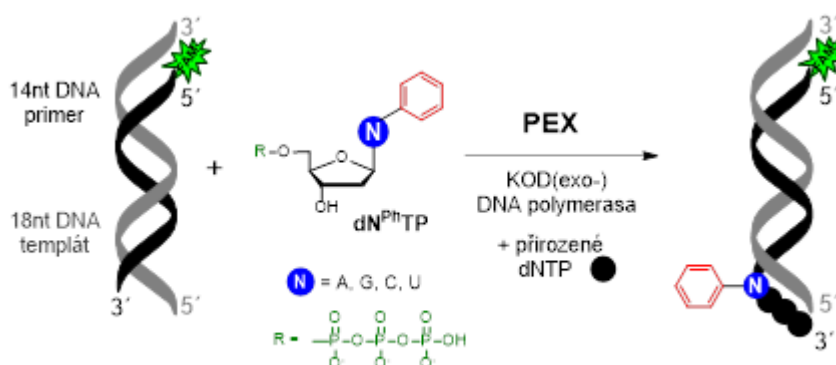
Metoda PEX v semi-preparativním měřítku probíhala při 55 °C po dobu 20 minut. Reakce byla ukončena ochlazením, tedy umístěním vzorků do -20 °C, aby byla ukončena polymerasová aktivita. V preparativním měřítku byl reakční roztok naředěn MiliQ H₂O na 20μM koncentraci templátu. Reakce v preparativním měřítku probíhaly při 55 °C a 120 RPM po dobu 24 hodin a byly opět ukončeny ochlazením vzorků na -20 °C.

Tabulka 1: Názvy a sekvence primeru a jednotlivých templátů. Modře je označena část sekvence, která je komplementární k sekvenci primeru, červeně první nukleotid, který je komplementární k prvnímu inkorporovanému dNTP, respektive $dN^{Ph}TP$. Primer je tvořen 14 nukleotidy (nt) a templáty jsou tvořeny 18 nt.

	Název	Sekvence	Počet nt
Primer	Prim14nt-5'-6-FAM	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG - 3'	14
Templát	18ON-1A	5' - CCC T CCCAGCGGCGGCTG - 3'	18
	18ON-1G	5' - GTT C CCCAGCGGCGGCTG - 3'	18
	18ON-1C	5' - CTT G CCCAGCGGCGGCTG - 3'	18
	18ON-1T	5' - CCC A CCCAGCGGCGGCTG - 3'	18

Tabulka 2: Označení a sekvence syntetizovaných produktů. Modře je označena sekvence primeru a červeně první inkorporovaný dNTP, respektive $dN^{Ph}TP$. Pro jednoduchost nejsou zobrazeny celé dsDNA produkty, ale pouze ssDNA sekvence syntetizovaných vláken. Jedno vlákno produktu je tvořeno 18 nt.

	Název	Sekvence	Počet nt
Produkt přirozené DNA	A	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG A GGG - 3'	18
	G	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG G AAC - 3'	18
	C	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG C AAG - 3'	18
	T	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG T GGG - 3'	18
Produkt modifikované DNA	A^{Ph}	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG A^{Ph} GGG - 3'	18
	G^{Ph}	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG G^{Ph} AAC - 3'	18
	C^{Ph}	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG C^{Ph} AAG - 3'	18
	U^{Ph}	5' - 6 - FAM - CAGCCGCGCTGGG U^{Ph} GGG - 3'	18



Obrázek 8: Schéma PEX s $dN^{Ph}TP$. Prodlužování primeru na základě komplementarity k templátovému vláknu. V reakční směsi jsou vždy kromě daného modifikovaného nukleotidu přítomny i ostatní typy přirozených nukleotidů.

3.2.3. Analýza DNA polyakrylamidovou denaturační elektroforézou

Pro přípravu 12,5% denaturačního gelu bylo použito 15 mL denaturačního koncentrátu (Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat 25 %, akrylamid a methylenbisakrylamid v poměru 19 : 1, 50% močovina), 15 mL 2× koncentrovaného TBE pufru, 12 µL TEMED a 240 µL 10% APS. Pro přípravu 20% denaturačního gelu bylo použito 24 mL denaturačního koncentrátu (Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat 25 %, akrylamid a methylenbisakrylamid v poměru 19 : 1, 50% močovina), 6 mL 5× koncentrovaného TBE pufru, 19 µL TEMED a 384 µL 10% APS.

Po ztuhnutí byl gel zahříván při výkonu 45 W po dobu 40 minut. Vzorky byly připraveny smícháním se stop solution v poměru 1 : 1 a následně byly denaturovány při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Primer (viz tabulka 1, str. 33) a připravené vzorky byly pipetovány na gel. Separace probíhala 30 minut při teplotě 50 °C a proudu 40 mA. Gel byl skenován na fluorescenčním skeneru Typhoon FLA 9500 a následně vyhodnocen.

3.2.4. Analýza DNA polyakrylamidovou nativní elektroforézou

Pro přípravu 20% nativního gelu bylo použito 15 mL nativního koncentrátu (Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat 40 %, akrylamid a methylenbisakrylamid v poměru 19 : 1), 15 mL 2× koncentrovaného TBE pufru, 12 µL TEMED a 240 µL 10% APS. Vzorky byly před použitím pro nativní elektroforézu zlyofilizovány, rozpuštěny v 11mM fosfátovém pufru (100mM Na₂HPO₄; 100mM NaH₂PO₄; 80mM KCl; pH = 7,3) a následně renaturovány v PCR termocykleru, aby byla zajištěna přítomnost dsDNA produktu. Vzorky byly v PCR termocykleru 3 minuty při teplotě 95 °C. Následně teplota klesala s gradientem 0,5 °C/s na konečné 4 °C. Poté byly smíchány s 6× native loading dye a společně s primerem (viz tabulka 1, str. 33) pipetovány do gelu. Elektroforéza probíhala při proudu 10 mA po dobu 4 hodin v chladové místnosti (teplota přibližně 8 °C).

3.2.5. Dialýza vzorků DNA

Vzorky enzymově syntetizované DNA ve vyšším měřítku byly dialyzované, aby došlo k odstranění kratších fragmentů, solí a případně nezreagovaných dNTP ze vzorku. Dialýza funguje na principu reverzní osmózy. Molekuly, které mají menší molekulovou hmotnost, než je mezní velikost dialyzační membrány, přechází do roztoku o nižší koncentraci. Pro dialýzu byly použity kolony D-TubeTM Dialyzers a Pur-A-LyzerTM. Purifikace byla provedena dle pokynů výrobce.

3.2.6. Purifikace vysokotlakou kapalinovou chromatografií

Oligonukleotidy byly dále purifikovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Pro separaci byly připraveny tři mobilní fáze: A (0,1M TEAB), B (0,1M TEAB, 20% acetonitril) a C (100% acetonitril). Separace probíhala následovně: v čase 0 min poměr mobilních fází A : B odpovídal 70 : 30 , v 15 min 50 : 50, v 60 min byl poměr těchto fází 0 : 100 a v 70 min bylo B : C v poměru 0 : 100. Separace probíhala s průtokovou rychlostí 2 mL/min. Byla použita kolona na reverzní fázi C-18 XBridge.

3.2.7. Polymerasová řetězová reakce a následná elektroforéza v agarosovém gelu

Pro metodu PCR (viz obrázek 9, str. 37) byl do 0,2mL reakčních zkumavek pipetován reakční pufr pro KOD(exo-) DNA polymerasu (viz kapitola 3.2.2.), templát, dva různě fluorescenčně značené primery (viz tabulka 3), dNTP a případně **dN^{Ph}TP**. Dále byla do reakční směsi přidána aditiva: 100% DMSO; 50% formamid; 0,75M betain a 50mM TMAC. Aditiva se přidávají při složitějších PCR reakcích pro zvýšení výtěžku [57]. Následně byla reakční směs doplněna MiliQ H₂O na požadovaný reakční objem. Následně byly vzorky umístěny do termocykleru typu Biometra TRIO 48 a byla spuštěna metoda (viz tabulka 4, str. 36).

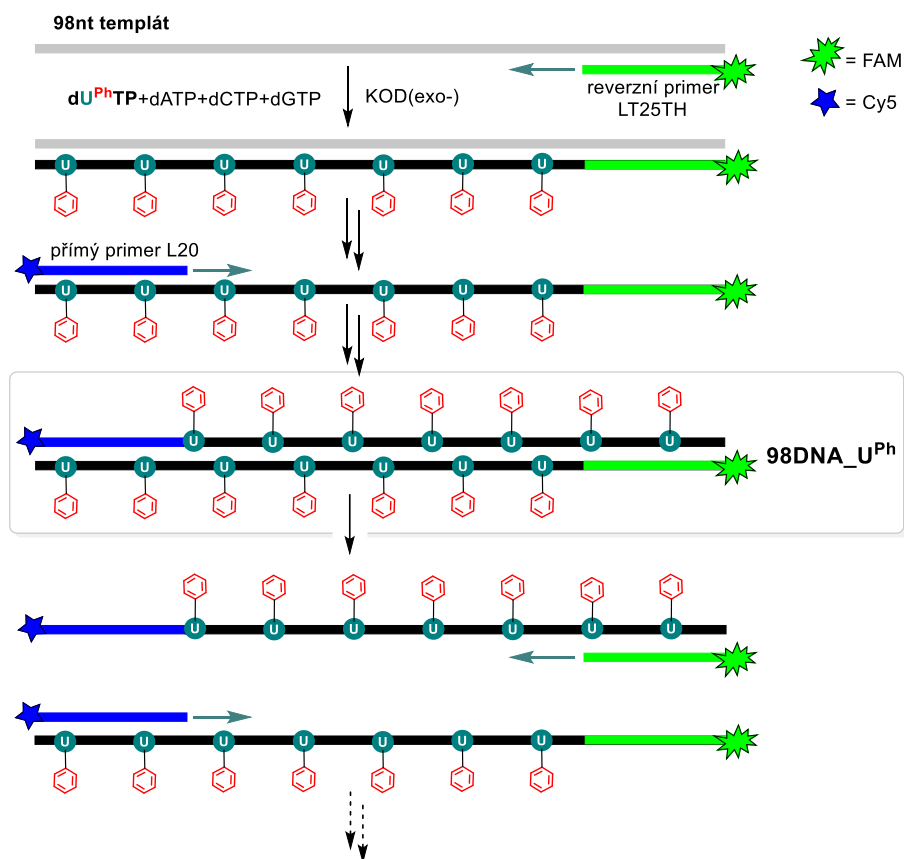
Tabulka 3: *Názvy a sekvence primerů a templátu použitých pro metodu PCR. Barevně jsou označeny odpovídající části sekvence primerů a templátu. Reverzní (Rev) primer je dlouhý 25 nukleotidů (nt), je značený fluorescenční značkou 6-FAM a nasedá na templátové vlákno. Přímý (For) primer je dlouhý 20 nt a nasedá na vlákno, které je komplementární k templátu.*

	Název	Sekvence	Počet nt
Primer	LT25TH-5'-6-FAM (Rev)	5' - CAAGGACAAAATACCTGTATTCCTT - 3'	25
	LT20-5'-Cy5 (For)	5' - GACATCATGAGAGACATCGC - 3'	20
Templát	FVL-A	5' - GACATCATGAGAGACATCGC CTCTGGGC TAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAG ATCCCTGGACAGGC AAGGAATACAGGTATTT TGTCCTTG - 3'	98

Tabulka 4: Jednotlivé fáze metody PCR, teploty (T), při kterých fáze probíhaly a doba průběhu fází.

