

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**

**Katedra organické chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science**

**Department of Organic Chemistry**

Doktorský studijní program: Organická chemie

Ph.D. Study program: Organic Chemistry

Autoreferát dizertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



Nové funkcionalizované nukleové kyseliny pro aplikaci v chemické biologii

New functionalized nucleic acids for application in chemical biology

**Ing. Pavel Kielkowski**

Školitel/Supervisor: Prof. Ing. Michal Hocek CSc., DSc.

Praha, 2014

## Abstract

This work is focused on the synthesis of the modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates, their incorporation into DNA and use in chemical biology applications. The synthetic routes to the double-headed nucleosides and nucleotide triphosphates in which the two nucleobases were connected via ethynyl or propargyl linker has been developed. (Cytosin-5-yl)ethynyl, 3-(cytosin-1-yl)prop-1-yn-1-yl and 3-(5-fluorocytosin-1-yl)prop-1-yn-1-yl derivatives of pyrimidine and 7-deazaadenine 2'-deoxyribonucleosides and nucleoside triphosphates were prepared by aqueous palladium-catalyzed cross-coupling reactions. The double-headed modified nucleoside triphosphates were good substrates for DNA polymerases suitable for primer extension and PCR construction of DNA bearing linked cytosine or 5-fluorocytosine in the major groove mimicking the flipped-out nucleotide. The assay for the testing of the inhibition of DNA methyltransferases was developed. Next, the transient protection of DNA against cleavage by restriction endonucleases (REs) using (trialkylsilyl)ethynyl modified DNA was developed. A series of 7-(trialkylsilyl)ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenosine triphosphates was prepared and they were shown to be incorporated into DNA by primer extension and/or PCR using KOD XL polymerase. The deprotection conditions of the trialkylsilyl protecting groups were optimized on model nucleoside monophosphates. The ability to protect the DNA against cleavage by REs by using (trialkylsilyl)ethynyl modifications was tested. It was found that the (triethylsilyl)ethynyl-protected DNA resists the cleavage by RE, but after it is treated with NH<sub>3</sub>, the resulting deprotected ethynyl-modified DNA is fully cleavable by the REs. This 7-(triethylsilyl)ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenosine triphosphate was also used in a PCR-based synthesis of a gene internally protected against cleavage by restriction endonucleases. The unmodified flanking regions were cleaved for cloning into a plasmid which was replicated by *E. coli*, and used for protein production. Finally, a series of 7-substituted 7-deazaadenine and 5-substituted cytosine 2'-deoxyribonucleoside triphosphates were tested for their competitive incorporations into DNA by several DNA polymerases by using analysis based on cleavage by restriction endonucleases. 7-Aryl-7-deaza-2'-deoxyadenosine triphosphates were shown to be more efficient substrates than dATP because of their higher affinity for the active site of the enzyme, as proved by kinetic measurements and calculations.

## Abstrakt

Tato práce je zaměřena na syntézu modifikovaných 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů, jejich inkorporaci do DNA a aplikaci v chemické biologii. Byla vyvinuta syntéza "dohlavých" nukleosidů a nukleosid trifosfátů, které obsahují ethynylový nebo propargylový můstkem mezi dvěmi bázemi. (Cytosin-5-yl)ethynyl, 3-(cytosin-1-yl)prop-1-yn-1-yl a 3-(5-fluorcytosin-1-yl)prop-1-yn-1-yl substituované pyrimidiny a 7-deazaadeniny 2'-deoxyribonukleosidů a nukleosid trifosfátů byly připraveny palladiem katalyzovanou cross-coupling reakcí ve vodném prostředí. Tyto 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty obsahující dvě nukleobáze jsou dobrými substráty pro DNA polymerasy v primer extension reakci a PCR a tudíž vhodné pro přípravu DNA s cytosinem nebo 5-fluorcytosinem ve velkém žlábků, která tak napodobuje nukleobázi vyjmutou ven z DNA dvoušroubovice. Byla také vyzkoušena metoda pro testování inhibice DNA methyltransferáz. Dále, bylo vyvinuto přechodné chránění DNA proti štěpení restričními endonukleázami (RE) za pomoci (trialkylsilyl)ethynyl modifikované DNA. Bylo dokázáno, že všechny připravené (trialkylsilyl)ethynyl-modifikované 7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfáty se inkorporují do DNA KOD XL polymerásou v primer extension reakci a nebo pomocí PCR. Podmínky potřebné pro odchránění trialkylsilylové chránicí skupiny byly optimalizovány na nukleosid monofosfátech. Rovněž byla testována schopnost (trialkylsilyl)ethynyl modifikované DNA chránit tuto DNA proti štěpení RE. Zjistili jsme, že DNA chráněná (triethylsilyl)ethynylovou skupinou nepodléhá štěpení pomocí RE, po odchránění triethylsilylové skupiny amoniakem výsledná ethynyl modifikovaná DNA již štěpena RE je. Tento 7-(triethylsilyl)ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfát byl také použit při přípravě genu částečně chráněného proti štěpení RE. Pro přípravu byla použita vlastní nová metoda založená na PCR. V genu neobsažené nemodifikované sekvence byly dále použity pro klonování do plasmidu, jenž byl následně replikován v *E. coli* a použit pro produkci proteinu. A konečně, série 7-substituovaných 7-deazaadenin a 5-substituovaných cytosin 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů byla testována v přímé kompetitivní inkorporaci do DNA pomocí řady DNA polymeras. K analýze byla použita metoda založená na štěpení RE. Ukázalo se, že 7-aryl-7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfáty jsou lepšími substráty pro DNA polymerasy než přirozená dATP. Zmíněná zjištění byla dále potvrzena měřením kinetik a modelováním.