Krok	Fáze	T [°C]	Čas [min]
1	Denaturace	94	3
2	Denaturace	94	1
3	Nasedání primerů	55	1
4	Prodlužování řetězce	72	1
5	Prodlužování řetězce	72	5
6	Chlazení	4	po ukončení PCR a vyjmutí vzorků z termocykleru

Kroky 2 až 4 byly opakovány celkem 30krát (viz tabulka 4). Následně byly vzorky purifikovány na PCR purifikačních kolonách dle pokynů výrobce, eluovány pomocí MiliQ H₂O, odpařeny na rotační vakuové odparce a následně rozpuštěny v 5 µL MiliQ H₂O. Správnost amplifikace byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy ve 2% agarosovém gelu. Gel byl připraven rozpuštěním 1 g agarosu v 50 mL 0,5× TBE pufru. Na gel byl kromě připravených vzorků pipetován standard, který byl připraven smícháním několika dsDNA o různém počtu párů bází tak, aby výsledná koncentrace každé dsDNA byla 1 µM. Do gelu bylo pipetováno 6 µL vzorků i standardu. Separace probíhala při napětí 120 V po dobu 90 minut. Následně byl gel skenován na skeneru Typhoon FLA 9500 a vyhodnocen.



Obrázek 9: Schéma PCR s $dN^{Ph}TP$, 98nt dlouhým templátem, reverzním primerem značeným fluorescenční značkou 6-FAM a přímým primerem značeným fluorescenční značkou Cy5, na obrázku jsou naznačeny tři hlavní fáze PCR cyklu: denaturace, nasedání primerů a prodlužování primerů.

3.2.8. Určování molekulové hmotnosti DNA metodou MALDI-TOF

Metoda MALDI-TOF byla provedena servisní skupinou hmotnostní spektrometrie na ÚOCHB AV ČR. Spektra oligonukleotidů byla měřena na přístroji UltrafleXtreme hmotnostním spektrometru s 1kHz smartbeam II laserovou technologií. Matrix se skládá z 3-hydroxypikolinové kyseliny, pikolinové kyseliny a vinanu amonného v poměru 9 : 1 : 1.

3.2.9. Určování koncentrace a teploty denaturace připravených oligonukleotidů

Koncentrace syntetizované DNA byla vypočítána z naměřené absorbance pomocí Lambert-Beerova zákona. Absorbance i teplota denaturace (T_m) všech vzorků DNA byly měřeny na UV-Vis spektrofotometru Cary 100 v teplotním rozmezí 25 °C až 95 °C s teplotním krokem 1 °C/min a detekcí při vlnové délce 260 nm. Pro měření byla použita

křemenná kyveta o délce 1 cm. Hodnoty T_m byly vypočteny jako první záporná derivace intenzity v závislosti na teplotě pomocí softwaru Cary WinUV.

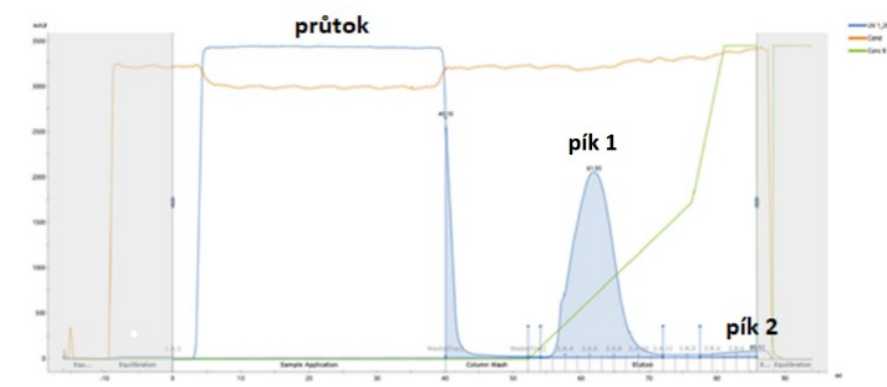
3.2.10. Určování struktury DNA metodou cirkulárního dichroismu

Měření cirkulárního dichroismu bylo provedeno RNDr. Lucií Bednárovou, CSc., ze skupiny analytické laboratoře ÚOCHB AV ČR. Spektra cirkulárního dichroismu byla měřena na spektrometru a Jasco-815, který je vybaven jednotkou Petlierova typu PTC-423S/L umožňující kontrolu teploty. Spektra byla měřena ve spektrálním intervalu 200-350 nm v 5mm křemenné kyvetě s rychlostí posuvu monochromátoru 10nm/min, časovou konstantou 8 sekund, s krokem 0,1 nm a v teplotním intervalu 10-90 °C s krokem 5 °C. Po korekci na nulovou linii jsou presentovaná spektra v jednotkách diferenciální molární extinkce ($\Delta\epsilon$). Numerické zpracování dat bylo provedeno v softwaru Sigmaplot.

4. Výsledky

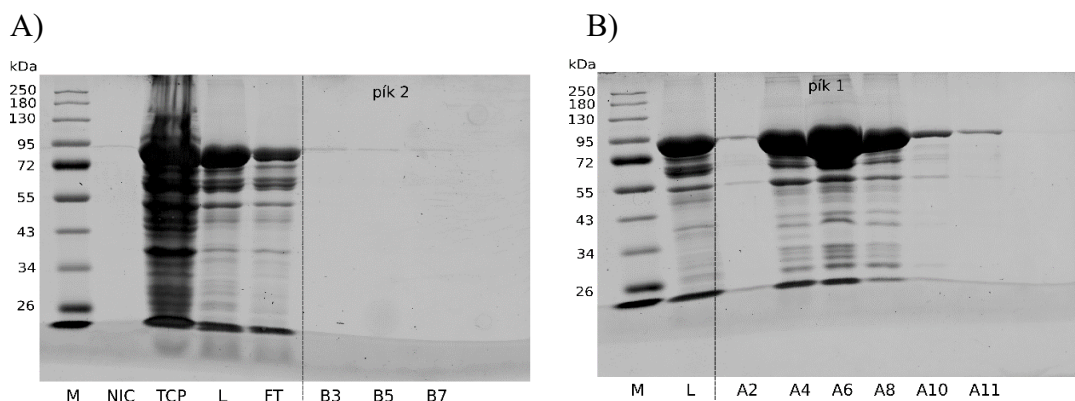
4.1. Exprese a následná purifikace KOD(exo-) DNA polymerasy

Prvním cílem bakalářské práce byla exprese KOD(exo-) DNA polymerasy. Po expresi byl protein purifikován pomocí afinitní chromatografie (viz obrázek 10). Výsledek purifikace je zaznamenán jako chromatogram. Jako první byly detekovány látky, které nebyly zachyceny na koloně. S postupným přidáváním elučního činidla, tedy s rostoucím obsahem imidazolu v roztoku, byly eluovány látky, které se na koloně zachytily.



Obrázek 10: Chromatogram purifikace na přístroji ÄKTA pure™, průtok je označení pro látky, které nebyly zachyceny na koloně. Pík 1 a pík 2 označují látky, které byly eluovány s rostoucí koncentrací imidazolu v roztoku.

Přítomnost KOD(exo-) polymerasy byla ověřována pomocí 10% SDS-PAGE (viz obrázek 11, str. 40). SDS elektroforéza rozděljuje molekuly na základě jejich molekulové hmotnosti. KOD(exo-) polymerasa má molekulovou hmotnost 90 kDa. Dle standardu (color protein standard 10–250 kDa) byla zjišťována molekulová hmotnost exprimovaného proteinu.



Obrázek 11A, 11B: 10% SDS-PAGE, M značí standard, NIC (non-induced cells) buněčnou kulturu před indukcí exprese proteinu, TCP (total cell protein) buněčnou kulturu po dokončení exprese proteinu, L (lysate) buněčný lyzát a FT (flow-through) průtok při purifikaci. Písmena (A, B) následovaná číslem označují frakce sbírané při purifikaci. Ze všech získaných frakcí byly k analýze na SDS-PAGE použity jen některé. Analýza pouze některých frakcí je dostatečná pro identifikaci proteinu tvořícího pík.

Z výsledků gelu je viditelné, že látka tvořící pík 1, u níž bylo již po purifikaci předpokládáno, že je chtěným proteinem, má molekulovou hmotnost přibližně 90 kDa. Z toho vyplývá, že tento pík je tvořen KOD(exo-) DNA polymerasou. Na gelu byl kromě velkého píku 1 analyzován i menší pík 2. Z analýzy na SDS-PAGE bylo zjištěno, že v těchto frakcích není přítomna KOD(exo-) DNA polymerasa.

4.2. Studium aktivity exprimované KOD(exo-) DNA polymerasy při enzymové syntéze DNA

Ověření správné funkčnosti exprimované KOD(exo-) DNA polymerasy bylo studováno metodami PEX a PCR. Pro mé experimenty studia vlastností a struktury modifikované DNA byla použita modifikovaná DNA nesoucí fenylovou skupinu (viz kapitola 1.4.2.). Pro zjištění, zdali je polymerasa schopna $dN^{Ph}TP$ inkorporovat do oligonukleotidového řetězce, byla provedena metoda PEX v semi-preparativním měřítku. Následně byla aktivita KOD(exo-) DNA polymerasy porovnána s aktivitou Vent(exo-) DNA polymerasy. Nakonec byla provedena metoda PCR.

4.2.1. Srovnání aktivity KOD(exo-) DNA polymerasy s aktivitou Vent(exo-) DNA polymerasy užitím metody extenze primeru v semi-preparativním měřítku.