## Obsah - Contents

<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>Obsah - Contents .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Specific aims of the thesis .....</b>	<b>7</b>
<b>3 Results and discussion .....</b>	<b>7</b>
3.1 Synthesis of Double-Headed Nucleosides and Nucleotides, Their Enzymatic Incorporation, and Interactions with DNA Methyltransferases .....	7
3.2 Transient and Switchable Protection of DNA Against Cleavage by Restriction Endonucleases by (Trialkylsilyl)ethynyl-Modified 7-Deazaadenines .....	11
3.3 Nucleobase Protection Strategy for Gene Cloning and Expression .....	14
3.4 Study of Direct Competition Incorporations of 7-Substituted 7-Deazaadenine and 5-Substitute Cytosine 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphates in the Presence of Their Natural Counterparts .....	17
<b>4 Conclusion.....</b>	<b>23</b>
<b>5 References .....</b>	<b>25</b>
<b>1 Úvod .....</b>	<b>26</b>
<b>2 Cíle práce .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>27</b>
3.1 Syntéza “dvouhlavých” nukleosidů a nukleotidů, enzymatická jejich inkorporace a interakce s DNA methyltransferasami .....	27
3.2 Přechodné a přepínatelné chránění DNA proti štěpení restričními endonukleázami za pomoci (trialkylsilyl)ethynyl modifikovaných 7-deazaadeninů 31	
3.3 Využití chráněných nukleobází při klonování genů a expresi .....	34
3.4 Studium kompetitivních inkorporací 7-substituovaných 7-deazaadenin a 5- substituovaných cytosin 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů v přítomnosti jejich přirozených protějšků.....	37
<b>4 Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>5 Použitá literatura .....</b>	<b>45</b>
<b>Seznam publikací vztahujících se k této práci - List of publications of the author related to the thesis .....</b>	<b>46</b>

<b>Konferenční příspěvky - Conference contributions .....</b>	<b>46</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>47</b>

# 1 Introduction

Structure of deoxyribonucleic acid (DNA) was deciphered by James Watson and Francis Crick. Since then the acquired knowledge of structure, physical and chemical properties and function of DNA has had tremendous impact to the development of nowadays medicine, molecular biology, chemical biology and chemistry.

Also, a vast number of nucleosides and nucleotides bearing modified bases have been designed and prepared. Many display significant biological activity, while others are used for applications in chemical biology, such as nucleic acid sequencing,<sup>1</sup> labeling,<sup>2</sup> investigation of nucleic-acid structure<sup>3</sup> and protein-nucleic acid interactions.<sup>4</sup>

The functionality can be attached to the nucleobase for instance by aqueous palladium-catalyzed reaction<sup>5</sup> of corresponding halogenated 2'-deoxyribonucleoside triphosphates with terminal alkynes, alkenes or arylboronic acids.

DNAs could be prepared by chemical or enzymatic synthesis. In the enzymatic approach DNA polymerases incorporate modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates into DNA. Several DNA polymerases were tested and possess desirable properties. The scope of the modified nucleotides which are incorporated by DNA polymerases is very wide. In general, the modifications are coupled with the nucleobases via linker into the 7 position of the 7-deazapurines and 5 position of pyrimidines and after the incorporation to DNA duplex the modification is directed towards the major groove.

DNA methyltransferase play an important role in transcription regulation. They add methyl group to 5 position of cytosine bases. They access the target nucleobase by flipping it out of the DNA duplex into its active site and create a DNA-methyltransferase covalent complex.<sup>6</sup> This complex is irreversible if the DNA contains the 5-aza or 5-fluoro-2'-deoxycytidine within the CpG sites.

Restriction endonucleases are used in manipulation of large DNAs and cloning. They recognize in DNA short palindromic sequences in which they cleave phosphodiester bond.<sup>7</sup> In the Hocek group it was found that some smaller modifications of nucleobases are tolerated by some restriction endonucleases while more bulky modifications inhibit most of the restriction endonucleases.<sup>4a,8</sup>

## 2 Specific aims of the thesis

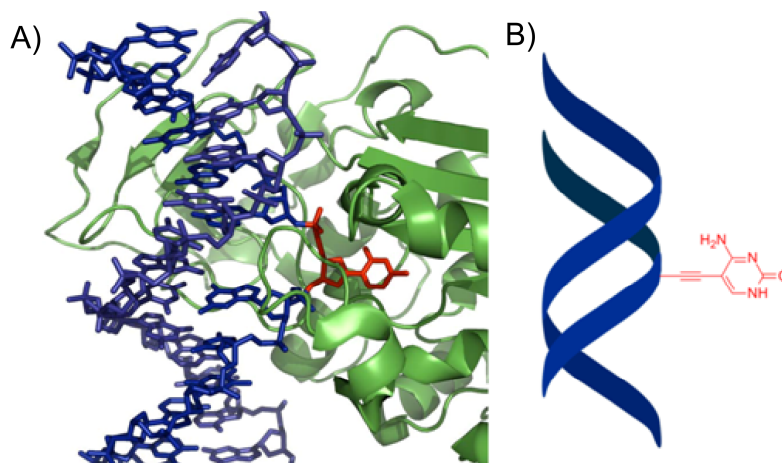
1. Synthesis of modified 2'-deoxyribonucleosides and nucleotides substituted in 5-position of pyrimidines and 7-position of 7-deazaadenine with another nucleobase, study on their enzymatic incorporation into DNA and investigation of these modified DNAs interactions with DNA methyltransferases.
2. Synthesis of the series of (trialkylsilyl)ethynyl-modified 7-deaza-2'-deoxyadenosines and corresponding triphosphates.
3. Development of the methodology for transient protection of DNA against the cleavage by restriction endonucleases and application of this method in gene cloning and protein expression.
4. Study of competitive incorporations of modified 2'-deoxynucleosides triphosphates in presence of their natural counterparts.

## 3 Results and discussion

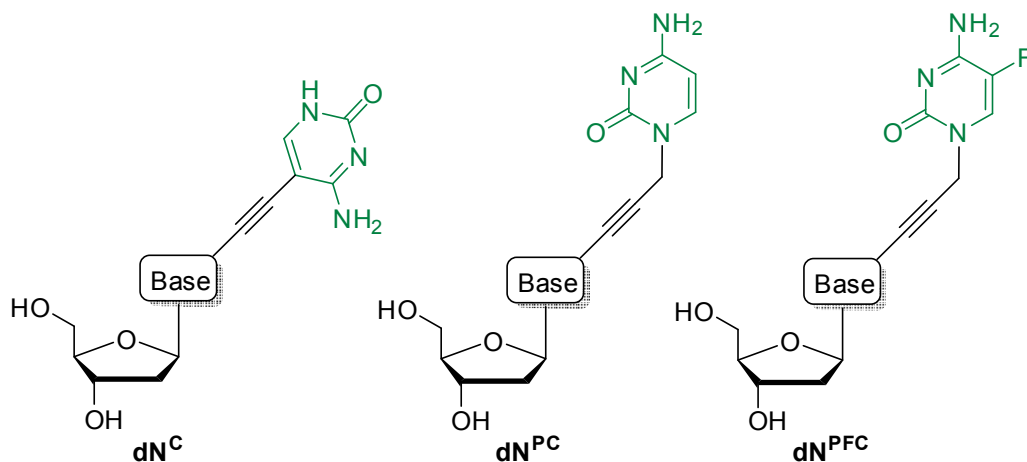
### 3.1 Synthesis of Double-Headed Nucleosides and Nucleotides, Their Enzymatic Incorporation, and Interactions with DNA Methyltransferases

DNA methyltransferases play an important role in transcription regulation and DNA repair. They employ the base flipping mechanism during which the whole nucleotide is flipped out of the DNA duplex into the active site of the enzyme. We envisaged that DNA containing double-headed (**Figure 1**) nucleotides might mimic this flipped out state and thus interact or inhibit these enzymes. Three small series of the double-headed nucleosides (**Figure 2**) and nucleotides were prepared. The rationale for the 5-fluorocytosine derivative is that it might employ the same mechanism as 5-fluoro-2'-deoxycytidine, thus covalently and irreversibly bind to the methyltransferase which would lead to inhibition of the methylation process. Therefore, I focused on the

synthesis of the double-headed 2'-deoxynucleosides and nucleotides which after incorporation into DNA might interact with DNA methyltransferases.



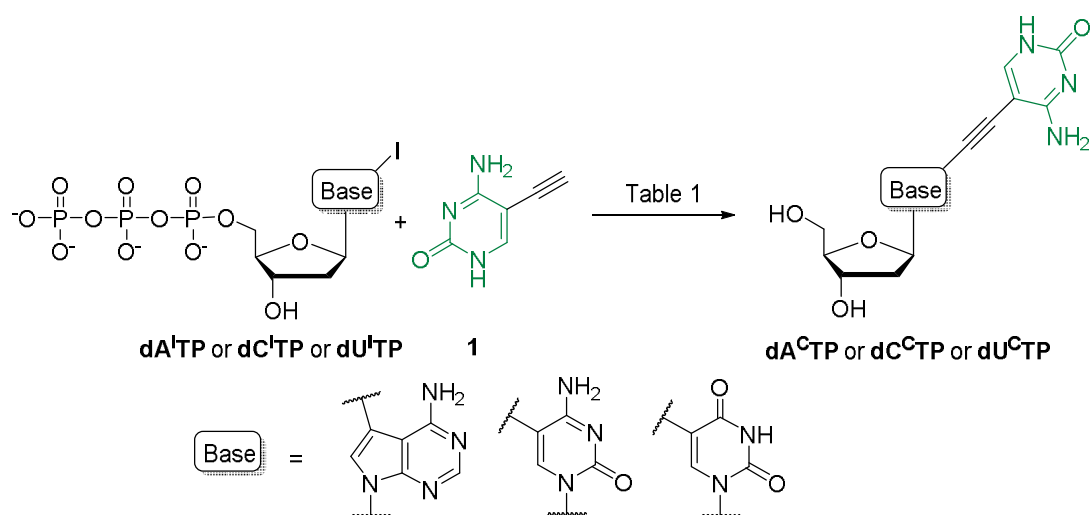
**Figure 1** (A) Nucleotide (red) flipped out of the DNA duplex (blue) by DNA methyltransferase (green). (B) DNA bearing another cytosine base in the major groove.



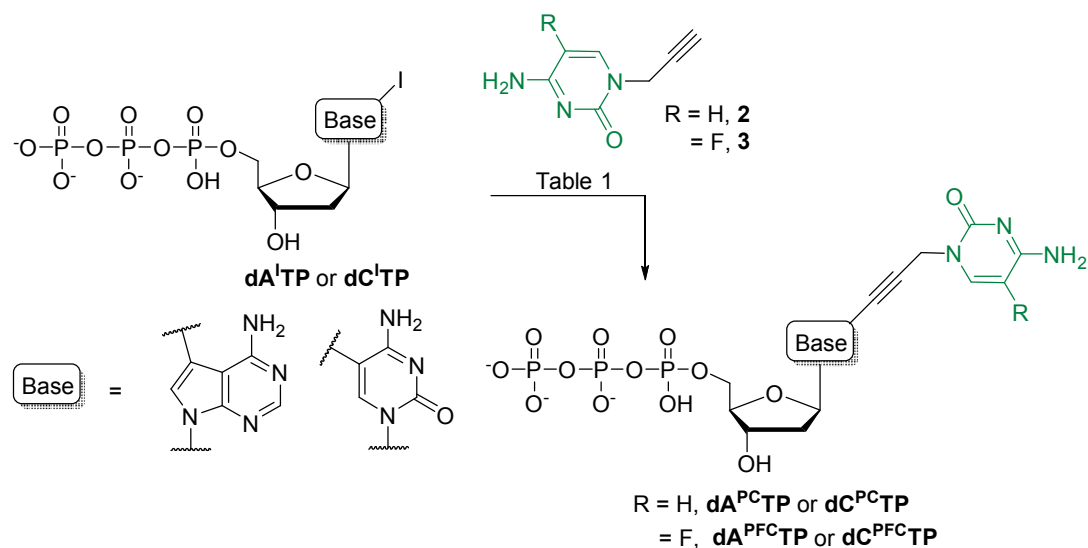
**Figure 2** Double-headed 2'-deoxyribonucleosides.