Pro srovnání účinnosti KOD(exo-) DNA polymerasy s jinou polymerasou byla použita Vent(exo-) DNA polymerasa. Ta patří, stejně jako KOD(exo-) polymerasa, do rodiny B DNA polymeras. Obě tyto polymerasy byly použity pro extenzi primeru přirozenými dNTP. Reakce provedené oběma polymerasami byly následně porovnávány a analyzovány na 12,5% denaturační polyakrylamidové gelové elektroforéze (dPAGE) (viz obrázek 12).

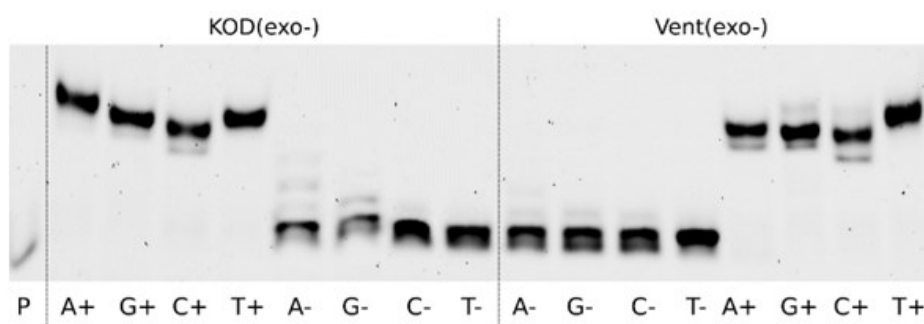
Pro reakční směs ($\Sigma V = 20 \mu\text{L}$) byl použit $10\times$ koncentrovaný reakční pufr (viz kapitola 3.2.2.); čtyři různé $3\mu\text{M}$ templáty – pro každý typ modifikovaného nukleotidu jiný templát (viz tabulka 1, str. 33); $3\mu\text{M}$ primer nesoucí fluorescenční značku 6-FAM na 5' konci; $1,1\mu\text{M}$ KOD(exo-) DNA polymerasa, respektive Vent(exo-) DNA polymerasa s aktivitou $0,5 \text{ U}/\mu\text{L}$ a $0,2\text{mM}$ dNTP (viz tabulka 5 a 6).

Tabulka 5: Složení reakčních roztoků pro PEX s užitím KOD(exo-) DNA polymerasy.

$\Sigma V = 20 \mu\text{L}$	KOD(exo-)							
	A+	G+	C+	T+	A-	G-	C-	T-
V(pufr) [μL]	2	2	2	2	2	2	2	2
V(primer) [μL]	1	1	1	1	1	1	1	1
V(templát) [μL]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V(polymerasa) [μL]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V(dATP) [μL]	1	1	1	-	-	1	1	-
V(dGTP) [μL]	1	1	1	1	1	-	1	1
V(dCTP) [μL]	-	1	1	-	-	1	-	-
V(dTTP) [μL]	-	-	-	1	-	-	-	-
V(H ₂ O) [μL]	12	11	11	12	13	12	12	13

Tabulka 6: Složení reakčních roztoků pro PEX s užitím Vent(exo-) DNA polymerasy.

$\Sigma V = 20 \mu\text{L}$	Vent(exo-)							
	A+	G+	C+	T+	A-	G-	C-	T-
V(pufř) [μL]	2	2	2	2	2	2	2	2
V(primer) [μL]	1	1	1	1	1	1	1	1
V(templát) [μL]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V(polymerasa) [μL]	1	1	1	1	1	1	1	1
V(dATP) [μL]	1	1	1	-	-	1	1	-
V(dGTP) [μL]	1	1	1	1	1	-	1	1
V(dCTP) [μL]	-	1	1	-	-	1	-	-
V(dTTP) [μL]	-	-	-	1	-	-	-	-
V(H ₂ O) [μL]	12,5	11,5	11,5	12,5	13,5	12,5	12,5	13,5



Obrázek 12: 12,5% dPAGE, P označuje fluorescenčně značený primer, jednotlivá písmena (A, G, C, T) rozlišují čtyři různé ssDNA produkty (viz tabulka 2, str. 33). Písmenné zkratky odpovídají prvnímu inkorporovanému nukleotidu. Plusem jsou označeny vzorky přirozené DNA obsahující odpovídající dNTP a mínusem negativní kontroly, tedy vzorky bez obsahu prvního inkorporovaného dNTP.

Na gelu lze vidět, že obě polymerasy inkorporují nukleotidy stejně účinně. Použití exprimované KOD(exo-) DNA polymerasy, by proto nemělo mít negativní vliv na průběh dalších reakcí. V případě negativních kontrol je viditelná stejná mobilita vzorků bez přítomnosti prvního inkorporovaného dNTP a primeru. To znamená, že syntéza DNA probíhá správně a nedochází k žádným chybným inkorporacím.

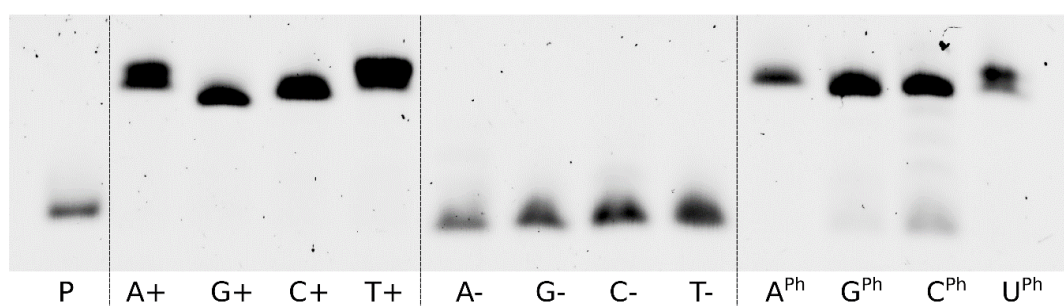
4.2.2. Inkorporace nukleotidů nesoucích fenylovou skupinu do oligonukleotidového řetězce metodou extenze primeru

Pro reakční směs ($\Sigma V = 100 \mu\text{L}$) byl použit 10 \times koncentrovaný reakční pufř (viz kapitola 3.2.2.); čtyři různé 3 μM templáty – pro každý typ modifikovaného nukleotidu jiný templát (viz tabulka 1, str. 33); 3 μM primer nesoucí fluorescenční značku 6-FAM

na 5' konci; 1,1 μ M KOD(exo-) DNA polymerasa; 0,2mM dNTP a 4mM **dN^{Ph}TP** (viz tabulka 7, str. 43). Zda extenze primeru s užitím **dN^{Ph}TP** proběhla správně, bylo zjišťováno pomocí 12,5% dPAGE (viz obrázek 13).

Tabulka 7: Složení reakčních roztoků pro PEX v semi-preparativním měřítku.

$\Sigma V = 100 \mu\text{L}$	Pozitivní kontroly				Negativní kontroly				Modifikované dNTP			
	A+	G+	C+	T+	A-	G-	C-	T-	A ^{Ph}	G ^{Ph}	C ^{Ph}	U ^{Ph}
V(pufr) [μL]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
V(primer) [μL]	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
V(templát) [μL]	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
V(polymerasa) [μL]	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
V(dATP) [μL]	5	5	5	-	-	5	5	-	-	5	5	-
V(dGTP) [μL]	5	5	5	5	5	-	5	5	5	-	5	5
V(dCTP) [μL]	-	5	5	-	-	5	-	-	-	5	-	-
V(dTTP) [μL]	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
V(dN ^{Ph} TP) [μL]	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	60	55	55	60	65	60	60	65	64,5	59,5	59,5	64,5



Obrázek 13: 12,5% dPAGE, písmeno P označuje fluorescenčně značený primer, jednotlivá písmena (A, G, C, T/U) rozlišují čtyři různé ssDNA produkty. Písmenné zkratky odpovídají prvnímu inkorporovanému nukleotidu (viz tabulka 2, str. 33). Plusem jsou označeny vzorky přirozené DNA, mínusem negativní kontroly, tedy vzorky bez obsahu prvního inkorporovaného dNTP a N^{Ph} (N = A, G, C, U) označují vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese fenylovou skupinu a další tři jsou přirozené.

Z gelu je patrné, že exprimovaná KOD(exo-) DNA polymerasa provádí syntézu modifikovaného vlákna stejně účinně jako přirozeného vlákna. To lze potvrdit ze srovnatelné mobility pásů přirozené a odpovídající modifikované DNA. U vzorků negativní kontroly nedošlo k inkorporaci žádného nukleotidu. To opět potvrzuje, že během PEX nedochází k chybné inkorporaci jiného dNTP.

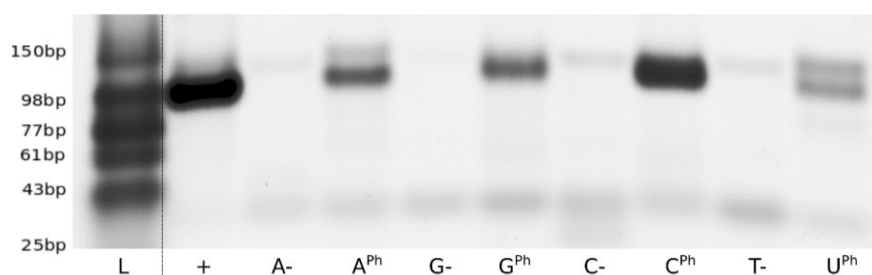
4.2.3. Polymerasová řetězová reakce s využitím KOD(exo-) DNA polymerasy

PCR byla provedena na 98nt templátu o koncentraci 1 μM s použitím dvou různých primerů: reverzního (Rev) nesoucího fluorescenční značku 6-FAM a přímého (For) nesoucího fluorescenční značku Cy5 oba o koncentraci 10 μM . Dále byla do reakčního roztoku pipetována 1,1 μM KOD(exo-) DNA polymerasa; přirozené nukleotidy o koncentraci 2 mM a příslušné $\text{dN}^{\text{Ph}}\text{TP}$ o koncentraci 4 mM (viz tabulka 8). Reakce probíhala v 10 \times koncentrovaném reakčním pufru (viz kapitola 3.2.2.) a pro zajištění lepšího průběhu reakce byla přidána aditiva (viz kapitola 3.2.7.) v poměru 1 : 1 : 1 : 1.

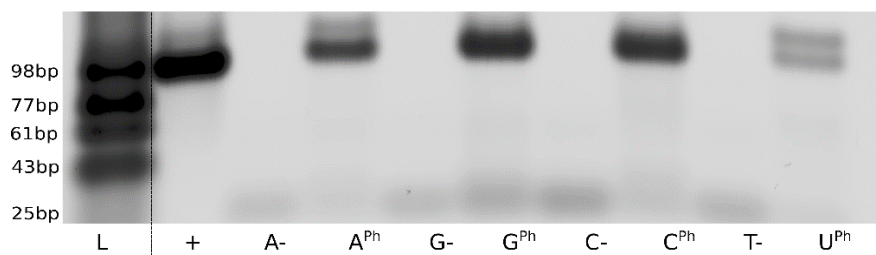
Tabulka 8: Složení reakčních roztoků pro PCR.