Synthetic methodology we have chosen consisted of Sonogashira cross-coupling of 5-ethynylcytosine (**1**) or 1-*N*-(prop-2-yn-1-yl)cytosine (**2**) or 5-fluoro-1-*N*-(prop-2-yn-1-yl)cytosine (**3**) with halogenated nucleosides (summarized in **Table 1**) and nucleotides (**Scheme 1** and **Scheme 2**). The Sonogashira cross-coupling reactions of **1,2** and **3** with  $\text{dC}^{\text{I}}\text{TP}$ ,  $\text{dU}^{\text{I}}\text{TP}$  or  $\text{dA}^{\text{I}}\text{TP}$  were performed under previously optimized aqueous conditions in  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  1:2 in presence of catalyst  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{CuI}$ , TPPTS as a ligand and  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  as a base at 80 °C for 1 h. All the cytosine modified  $\text{dN}^{\text{C}}\text{TPs}$ ,  $\text{dN}^{\text{PC}}\text{TPs}$  and  $\text{dN}^{\text{PFC}}\text{TPs}$  were prepared in reasonable yields (**Table 1**).





**Scheme 1.** Synthesis of the 5-ethynylcytosine modified  $\text{dN}^{\text{C}}\text{TPs}$ .



**Scheme 2.** Synthesis of 1-*N*-(prop-2-yn-1-yl)cytosine modified  $\text{dN}^{\text{PC}}\text{TPs}$  and  $\text{dN}^{\text{PFC}}\text{TPs}$ .

All the cytosine modified  $\text{dN}^{\text{C}}\text{TPs}$ ,  $\text{dN}^{\text{PC}}\text{TPs}$  and  $\text{dN}^{\text{PFC}}\text{TPs}$  were tested as substrates for KOD XL DNA polymerase in PEX. We have designed several different templates with different number of modifications in the resulting DNA. All the  $\text{dN}^{\text{XC}}\text{TPs}$  were very good substrates giving with all templates full-length products. I also found that all of the  $\text{dN}^{\text{XC}}\text{TPs}$  tested are good substrates for DNA polymerases in PCR as well.

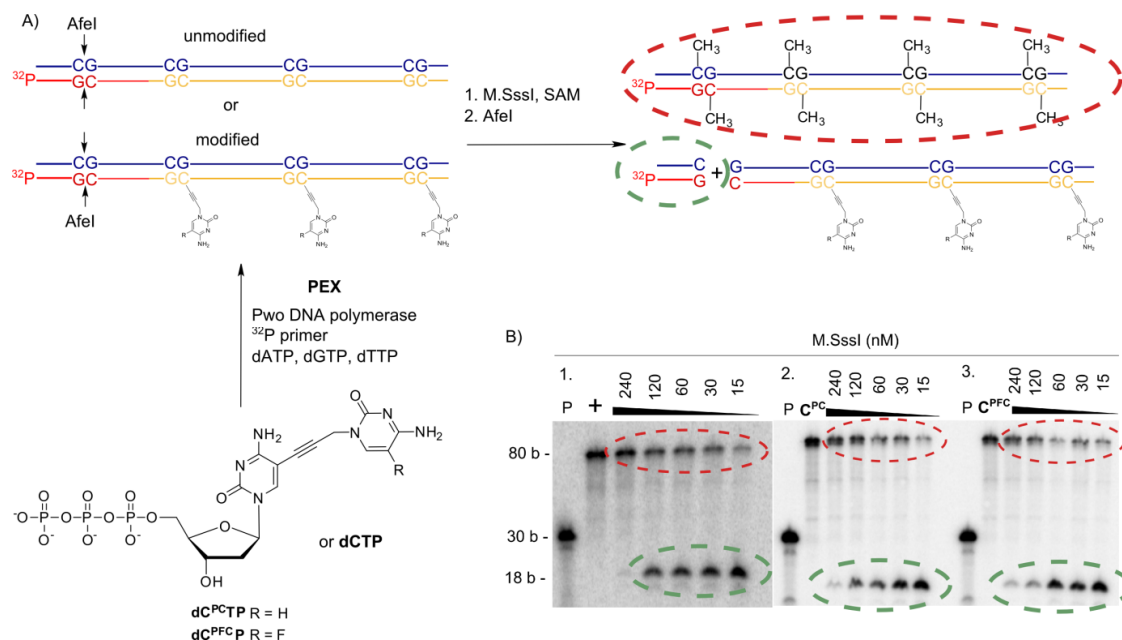
**Table 1.** Cross-coupling reaction conditions of idonucleos(t)ides with alkynylcytosine derivatives.