$\Sigma V = 20 \mu\text{L}$	+	A -	G -	C -	T -	A ^{Ph}	G ^{Ph}	C ^{Ph}	U ^{Ph}
V(pufr) [μL]	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V(primer - For) [μL]	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V(primer - Rev) [μL]	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V(templát) [μL]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
V(polymerasa) [μL]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V(dAGCT) [μL]	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-
V(dGCT) [μL]	-	1,5	-	-	-	1,5	-	-	-
V(dACT) [μL]	-	-	1,5	-	-	-	1,5	-	-
V(dAGT) [μL]	-	-	-	1,5	-	-	-	1,5	-
V(dAGC) [μL]	-	-	-	-	1,5	-	-	-	1,5
V($\text{dN}^{\text{Ph}}\text{TP}$) [μL]	-	-	-	-	-	3	3	3	3
V(aditiva) [μL]	4	4	4	4	4	4	4	4	4
H ₂ O	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	3,5	3,5	3,5	3,5

Po dokončení metody PCR (viz kapitola 3.2.7.) a po následné purifikaci pomocí PCR purification kitu byly výsledky analyzovány na 2% agarosovém gelu. Gel byl skenován pro každou fluorescenční značku odděleně. Výsledkem jsou proto dva obrázky (viz obrázek 14 a 15, str. 45), každý s jinak fluorescenčně značenými vlákny, čímž je potvrzeno, že amplifikace probíhá stejně účinně u obou vláken DNA.



Obrázek 14: 2% Agarosový gel, na kterém jsou vidět 6-FAM značené produkty vznikající extenzí 6-FAM značeného primeru. L (ladder) označuje standard obsahující DNA o různých délkách párů bází (bp), + značí pozitivní kontrolu, tedy vzorek, ve kterém jsou přítomny všechny čtyři přirozené nukleotidy, N- značí negativní kontrolu, písmeno (N = A, G, C, T) je označení nukleotidu, který ve vzorku chybí. N^{Ph} (N = A, G, C, U) označuje vzorky, ve kterých jsou tři přirozené nukleotidy a jeden modifikovaný nukleotid, písmeno N v tomto případě označuje modifikovanou bázi.



Obrázek 15: 2% Agarosový gel, na kterém jsou vidět produkty značené Cy5 vznikající extenzí primeru nesoucího fluorescenční značku Cy5. L (ladder) označuje standard obsahující DNA o různých délkách bp, + značí pozitivní kontrolu, tedy vzorek, ve kterém jsou přítomny všechny čtyři přirozené nukleotidy, N- značí negativní kontrolu, písmeno (N = A, G, C, T) je pro nukleotid, který ve vzorku chybí. N^{Ph} (N = A, G, C, U) označuje vzorky, ve kterých jsou tři přirozené nukleotidy a jeden modifikovaný nukleotid, písmeno N v tomto případě označuje modifikovanou bázi.

Na gelech lze vidět, že KOD(exo-) DNA polymerasa dokáže amplifikovat i již modifikovanou DNA. Amplifikace modifikované DNA však neprobíhá stejně účinně jako amplifikace přirozené DNA. U modifikované DNA jsou viditelné slabší pásy produktů a v případě U^{Ph} je dokonce pozorovatelná přítomnost dvou pásů odpovídající směsi produktů o různých délkách bp.

4.3. Syntéza DNA metodou extenze primeru v preparativním měřítku

Pro zjišťování vlivu modifikací na strukturu DNA za využití různých strukturních studií, je potřeba syntetizovat modifikovanou DNA v miligramovém měřítku. Modifikovaná DNA byla syntetizována ve dvou různých látkových množstvích. Nejprve ve 162nmol

měřítku, které teoreticky odpovídá 1,88 mg DNA a následně v 324nmol měřítku, které teoreticky odpovídá 3,76 mg DNA.

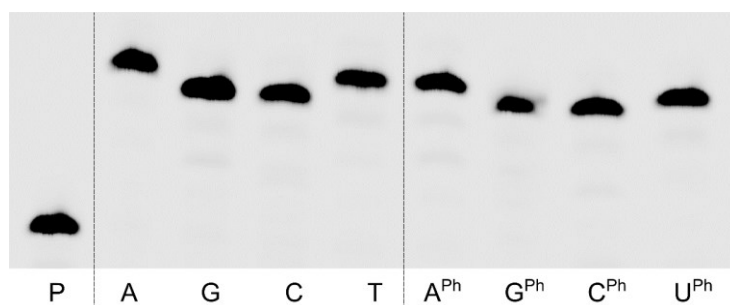
4.3.1. Syntéza DNA metodou extenze primeru ve 162nmol měřítku

Pro reakční roztok ve 162nmol měřítku ($\Sigma V = 540 \mu\text{L}$) byl použit $10\times$ koncentrovaný reakční pufr (viz kapitola 3.2.2.); čtyři různé 10mM templáty – pro každý typ modifikovaného nukleotidu jiný templát (viz tabulka 1, str. 33); 0,138mM KOD(exo-) DNA polymerasa; 100mM dNTP a 50mM $\text{dN}^{\text{Ph}}\text{TP}$ (viz tabulka 9).

Tabulka 9: Složení reakčních roztoků pro PEX ve 162nmol měřítku.

$\Sigma V = 540 \mu\text{L}$	Pozitivní kontrola				Modifikované dNTP			
	A	G	C	T	A ^{Ph}	G ^{Ph}	C ^{Ph}	U ^{Ph}
V(pufr) [μL]	54	54	54	54	54	54	54	54
V(templát) [μL]	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2
V(polymerasa) [μL]	120	120	120	120	120	120	120	120
V(dATP) [μL]	16,2	32,4	32,4	-	-	32,4	-	-
V(dGTP) [μL]	48,6	16,2	16,2	48,6	48,6	-	-	48,6
V(dCTP) [μL]	-	16,2	16,2	-	-	16,2	-	-
V(dTTP) [μL]	-	-	-	16,2	-	-	-	-
V($\text{dN}^{\text{Ph}}\text{TP}$) [μL]	-	-	-	-	32,4	32,4	32,4	32,4
H ₂ O	285	285	285	285	268,8	268,8	268,8	268,8

Ke každému reakčnímu mixu bylo přidáno 7560 μL H₂O pro zajištění koncentrace templátu, při které bude reakce probíhat optimálně (viz kapitola 3.2.2.) a 17,82 μL 6-FAM značeného primeru o koncentraci 10 mM (viz tabulka 1, str. 33). Po skončení reakce byly produkty analyzovány na 20% dPAGE (viz obrázek 16).



Obrázek 16: 20% dPAGE, písmeno P označuje 6-FAM značený primer, jednotlivá písmena (A, G, C, T) rozlišují čtyři různé produkty. Písmenné zkratky odpovídají prvnímu inkorporovanému dNTP (viz tabulka 2, str. 33), N (N = A, G, C, T) označují přirozené oligonukleotidy a N^{Ph} (N = A, G, C, U) vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese fenylovou skupinu a další tři jsou přirozené.

Pásky modifikované DNA mají stejnou mobilitu jako pásky přirozené DNA. Z toho lze usoudit, že produkty přirozené a modifikované DNA mají stejný počet nukleotidů, a tudíž je modifikovaný oligonukleotid plně extendovaný. Jednotlivé pásky mají srovnatelnou intenzitu. Z toho vyplývá, že výtěžek modifikované a přirozené DNA je podobný.

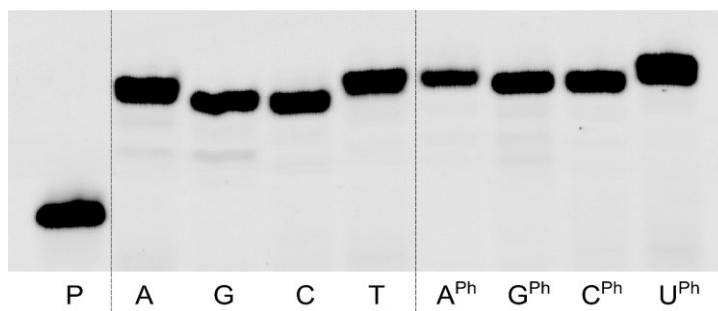
4.3.2. Syntéza DNA metodou extenze primeru v 324nmol měřítku

Identicky jako při reakci ve 162nmol měřítku byla provedena i reakce v 324nmol měřítku. Pro reakci ($\Sigma V = 1080 \mu\text{L}$) byl použit $10\times$ koncentrovaný reakční pufr (viz kapitola 3.2.2.); čtyři různé 10mM templáty – pro každý typ modifikovaného nukleotidu jiný templát (viz tabulka 1, str. 33); 0,138mM KOD(exo-) DNA polymerasa; 100mM dNTP a 100mM $\text{dN}^{\text{Ph}}\text{TP}$ (viz tabulka 10).

Tabulka 10: Složení reakčních roztoků pro PEX v 324nmol měřítku.

$\Sigma V = 1080 \mu\text{L}$	Pozitivní kontrola				Modifikované dNTP			
	A	G	C	T	A ^{Ph}	G ^{Ph}	C ^{Ph}	U ^{Ph}
V(pufr) [μL]	108	108	108	108	108	108	108	108
V(templát) [μL]	32,4	32,4	32,4	32,4	32,4	32,4	32,4	32,4
V(polymerasa) [μL]	240	240	240	240	240	240	240	240
V(dATP) [μL]	32,4	64,8	64,8	-	-	64,8	-	-
V(dGTP) [μL]	97,2	64,8	64,8	97,2	97,2	-	-	97,2
V(dCTP) [μL]	-	32,4	32,4	-	-	32,4	-	-
V(dTTP) [μL]	-	-	-	32,4	-	-	-	-
V($\text{dN}^{\text{Ph}}\text{TP}$) [μL]	-	-	-	-	32,4	32,4	32,4	32,4
H ₂ O	570	570	570	570	570	570	570	570

Pro zajištění správné koncentrace templátu bylo k reakčním roztokům přidáno 15 120 μL H₂O a následně bylo do roztoku pipetováno 35,64 μL primeru o koncentraci 10 mM (viz tabulka 1, str. 33). Výsledky PEX byly po ukončení reakce analyzovány na 12,5% dPAGE (viz obrázek 17, str. 48).