Entry	dN <sup>I</sup> /dN <sup>I</sup> TP	Catalyst	Solvent	Conditions [°C, h]	Product	Yield (%)
1 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>C</sup></b>	49
2 <sup>b</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>C</sup></b>	73
3 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 0.5 h	<b>dC<sup>PC</sup></b>	30
4 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 0.1 h	<b>dC<sup>PFC</sup></b>	95
5 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	50 °C, 1 h	<b>dU<sup>C</sup></b>	40 <sup>c</sup>
6 <sup>b</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	50 °C, 1 h	<b>dU<sup>C</sup></b>	60 <sup>d</sup>
7 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dFP<sup>C</sup></b>	30
8 <sup>b</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	80 °C, 1 h	<b>dFP<sup>C</sup></b>	78
9 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	50 °C, 1 h	<b>dU<sup>PC</sup></b>	95
10 <sup>b</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	50 °C, 0.5 h	<b>dU<sup>PFC</sup></b>	69
11 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>C</sup></b>	38
12 <sup>b</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>C</sup></b>	51
13 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 0.5 h	<b>dA<sup>PC</sup></b>	61
14 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>PFC</sup></b>	58
15 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>C</sup>TP</b>	35
16 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1.5 h	<b>dC<sup>PC</sup>TP</b>	30
17 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>PFC</sup>TP</b>	80
18 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dU<sup>C</sup>TP</b>	31
19 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	105 °C, 1 h	<b>dA<sup>C</sup>TP</b>	17
20 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>PC</sup>TP</b>	80
21 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>PFC</sup>TP</b>	43

<sup>a</sup> Et<sub>3</sub>N was used as a base. <sup>b</sup> TPPTS was used as a ligand and *i*Pr<sub>2</sub>NEt was used as a base. <sup>c</sup> 11 % of **dFP<sup>C</sup>** was also isolated. <sup>d</sup> Ca. 40 % of unreacted **dU<sup>I</sup>** remained.

Interaction of DNA methyltransferase M.SssI with DNA modified with double-headed nucleobases was tested. The mechanism of the methylation also employ the covalent M.SssI-DNA complex.<sup>6</sup> Because of the second nucleobase in the major groove it might be possible to prepare a covalent methyltransferase-DNA complex and thus inhibit the methylation of the CpG sites.

First, I developed an assay for testing of the inhibition of M.SssI by double-headed nucleobases in DNA (**Figure 3 A**). The  $\text{dC}^{\text{PC}}$  and  $\text{dC}^{\text{FC}}$  double-headed nucleosides were tested in this assay (**Figure 3 B**). The assay revealed that DNA modified with  $\text{dC}^{\text{PC}}$  and  $\text{dC}^{\text{PFC}}$  do not significantly inhibit the methylation by M.SssI. On the other hand the assay was found to be suitable for testing of the inhibition of M.SssI.



**Figure 3.** Inhibition of M.SssI DNA methylation assay. A) Outline of the assay for testing of inhibition of DNA methylation by M.SssI B) PAGE analysis of the inhibition assay performed with different concentrations of M.SssI. 1. PAGE: unmodified DNA; 2. PAGE:  $\text{dC}^{\text{PC}}$  modified DNA; 3. PAGE:  $\text{dC}^{\text{PFC}}$  modified DNA. P stands for primer.

### 3.2 Transient and Switchable Protection of DNA Against Cleavage by Restriction Endonucleases by (Trialkylsilyl)ethynyl-Modified 7-Deazaadenines

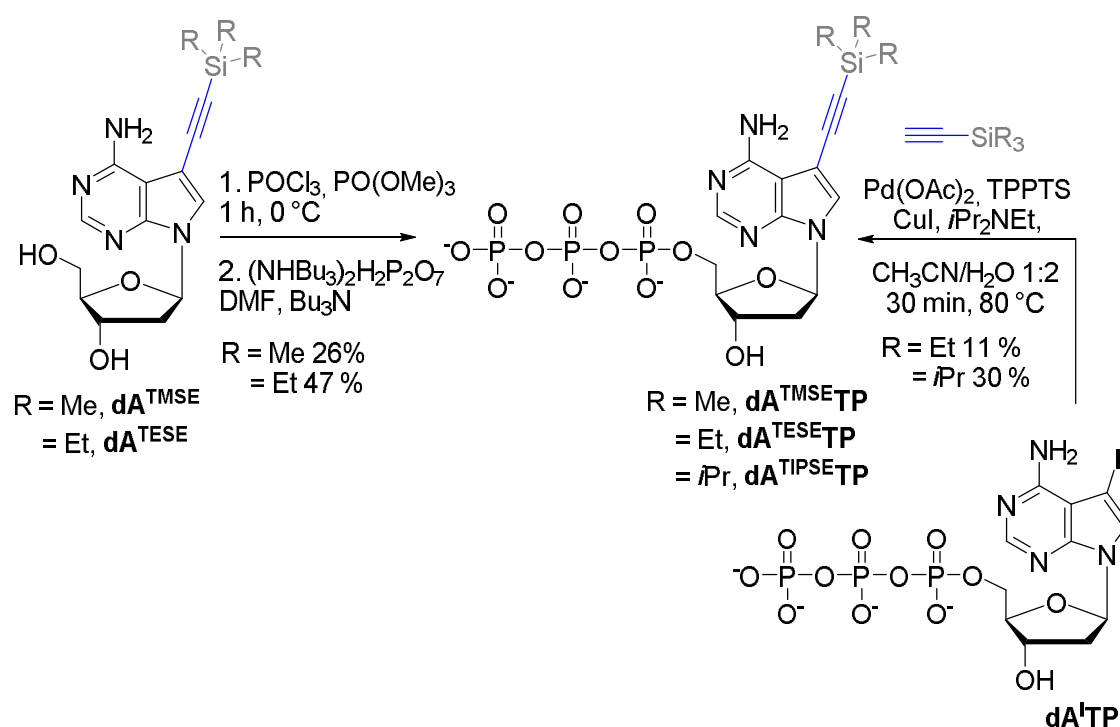
Protection of DNA against cleavage by REs by incorporation of modified nucleotide within the recognition sequence could be useful in biotechnology and chemical biology. Recently, the systematic study of 5-substituted pyrimidines and 7-substituted 7-deazaadenines<sup>4b</sup> was done in our group and it was found that some REs can tolerate 7-deazaadenine and 7-ethynyl analogs while more bulky 7-phenyl analog fully inhibit the cleavage. We proposed that 7-(trialkylsilyl)ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenines in the REs recognition sequences might be bulky enough to protect the DNA against the cleavage by REs (similarly to phenyl derivative) while after chemical deprotection of the

trialkylsilyl group the resulting ethynyl modified DNA would be accessible for REs and cleaved.<sup>4b</sup>

We have decided to synthesize three trialkylsilyl groups: trimethylsilyl (TMS), triethylsilyl (TES) and triisopropylsilyl (TIPS) as protection of the acetylene at the position 7 of 7-deaza-2'-deoxyadenosine. The synthesis and deprotection was first studied on model 2'-deoxynucleoside monophosphates. This study showed that the TMS- and TES-protected 7-ethynyl-dAMP could be easily deprotected by simple treatment with ammonia, whereas the TIPS group must be cleaved by treatment with tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF).

Synthesis of the (trialkylsilyl)ethynyl modified nucleoside triphosphates was done using Sonogashira cross-coupling reaction (**Scheme 3**).

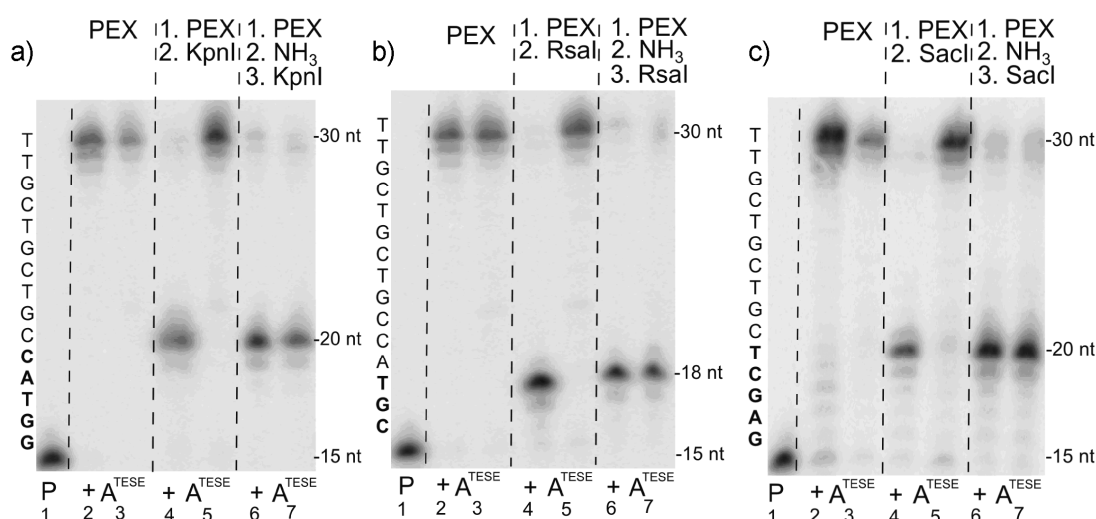
We tested all three **dA<sup>XE</sup>TPs** as substrates for the DNA polymerases in PEX. Both tested DNA polymerases KOD XL and Vent(exo-) efficiently incorporated all three **dA<sup>XE</sup>** into the full-length products.



**Scheme 3.** Synthesis of (trialkylsilyl)ethynyl substituted 7-deaza-2'-deoxyadenosine triphosphates.

Next, we incorporated each  $\mathbf{dA}^{\text{XE}}$  into the dsDNA with recognition sequence for REs KpnI, RsaI and SacI (all of these REs tolerate  $\mathbf{dA}^{\text{E}}$  within the recognition sequence) and treated it with corresponding RE. We found out the TMSE modified DNA was partially cleaved by KpnI and RsaI. The cleavage by SacI was inhibited. In contrast, the TESE (**Figure 4**) and TIPSE modified DNAs were fully protected against cleavage by all tested REs.

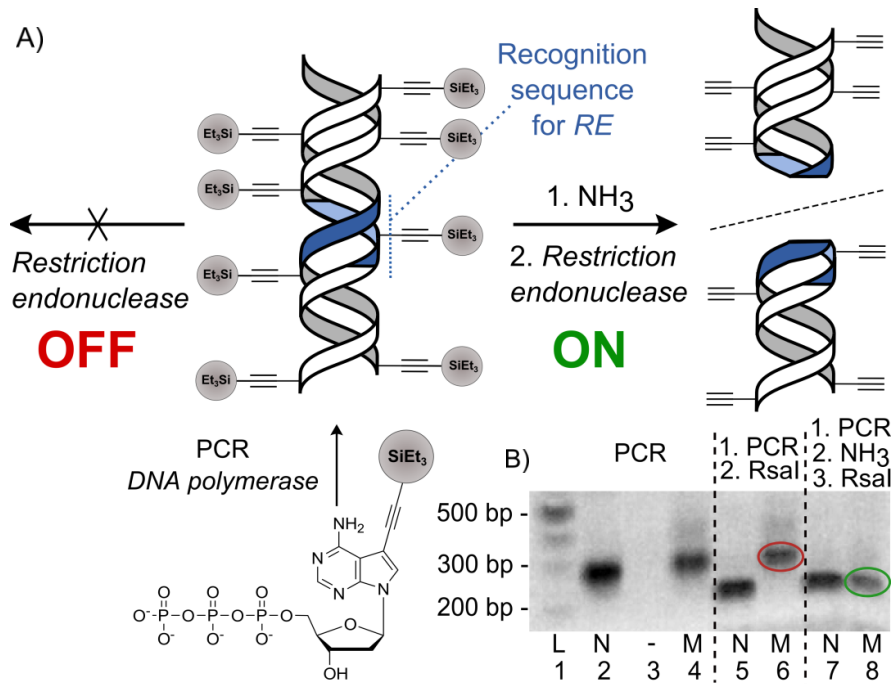
The deprotection of (trimethylsilyl)- and (triethylsilyl)ethynyl-modified DNA was carried out by aqueous ammonia. Resulting ethynyl modified DNAs were treated with corresponding REs and indeed they were fully cleaved (**Figure 4**). Because of the low stability and insufficient protection of DNA against cleavage by REs the TMS protection group was excluded from further testing. For deprotection of triisopropylsilyl groups we used TBAF thus the resulting ethynyl modified DNA was precipitated and then desalted on gel chromatography column, consequently the yield was lowered. All ethynyl-DNAs after deprotection were cleanly cleaved by REs.