Obrázek 17: 12,5% dPAGE, písmeno P označuje 6-FAM značený primer, jednotlivá písmena (A, G, C, T) rozlišují čtyři různé produkty. Písmenné zkratky odpovídají prvnímu inkorporovanému dNTP (viz tabulka 2, str. 33), N (N = A, G, C, T) označují přirozené oligonukleotidy a N^{Ph} (N = A, G, C, U) vzorky, kde první inkorporovaný nukleotid nese fenylovou skupinu a další tři jsou přirozené.

Při analýze produktů vzniklých reakcí v 324nmol měřítku je opět viditelné, že pásy modifikované DNA mají stejnou mobilitu jako pásy přirozené DNA. Produkty přirozené a modifikované DNA mají tedy stejný počet nukleotidů, a tudíž lze říci, že je modifikovaný oligonukleotid plně extendovaný. Jednotlivé pásy mají srovnatelnou intenzitu. Z toho vyplývá, že výtěžek modifikované a přirozené DNA je podobný. Chtěný produkt vždy vzniká ve výrazném nadbytku oproti dalším kratším fragmentům, které jsou velice slabě viditelné na gelu.

4.3.3. Určování molekulové hmotnosti metodou MALDI-TOF

Pomocí metody MALDI-TOF bylo ověřováno, zda molekulová hmotnost (M) syntetizovaných oligonukleotidů odpovídá teoretické molekulové hmotnosti chtěných produktů a potvrdit tak správnost provedení enzymové syntézy (viz tabulka 11, str. 49). I když je produkt ve formě dsDNA, lze díky ionizaci DNA při metodě MALDI-TOF analyzovat samostatně templátové a nově syntetizované vlákno.

Tato metoda byla použita pro potvrzení správného provedení enzymové syntézy. Porovnáním teoretické molekulové hmotnosti s naměřenou molekulovou hmotností syntetizovaného produktu lze ověřit, zda syntetizovaný produkt odpovídá chtěnému produktu.

Tabulka 11: Molekulové hmotnosti jedovláknových produktů. V tabulce je uvedeno měřítko, ve kterém byla reakce provedena, následně produkt, teoretická molekulová hmotnost sekvence [$M(\text{teor.})$], naměřená molekulová hmotnost sekvence [$M(\text{real.})$] a rozdíl v molekulových hmotnostech (ΔM). Pro jednoduchost v tabulce nejsou uvedeny molekulové hmotnosti templátů, ale pouze nově syntetizovaných vláken.

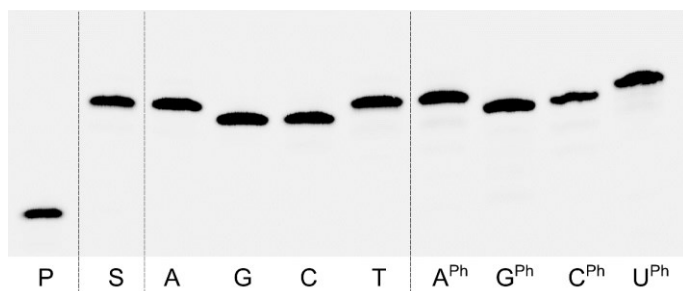
Měřítko	ssDNA produkt	M (teor.) [Da]	M (real.) [Da]	ΔM
162 nmol	A	6104,1	6106	1,9
	G	6048,1	6050,3	2,2
	C	6048,1	6050,4	2,3
	T	6095,1	6095,8	0,7
	A ^{Ph}	6179,3	6181,1	1,8
	G ^{Ph}	6123,1	6124,8	1,7
	C ^{Ph}	6124,1	6126,2	2,1
	U ^{Ph}	6157,1	6159,1	2,0
324 nmol	A	6104,1	6105,8	1,7
	G	6048,1	6050,3	2,2
	C	6048,1	6049,9	1,8
	T	6095,1	6096,1	1,0
	A ^{Ph}	6179,3	6180,7	1,4
	G ^{Ph}	6123,1	6124,5	1,4
	C ^{Ph}	6124,1	6124,5	0,4
	U ^{Ph}	6157,1	6158,4	1,3

Naměřená molekulová hmotnost odpovídá teoretické molekulové hmotnosti. Na základě této informace lze říci, že enzymová syntéza proběhla správně.

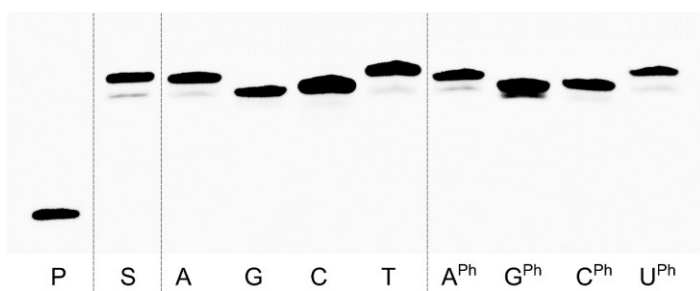
4.4. Analýza DNA po provedení purifikace vysokotlakou kapalinovou chromatografií

4.4.1. Analýza DNA polyakrylamidovou denaturační elektroforézou

Po provedení purifikace pomocí dialyzačních kolon a HPLC byly vzorky DNA ve větším měřítku znovu analyzovány na dPAGE, aby bylo vizuálně potvrzeno, že po purifikaci zůstal ve vzorku pouze produkt o správné délce 18 nt (viz obrázek 18 a 19, str. 50).



Obrázek 18: 20% dPAGE ve 162nmol měřítku. *P* označuje primer, *S* standard (vzorek produktu o délce 18 nukleotidů získaný z předchozí syntézy v semi-preparativním měřítku), písmena *A*, *G*, *C* a *T* odpovídají prvnímu inkorporovanému nukleotidu a značí přirozené produkty a N^{Ph} ($N = A, G, C, U$) značí vzorky, ve kterých první inkorporovaný nukleotid nese fenylovou skupinu a další tři jsou přirozené.

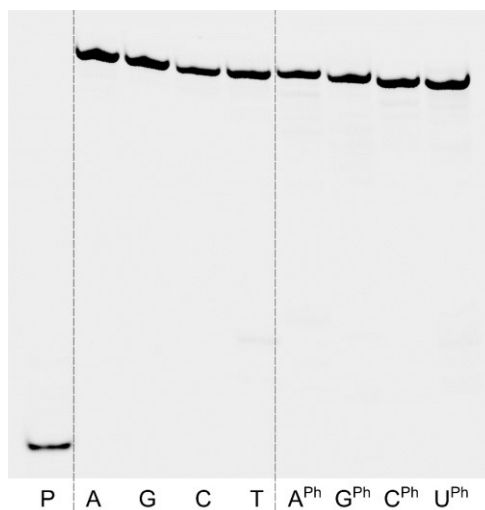


Obrázek 19: 20% dPAGE v 324nmol měřítku. *P* označuje primer, *S* standard (vzorek produktu o délce 18 nukleotidů získaný z předchozí syntézy v semi-preparativním měřítku), písmena *A*, *G*, *C* a *T* odpovídají prvnímu inkorporovanému nukleotidu a značí přirozené produkty a N^{Ph} ($N = A, G, C, U$) značí vzorky, ve kterých první inkorporovaný nukleotid nese fenylovou skupinu a další tři jsou přirozené.

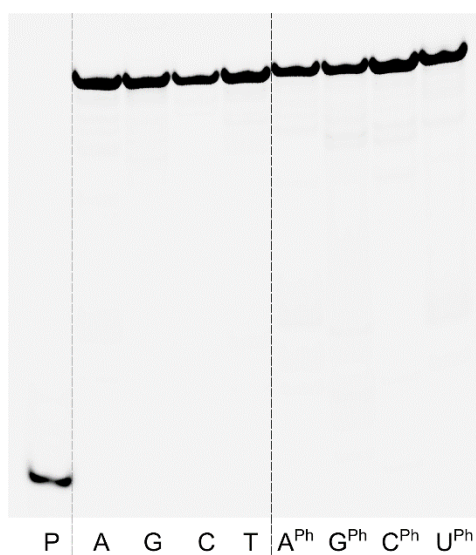
Dle výsledků dPAGE můžeme říci, že purifikace DNA proběhla úspěšně. Dle standardu o velikosti 18 nukleotidů lze vidět, že po provedení purifikace zůstal ve vzorku pouze žádaný produkt o velikosti 18 nukleotidů. Na gelech nejsou patrné prakticky žádné kratší fragmenty.

4.4.2. Analýza DNA polyakrylamidovou nativní elektroforézou

Pro kontrolu, že syntetizovaná DNA stále zaujímá dvoušroubovicovou strukturu, byla provedena nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (viz obrázek 20 a 21, str. 51). Při nativní elektroforéze nedochází k denaturaci DNA, tudíž je na nativním gelu, na rozdíl od denaturačního gelu, viditelná nativní forma DNA.



Obrázek 20: 20% polyakrylamidová nativní elektroforéza ve 162nmol měřítku, P označuje primer, písmena A, G, C a T odpovídají prvnímu inkorporovanému nukleotidu a označují přirozené produkty DNA. N^{Ph} ($N = A, G, C, U$) značí vzorky, ve kterých první inkorporovaný nukleotid nese fenylovou skupinu a další tři jsou přirozené.



Obrázek 21: 20% polyakrylamidová nativní elektroforéza v 324nmol měřítku, P označuje primer, písmena A, G, C a T odpovídají prvnímu inkorporovanému nukleotidu a označují přirozené produkty DNA. N^{Ph} ($N = A, G, C, U$) značí vzorky, ve kterých první inkorporovaný nukleotid nese fenylovou skupinu a další tři jsou přirozené.

Dle gelů je zřejmé, že modifikovaná DNA stále tvoří dvouvláknové struktury a nedochází vlivem modifikace k její denaturaci. To je dokázáno absencí pásů s vyšší mobilitou na nativním gelu.

4.5. Výpočet koncentrace a měření teploty denaturace DNA

Pro výpočet koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona a celkového výtěžku (viz tabulka 12) byl použit molární absorpční koeficient 6-FAM při absorpčním maximu 495 nm ($\epsilon_{495} = 75\,000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [58]. Každé nově syntetizované vlákno obsahuje fluorescenční značku 6-FAM, a proto koncentrace každé syntetizované DNA odpovídá koncentraci 6-FAM. Vzorky byly nejprve naředěny tak, aby měly podobnou absorbanci (viz obrázek 22 a 23, str. 53) a mohly být zároveň použity i pro porovnání denaturačních teplot přirozených a modifikovaných DNA.