**Figure 4.** Page analyses of PEX experiments, deprotection and cleavage products: a) PEX with  $\text{temp}^{\text{Kp}}$ , cleavage by KpnI; b) PEX with  $\text{temp}^{\text{Rs}}$ , cleavage by RsaI; c) PEX with  $\text{temp}^{\text{Sa}}$ , cleavage by SacI. Lane 1: primer; lane 2: product of PEX with natural dNTPs; lane 3: product of PEX with dTTP, dCTP, dGTP,  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\text{TP}$ ; lane 4: cleavage of the unmodified PEX product with a RE; lane 5: treatment of the TESE-modified PEX product with a RE (no cleavage); lane 6: treatment of the unmodified PEX product with  $\text{NH}_3$  followed by cleavage with a RE; lane 7: treatment of the TESE-modified PEX product with  $\text{NH}_3$  followed by cleavage with a RE (full cleavage).

Finally, we have clearly shown the  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\text{TP}$  is well incorporated into long DNA by KOD XL polymerase, the TESE modified DNA with recognition sequence for RsaI

resists the treatment with this RE but after deprotection of TES group the recognition sequence becomes accessible for RsaI and is cleaved (**Figure 5**). Further interesting questions for future research on this topic might concern the interactions of the modified DNA with transcription factors, the possible regulation of gene expression by transient protection.

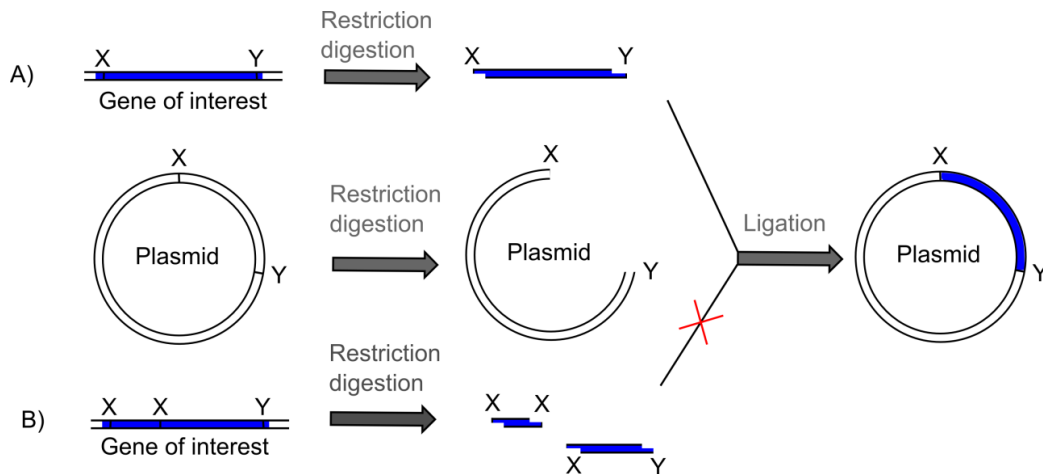


**Figure 5.** Transient protection of DNA against cleavage by restriction endonucleases using (trimethylsilyl)ethynyl modified DNA a) Scheme of the PCR incorporation of  $\text{dA}^{\text{TESE}}\text{TP}$ , deprotection and cleavage of the DNA. b) Agarose gel analysis of PCR, deprotection and cleavage experiments with 297-mer template. Lane 1: DNA ladder; lane 2: product of PCR with natural dNTPs; lane 3: product of PCR with dTTP, dCTP, dGTP; lane 4: product of PCR with dTTP, dCTP, dGTP,  $\text{dA}^{\text{TESE}}\text{TP}$ ; lane 5: cleavage of the unmodified PCR product with RsaI; lane 6: treatment of the TESE-modified PCR product with RsaI (no cleavage, marked in red circle); lane 7: treatment of the unmodified PCR product with NH<sub>3</sub> followed by cleavage with RsaI; lane 8: treatment of the TESE-modified PCR product with NH<sub>3</sub> followed by cleavage with RsaI (full cleavage, marked in green circle).

### 3.3 Nucleobase Protection Strategy for Gene Cloning and Expression

There are some techniques available for the gene cloning in which the gene of the interest contain target sequences for some REs in several copies. The common approach is codon mutation within the restriction site, but this may not circumvent the problem, for example if the expression system does not contain a complementary transfer RNA.

Here, I present the first strategy for the polymerase synthesis of a chemically protected copy of a gene flanked by unmodified sequences, its site-specific cleavage by REases, cloning into a plasmid and use for protein expression. This work we did in collaboration with Prof. J. S. Dickschat and Dr. N. L. Brock from Braunschweig Universität in Germany who study the *tdaD* gene.<sup>9</sup> The *tdaD* gene encodes the putative thioester hydrolase TdaD and contains the cleavage site for NcoI within the gene sequence. While they would use the same RE for the gene cloning (**Figure 6**).