Dle Lambert-Beerova zákona lze poté z naměřené absorbance vypočítat koncentraci 6-FAM podle vztahu:

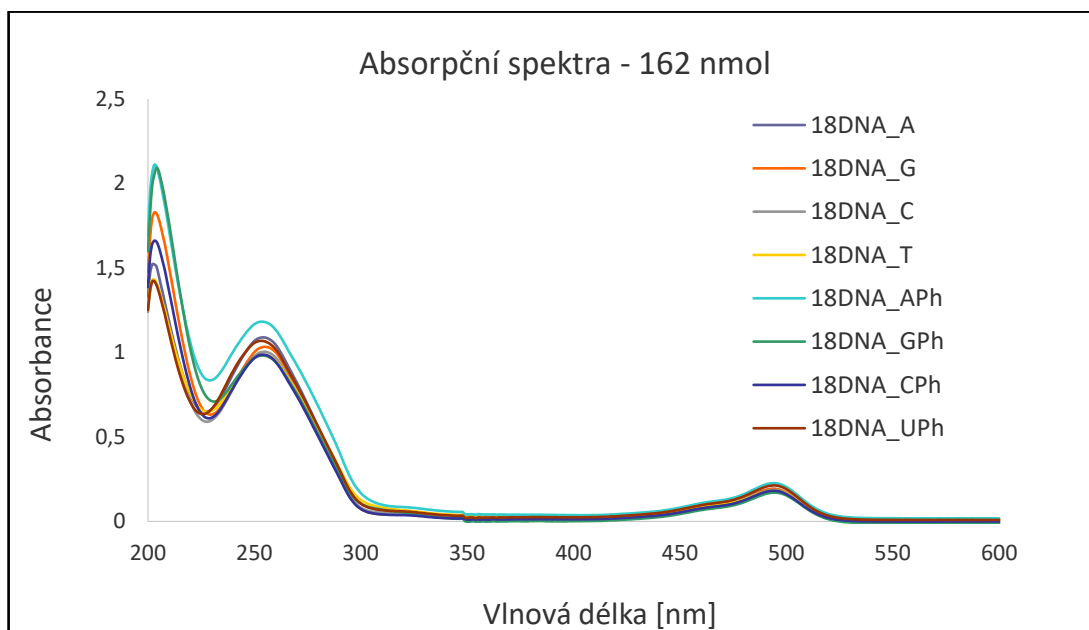
$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} \quad (\text{rovnice č. 4.1.})$$

kde A odpovídá absorbanci naměřené při 495 nm, ϵ molárnímu absorpčnímu koeficientu 6-FAM při 495 nm a l délce kyvety.

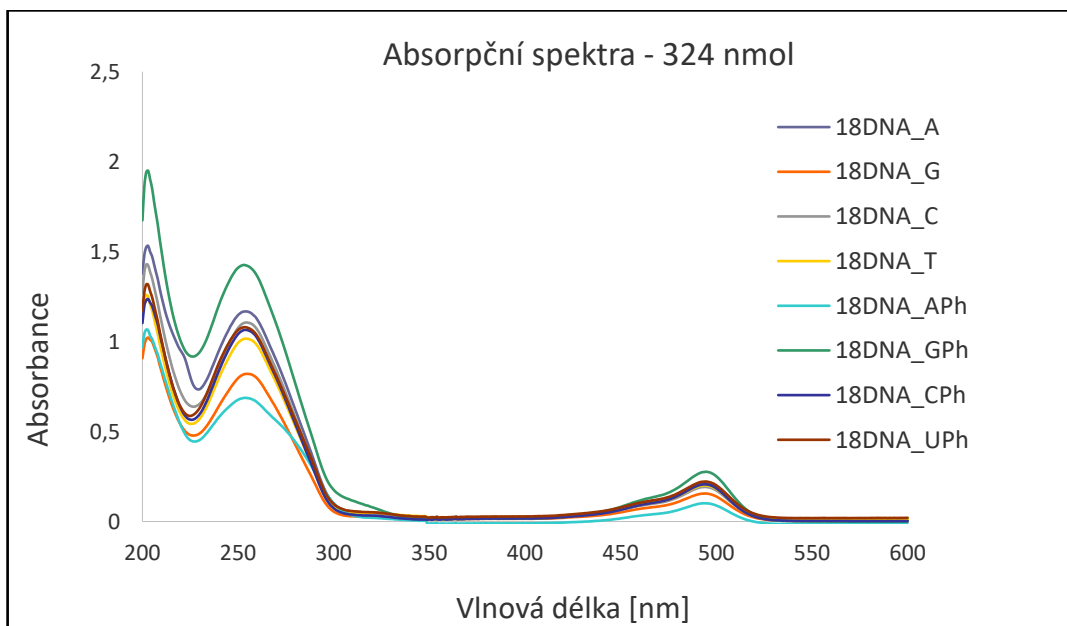
Tabulka 12: V tabulce je zobrazena naměřená absorbance (abs) jednotlivých vzorků DNA, ředění měřených vzorků, výpočet koncentrace ve 250 mL fosfátového pufru (c), výpočet hmotnosti (m), teoretická hmotnost produktů [m(teor.)] a celkový výtěžek spočítaný jako podíl stanovené a teoretické hmotnosti.

Měřítko	Vzorek	Abs	Ředění	c [mM]	m [mg]	m (teor.) [mg]	Výtěžek [%]
162 nmol	A	0.191070	111	0.283	0,817	1,870	44
	G	0.191505	101	0.258	0,744	1,870	40
	C	0.185405	151	0.373	1,075	1,870	57
	T	0.182083	67.7	0.164	0,473	1,870	25
	A ^{Ph}	0.225773	111	0.334	0,970	1,882	52
	G ^{Ph}	0.170004	67.7	0.153	0,444	1,882	24
	C ^{Ph}	0.181200	78	0.188	0,546	1,882	29
	U ^{Ph}	0.212383	92.7	0.263	0,763	1,880	41
324 nmol	A	0.216909	268.6	0.777	2,242	3,739	60
	G	0.155135	202	0.418	1,206	3,739	32
	C	0.191509	135.3	0.345	0,995	3,739	27
	T	0.200333	135.3	0.361	1,042	3,739	28
	A ^{Ph}	0.100927	287.7	0.387	1,124	3,763	30
	G ^{Ph}	0.276108	202	0.744	2,161	3,763	57
	C ^{Ph}	0.205941	268.6	0.738	2,143	3,763	57
	U ^{Ph}	0.221891	268.6	0.795	2,306	3,759	61

Hodnoty vypočtených koncentrací jsou u různých vzorků poměrně odlišné. Důvodem může být převážně ztráta části syntetizované DNA během separace a následném zpracování vzorků. Některé vzorky mohou být na HPLC separovány lépe než jiné. Kromě purifikace mohou být důvodem rozdílných koncentrací i lehce odlišné výtěžky enzymové syntézy.



Obrázek 22: Naměřená absorbance vzorků v rozmezí vlnové délky 200-600 nm ve 162nmol měřítku.



Obrázek 23: Naměřená absorbance vzorků v rozmezí vlnové délky 200-600 nm v 324nmol měřítku.

Na grafech absorpčních spekter je patrné, že vzorky DNA absorbují při 260 nm a při 495 nm. Při 260 nm má své absorpční maximum dvoušroubovice DNA. Při 495 nm absorbuje fluorescenční značka 6-FAM.

Tabulka 13: Teploty denaturace přirozené DNA, modifikované DNA a jejich rozdíl (ΔT).

Vzorky	Teplota denaturace přirozené DNA [°C]	Teplota denaturace modifikované DNA [°C]	ΔT [°C]
A, A^{Ph}	76,9	74,4	-2,5
G, G^{Ph}	74,6	72,7	-1,9
C, C^{Ph}	76,2	75,4	-0,8
T, U^{Ph}	77,6	77,2	-0,4

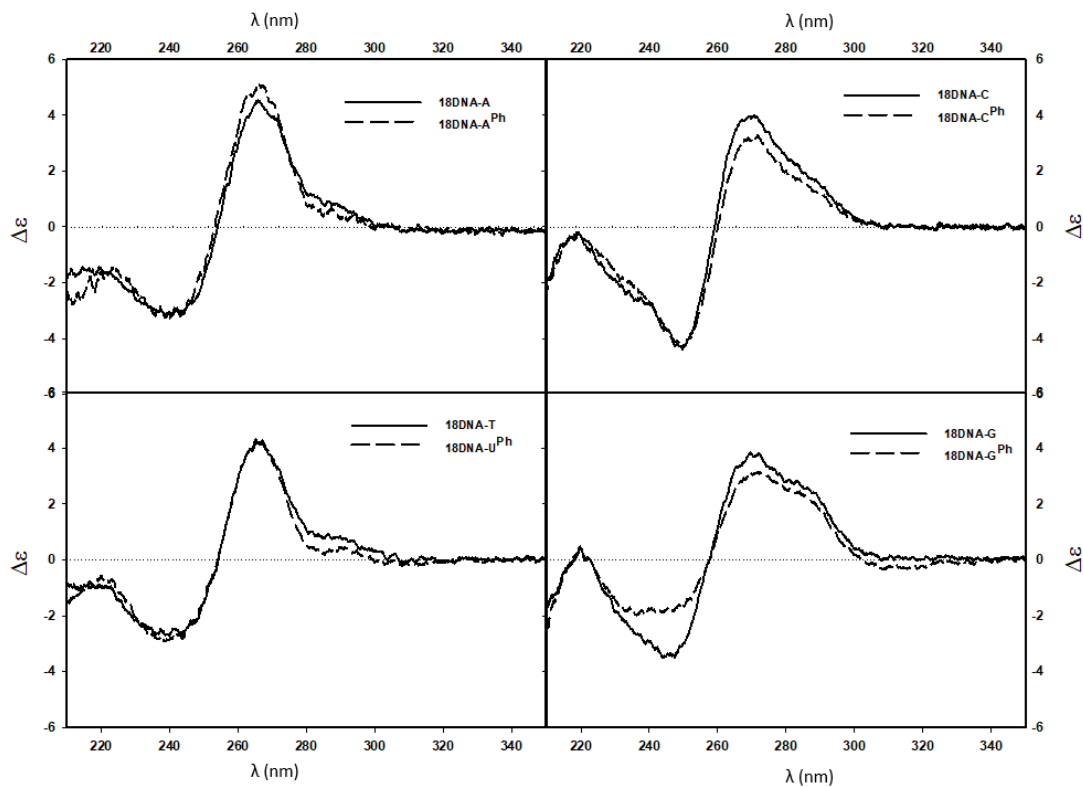
$$\Delta T = \frac{T_m(\text{modifikované DNA}) - T_m(\text{přirozené DNA})}{n}; n = 1 \text{ (počet modifikací)} \quad (\text{rovnice č. 4.2.})$$

Teplota denaturace DNA (viz tabulka 13) byla spočítána jako průměr ze tří měření s přímým odečtením pufru. Při porovnání sekvencí jednotlivých DNA (viz tabulka 2, str. 33) je patrné, že teplota denaturace přirozené DNA koresponduje s počtem cytosinů a guaninů v sekvenci. Čím více těchto bází je přítomno v sekvenci, tím vyšší je teplota denaturace. Důvodem jsou tři vodíkové vazby mezi těmito bázemi oproti dvěma vodíkovým vazbám mezi adeninem a thyminem.

Dále si lze všimnout, že teplota modifikované DNA je vždy nižší než teplota příslušné přirozené DNA. To znamená, že fenyl destabilizuje dvoušroubovici DNA. Modifikace na purinových bázích destabilizuje DNA více než modifikace na pyrimidinových bázích. Nejvíce dvoušroubovici destabilizuje fenyl vázaný na adenosinu a nejméně na uracilu.

4.6. Studium struktury modifikované DNA pomocí cirkulárního dichroismu

CD spektra studovaných nukleotidů mají negativní a pozitivní maxima v oblasti okolo 245 nm respektive 266 nm. Tento průběh je charakteristický pro B-konformaci DNA. Porovnáním CD křivek pro přirozenou a modifikovanou DNA lze zjistit, zda má fenylová modifikace ve struktuře DNA vliv na její konformaci (viz obrázek 24, str. 55).



Obrázek 24: Porovnání CD spekter přirozené DNA (plná čára) a k ní náležící modifikované DNA (čárkovaná čára). Na svislé ose je vynesena diferenciální molární extinkce ($\Delta\epsilon$) a na vodorovné ose vlnová délka (λ) v hodnotách od 210 nm do 350 nm.

Z porovnání tvaru křivek (viz obrázek 24) vyplývá, že modifikace má sice lehký vliv na prostorovou strukturu DNA, ale z celkového hlediska nedochází ke změně konformace DNA a modifikovaná DNA tak, stejně jako přirozená DNA, zaujímá B-konformaci.

5. Diskuze

Cílem této práce bylo exprimovat KOD(exo-) DNA polymerasu a následně ji využít pro syntézu DNA nesoucí fenylovou skupinu na bázi ve vysoké koncentraci, aby bylo možné DNA studovat pomocí spektroskopických metod, které by poskytly ucelenější a přesnější informace o vlivu modifikace na strukturu DNA. Syntéza modifikované DNA byla provedena metodou PEX. Pro účely práce byly použity nukleosid trifosfáty nesoucí fenylovou skupinu v pozici 5 u pyrimidinů a v pozici 7 u 7-deazapurinů. Již dříve byla reakce PEX prováděna i s puriny nesoucími fenylovou modifikaci v pozici 8. Tento nukleotid se však ze sterických důvodů ukázal jako špatný substrát pro polymerasy [59].

KOD(exo-) DNA polymerasa byla použita hned z několika důvodů. Prvním z nich je termostabilita, díky které je možné účinně provádět PEX a PCR. Další výhodou této polymerasy je snadná příprava v laboratoři čímž je možné provést syntézu DNA levněji než s použitím kupovaných polymeras. Kromě toho na rozdíl od jiných polymeras, například Taq polymerasy, dokáže inkorporovat modifikované nukleotidy do oligonukleotidového řetězce. Absence exonukleasové aktivity také napomáhá inkorporaci modifikovaných nukleotidů. Polymerasa byla exprimována v buňkách *E. coli* BL21-AI, které se běžně využívají pro expresi velkého množství rekombinantních nebo toxických proteinů. Následně byla polymerasa purifikována afinitní chromatografií.

Účinnost KOD(exo-) DNA polymerasy byla ověřena metodou PEX v semi-preparativním měřítku a metodou PCR. Polymerasa syntetizovala modifikovanou DNA se stejnou účinností jako přirozenou DNA, a proto mohla být následně použita pro PEX v preparativním měřítku. Pro metodu PEX byly použity 18 nukleotidů dlouhé templáty. Tato délka templátu by měla být optimální pro budoucí strukturní studie.

Při PEX v preparativním měřítku byla syntetizována DNA v miligramovém množství. Následně byla tato DNA purifikována, aby byla zajištěna dostatečná čistota zkoumaných vzorků, která je pro spektroskopické metody nezbytná. Dialýzou byly ze vzorku odstraněny soli, nezreagované dNTP a některé krátké fragmenty. Díky HPLC byla ze vzorku odstraněna převážně polymerasa.

Oproti tomu metoda PCR vykazovala lepší výsledky u přirozené DNA oproti modifikované DNA. Metoda PCR s nukleotidy nesoucími fenylovou skupinu byla ve skupině prof. Hocka provedena již dříve s DyNAzyme II DNA polymerasou. Stejně jako v případě užití KOD(exo-) DNA polymerasy byl výtěžek DNA nesoucí fenylovou skupinu nižší než v případě přirozené DNA [60]. PCR je oproti PEX komplikovanější,

dá se proto předpokládat, že amplifikace, dle již modifikovaného vlákna může být problematická.

Polyakrylamidové gely po HPLC ukázaly, že purifikací byly odstraněny nedosyntetizované fragmenty DNA, které by interferovaly při strukturních studiích. Nativní gely potvrdily, že všechny vzorky syntetizované DNA mají v přirozených podmínkách dvouvláknovou strukturu.

Vzhledem k tomu, že fenylyl je hydrofobní a elektronově bohatý aromát, by teoreticky bylo možné očekávat změnu konformace DNA. Již v dřívější publikaci ze skupiny prof. Hocka však bylo zjištěno, že ani v případě hypermodifikované DNA není její konformace změněna a zůstává ve své standardní B-konformaci [61]. Proto zjištění, že i modifikovaná DNA nesoucí fenylovou skupinu zůstává, stejně jako přirozená DNA, v B-konformaci, nebylo překvapující. Z teplotních studií, respektive stanovením teploty denaturace DNA, lze usoudit, že fenylová skupina destabilizuje dvoušroubovici DNA. Dle stanovených hodnot T_m duplex nejvíce destabilizuje fenylyl vázaný na adeninu a nejméně fenylyl vázaný na uracilu.

Z naměřené absorbance na UV-Vis spektrofotometru byla dopočítána reálná koncentrace, hmotnost a výtěžek. Celkový výtěžek DNA se obvykle pohyboval mezi 25 % a 60 %. Důvodem může být především ztráta během purifikace, zejména pak během separace a následného zpracování vzorků.

Podrobnější informace o struktuře budou předmětem rozsáhlejších studií, které jsou však již nad rámec bakalářské práce.

6. Závěr

- Byla provedena exprese a následná purifikace KOD(exo-) DNA polymerasy z buněk *E. coli* BL21-AI
- Účinnost KOD(exo-) DNA polymerasy při syntéze DNA nesoucí fenylovou skupinu byla potvrzena metodou PEX v semi-preparativním měřítku a metodou PCR
- DNA modifikovaná na bázích byla syntetizována v miligramovém měřítku
- Byla porovnána teplota denaturace přirozené DNA a modifikované DNA
 - Bylo zjištěno, že fenylová modifikace destabilizuje DNA, tudíž modifikovaná DNA má nižší teplotu denaturace než přirozená DNA
- Na CD spektrech bylo ověřeno, že modifikovaná DNA zůstává v B-konformaci, konformace modifikované DNA se tedy oproti přirozené DNA nemění

7. Použitá literatura

- [1] S. C. Tan a B. C. Yiap, „DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009.
- [2] D. Voet a J. G. Voet, *Biochemistry*, 3. vyd.; John Wiley & Sons, New Jersey, 2004.
- [3] J. D. Watson a F. Crick, „Molecular Structure of Nucleic Acids,” *Nature*, roč. 171, s. 737–738, 1953.
- [4] R. E. Franklin a R. G. Gosling, „Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate,” *Nature*, roč. 171, s. 740-741, 1953.
- [5] Struktura DNA, dostupné z URL:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg [cit. 4. 4. 2023]
- [6] Z. E. Richard Dickerson, H. R. Drew Benjamin N Conner, R. M. Wing Albert V Fratini a M. L. Kopka, „The Anatomy of A-, B-, and Z-DNA,” *Science*, roč. 216, s. 475-486, 1982.
- [7] J. B. Krall, P. J. Nichols, M. A. Henen, Q. Vicens a B. Vögeli, „Structure and Formation of Z-DNA and Z-RNA,” *Molecules*, roč. 28, č. 2, 2023.
- [8] Formy DNA, dostupné z URL:
https://www.mun.ca/biology/scarr/A_B_Z_DNA.html [cit. 29. 4. 2023]
- [9] B. E. Griffin, S. A. Todd a A. Rich, „A Synthesis of Ribothymidine-5'-pyrophosphate and its Conversion to Polyribothymidylic Acid,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 44, č. 11, s. 1123–1128, 1958.
- [10] C. B. Reese, „Oligo- and Poly-nucleotides: 50 Years of Chemical Synthesis,” *Organic & Biomolecular Chemistry*, roč. 3, č. 21, s. 3851–3868, 2005.
- [11] R. L. Letsinger a W. B. Lunsford, „Synthesis of Thymidine Oligonucleotides by Phosphite Triester Intermediates,” *Journal of American Chemical Society*, roč. 98, č. 12, s. 3655–3661, 1976.
- [12] T. Dorper a E.-L. Winnacker, „Improvements in the Phosphoramidite Procedure for the Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides,” *Nucleic Acids Research*, roč. 11, s. 2575–2584, 1983.
- [13] M. H. Caruthers, S. L. Beaucage, J. W. Efcavitch, E. F. Fisher, M. D. Matteucci a Y. Stabinsky, „New Chemical Methods for Synthesizing Polynucleotides,” *Nucleic Acids Symposium Series*, č. 7, s. 215–223, 1980.
- [14] H. A. White, „Manual Oligonucleotide Synthesis Using the Phosphoramidite Method,” *Methods in Molecular Biology*, roč. 4, s. 193–213, 1988.
- [15] A. F. Sandahl, T. J. D. Nguyen, R. A. Hansen, M. B. Johansen, T. Skrydstrup a K. V. Gothelf, „On-demand Synthesis of Phosphoramidites,” *Nature Communications*, roč. 12, č. 1, 2021.

- [16] S. Ni *et al.*, „Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes,” *International Journal of Molecular Sciences*, roč. 18, č. 8, 2017.
- [17] S. Roy a M. Caruthers, „Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries,” *Molecules*, roč. 18, č. 11, s. 14268–14284, 2013.
- [18] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molweuxii a H. G. Khorana, „Studies on Polynucleotides XCVI. Repair Replications of Short Synthetic DNA’s as catalyzed by DNA Polymerases,” *Journal of Molecular Biology*, roč. 56, č.2, s. 341–361, 1971.
- [19] 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, s. 24, 2014.
- [20] F. Eckstein a J. B. Thomson, „Phosphate Analogs for Study of DNA Polymerases,” *Methods in Enzymology*, roč. 262, s. 189–202, 1995.
- [21] J. E. Masse, P. Bortmann, T. Dieckmann a J. Feigon, „Simple, Efficient Protocol for Enzymatic Synthesis of Uniformly ¹³C-, ¹⁵N-labeled DNA for Heteronuclear NMR Studies,” *Nucleic Acids Research*, roč. 26, č. 11, s. 2618–2624, 1998.
- [22] M. Hocek, „Příprava DNA s modifikovanými bázemi enzymatickou inkorporací modifikovaných nukleosid-trifosfátů,” *Chemické Listy*, roč. 325, s. 320–325, 2014.
- [23] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn a H. Erlich, „Specific Enzymatic Amplification of DNA *in vitro*: the Polymerase Chain Reaction,” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, roč. 51, s. 263-273, 1986.
- [24] J. Van Ness, L. K. Van Ness a D. J. Galas, „Isothermal Reactions for the Amplification of Oligonucleotides,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, roč. 15, č. 8, s. 4504–4509, 2003.
- [25] R. L. Guyer a D. E. Koshland, „The Molecule of the Year,” *Science*, roč. 246, s. 1543–1546, 1989.
- [26] D. L. Nelson a M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4. vyd.; W. H. Freeman & Company, New York, 2005.
- [27] W. Rychlik, W. J. Spencer a R. E. Rhoads, „Optimization of the Annealing Temperature for DNA Amplification *in vitro*,” *Nucleic Acids Research*, roč. 18, č. 21, s. 6409–6412, 1990.
- [28] M. Kuwahara a N. Sugimoto, „Molecular Evolution of Functional Nucleic Acids with Chemical Modifications,” *Molecules*, roč. 15, č. 8, s. 5423–5444, 2010.
- [29] M. Takagi *et al.*, „Characterization of DNA Polymerase from *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 and its Application to PCR,” *Applied and Environmental Microbiology*, roč. 63, č. 11, s. 4504–4510, 1997.

- [30] P. Raia, M. Delarue a L. Sauguet, „An Updated Structural Classification of Replicative DNA Polymerases,” *Biochemical Society Transactions*, roč. 47, č. 1, s. 239–249, 2019.
- [31] E. Delagoutte, „DNA polymerases: Mechanistic Insight from Biochemical and Biophysical Studies,” *Frontiers in Bioscience*, roč. 12, č. 2, s. 509–544, 2012.
- [32] F. B. Perler, S. Kumar a H. Kong, „Thermostable DNA polymerases,” *Advances in Protein Chemistry*, roč. 48, s. 377–435, 1996.
- [33] N. M. Hoitsma, A. M. Whitaker, M. A. Schaich, M. R. Smith, M. S. Fairlamb a B. D. Freudenthal, “Structure and Function Relationships in Mammalian DNA polymerases,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, roč. 77, č. 1, s. 35–59, 2020.
- [34] D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong a T. A. Steitz, „Structure of Large Fragments of *Escherichia coli* DNA Polymerase I complexed with dTMP,” *Nature*, roč. 313, s. 762–766, 1985.
- [35] M. Nishioka *et al.*, „Long and Accurate PCR with a Mixture of KOD DNA polymerase and its Exonuclease Deficient Mutant Enzyme,” *Journal of Biotechnology*, roč. 88, č. 2, s. 141–149, 2001.
- [36] H. Hoshino *et al.*, “Consecutive Incorporation of Functionalized Nucleotides with Amphiphilic Side Chains by Novel KOD Polymerase Mutant,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, roč. 26, č. 2, s. 530–533, 2016.
- [37] H. M. Kropp, K. Diederichs a A. Marx, „The Structure of an Archaeal B-Family DNA Polymerase in Complex with a Chemically Modified Nucleotide,” *Angewandte Chemie - International Edition*, roč. 58, č. 16, s. 5457–5461, 2019.
- [38] M. Kuwahara *et al.*, „Systematic Characterization of 2'-Deoxynucleoside- 5'-Triphosphate Analogs as Substrates for DNA Polymerases by Polymerase Chain Reaction and Kinetic Studies on Enzymatic Production of Modified DNA,” *Nucleic Acids Research*, roč. 34, č. 19, s. 5383–5394, 2006.
- [39] M. Kuwahara *et al.*, „Study on Suitability of KOD DNA Polymerase for Enzymatic Production of Artificial Nucleic Acids using Base/Sugar Modified Nucleoside Triphosphates,” *Molecules*, roč. 15, č. 11, s. 8229–8240, 2010.
- [40] C. Huber, J. von Watzdorf a A. Marx, „5-Methylcytosine-sensitive Variants of *Thermococcus kodakaraensis* DNA Polymerase,” *Nucleic Acids Research*, roč. 44, č. 20, s. 9881–9890, 2016.
- [41] M. K. Bilyard, S. Becker a S. Balasubramanian, „Natural, Modified DNA Bases,” *Current Opinion in Chemical Biology*, roč. 57, s. 1–7, 2020.
- [42] S. Koizume, H. Inoue, H. Kamiya a E. Ohtsuka, „Neighboring Base Damage Induced by Permanganate Oxidation of 8-Oxoguanine in DNA.” *Nucleic Acids Research*, roč. 26, č. 15, s. 3599, 1998.
- [43] J. Tuo, L. Liu, H. E. Poulsen, A. Weimann, O. Svendsen a S. Loft, “Importance of Guanine Nitration and Hydroxylation in DNA *in vitro* and *in vivo*,” *Free Radical Biology and Medicine*, roč. 29, č. 2, s. 147–155, 2000.

- [44] G. Boysen, B. F. Pachkowski, J. Nakamura a J. A. Swenberg, "The Formation and Biological Significance of N7-guanine Adducts," *Mutation Research*, roč. 678, č. 2, s. 76–94, 2009.
- [45] A. Hofer, Z. J. Liu a S. Balasubramanian, "Detection, Structure and Function of Modified DNA Bases," *Journal of the American Chemical Society*, roč. 141, č. 16, s. 6420–6429, 2019.
- [46] J. Šponer, I. Berger, N. Špacková, J. Leszczynski a P. Hobza, „Aromatic Base Stacking in DNA: From ab initio Calculations to Molecular Dynamics Simulations,” *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, roč. 17, s. 1–24, 2012.
- [47] H. Macíčková-Cahová a M. Hocek, „Cleavage of Adenine-Modified Functionalized DNA by Type II Restriction Endonucleases,” *Nucleic Acids Research*, roč. 37, č. 22, s. 7612–7622, 2009.
- [48] M. Mačková, S. Boháčová, P. Perlíková, L. Poštováslavětínská a M. Hocek, „Polymerase Synthesis and Restriction Enzyme Cleavage of DNA Containing 7-Substituted 7-Deazaguanine Nucleobases,” *ChemBiochem*, roč. 16, č. 15, s. 2225–2236, 2015.
- [49] H. Macíčková-Cahová, R. Pohl a M. Hocek, „Cleavage of Functionalized DNA Containing 5-Modified Pyrimidines by Type II Restriction Endonucleases,” *ChemBioChem*, roč. 12, č. 3, s. 431–438, 2011.
- [50] J. Vanloon, T. Harroun a H. Yan, „Circular Dichroism Spectroscopy of DNA Duplexes at Near-Biological Concentrations,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, roč. 43, 2021.
- [51] G. M. Blackburn *et al.*, „Physical and Structural Techniques Applied to Nucleic Acids,” *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 4.vyd.; The Royal Society of Chemistry, 2022
- [52] A. Leimbach, J. Hacker a U. Dobrindt, „*E. coli* as an All-rounder: The Thin Line between Commensalism and Pathogenicity,” *Current Topics in Microbiology and Immunology*, roč. 358, s. 3–32, 2013.
- [53] N. Bhawsinghka, K. F. Glenn a R. M. Schaaper, „Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BL21-AI,” *Microbiology Resource Announcements*, roč. 9, č. 10, 2020.
- [54] M. Chamberlin a J. Ring, „Characterization of T7-specific Ribonucleic Acid Polymerase,” *Journal of Biological Chemistry*, roč. 248, č. 6, s. 2235–2244, 1973.
- [55] J. C. Samuelson, „Recent Developments in Difficult Protein Expression: A Guide to *E. coli* Strains, Promoters, and Relevant Host Mutations,” *Methods in Molecular Biology*, roč. 705, s. 195–209, 2011.

- [56] Y. Zhang, L. Taiming a J. Liu, „Low Temperature and Glucose Enhanced T7 RNA Polymerase-based Plasmid Stability for Increasing Expression of Glucagon-like Peptide-2 in *Escherichia coli*,” *Protein Expression and Purification*, roč. 29, č. 1, s. 132–139, 2003.
- [57] H. Karunanathie, P. S. Kee, S. F. Ng, M. A. Kennedy a E. W. Chua, „PCR Enhancers: Types, Mechanisms, and Applications in Long-range PCR,” *Biochimie*, roč. 197, s. 130–143, 2022.
- [58] Molární absorpční koeficient 6-FAM, dostupné z URL: <https://eu.idtdna.com/site/catalog/modifications/product/1108> [cit. 30. 4. 2023]
- [59] H. Cahová, R. Pohl, L. Bednárová, K. Nováková, J. Cvačka a M. Hocek, „Synthesis of 8-Bromo-, 8-Methyl- and 8-Phenyl-dATP and their Polymerase Incorporation into DNA,” *Organic and Biomolecular Chemistry*, roč. 6, č. 20, s. 3657–3660, 2008.
- [60] V. Raindlová *et al.*, “Influence of Major-groove Chemical Modifications of DNA on Transcription by Bacterial RNA Polymerases,” *Nucleic Acids Research*, roč. 44, č. 7, s. 3000–3012, 2016.
- [61] M. Ondruš *et al.*, „Enzymatic Synthesis of Hypermodified DNA Polymers for Sequence-specific Display of Four Different Hydrophobic Groups,” *Nucleic Acids Research*, roč. 48, č. 21, s. 11982–11993, 2020.