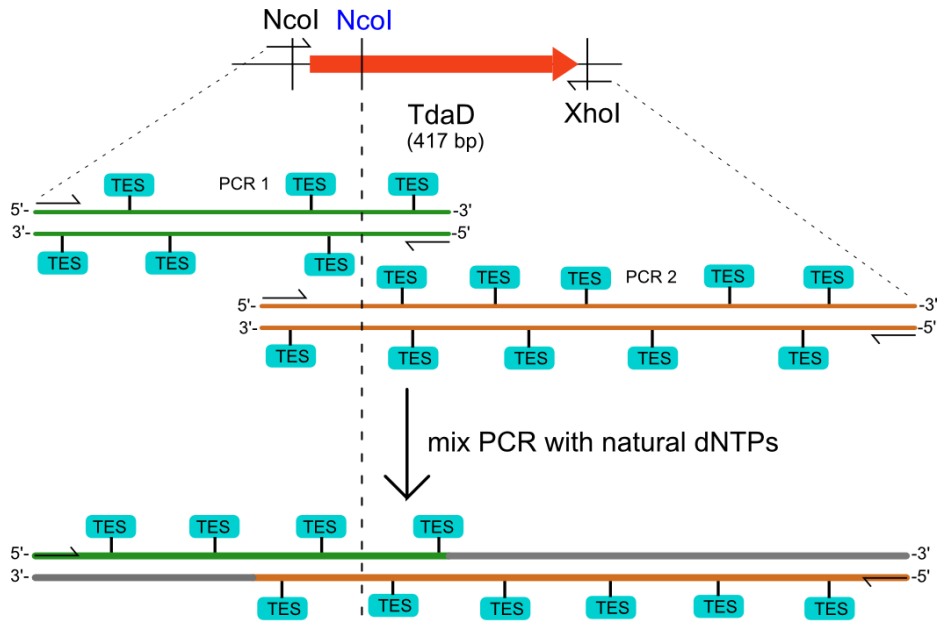


**Figure 6.** Gene cloning with A) one site of the each recognition sequence for RE used in the cloning and B) multiple site of the recognition sequence for RE used in the cloning.

The widespread pET28c(+) expression system for isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) inducible expressions of histidine-tag (His<sub>6</sub>-tag) modified proteins in *Escherichia coli* takes advantage of the RE NcoI. This sequence is displayed in the forward oligonucleotide primer in a way that the partial sequence ATG coincides with the start codon of the gene of interest. In the reverse oligonucleotide primer the stop codon of the original gene is together with the sequence of the following three base-pairs altered to the CTCGAG recognition sequence of the RE XhoI. After digestion and cloning of the PCR product into the pET28c(+) vector the sequence of the cloned gene is fused to the XhoI recognition sequence followed by the His<sub>6</sub>-tag sequence (CAC)<sub>6</sub> allowing protein purification by Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid (NTA) chromatography and a stop codon (TGA).

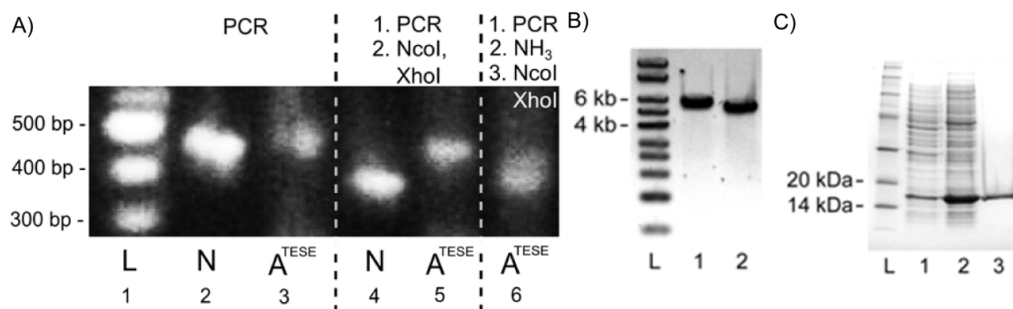
The new strategy for preparation of TESE modified PCR product needed to be developed because of the simple use of one set of primers cannot be applied, since the

resulting DNA contains the TESE groups inherently in the complementary strand to the primers and thus protects the cleavage of the recognition sequences within the primer sequences. We envisaged the preparation of two partially overlapping (90 base-pairs) PCR products using two sets of primers and  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\mathbf{TP}$ . In the next step, PCR 1 and PCR 2 products are used in the third PCR with natural dNTPs in which the PCR 1 and PCR 2 products served as the primers (**Figure 7**).



**Figure 7.** Strategy for PCR amplification with protection of NcoI site within the *tdaD* gene sequence.

Indeed, we have prepared PCR 1 (125 bp) and PCR 2 (399 bp) products using KOD XL polymerase and  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\mathbf{TP}$  and used them in the third PCR with natural dNTPs (**Figure 8**).



**Figure 8.** Gel electrophoretic analyses of PCR products and protein expression. Digestion experiments with the REases NcoI and XhoI. Lane 1: 100 bp DNA ladder; lane 2: PCR amplificate of *tdaD* obtained with natural dNTPs; lane 3: product of mix



PCR obtained with  $\text{dA}^{\text{TESE}}\text{TP}$ ; lane 4: unprotected copy of *tdaD* treated with NcoI and XhoI resulting in cleavage to yield a 363 bp product (second product of 61 bp not visible); lane 5: protected amplificate of *tdaD* obtained in mix PCR (lane 3) treated with NcoI and XhoI is not cleaved; lane 6: protected copy of *tdaD* first treated with  $\text{NH}_3$  for removal of the TES protecting group, followed by treatment with NcoI and XhoI is cleaved to yield a 363 bp product. B) Linearized (EcoRV) pET-28c(+) expression vector containing the *tdaD* insert (lane 1, 5647 bp) and linearized pET-28c(+) expression vector without insert (lane 2, 5367 bp). E) Production of TdaD-His<sub>6</sub>. Lane 1: soluble proteins without IPTG induced gene expression; lane 2: soluble proteins after IPTG induced gene expression; lane 3:  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-chromatography-purified TdaD-His<sub>6</sub> (16.9 kDa); L: DNA or protein ladder. Gel A was visualized with DNA staining by GelRed, gel B was visualized with DNA staining by ethidium bromide, and gel C was visualized with protein staining by Coomassie Brilliant Blue. For gel B the camera was set to inverted mode, giving a white background and black DNA bands.

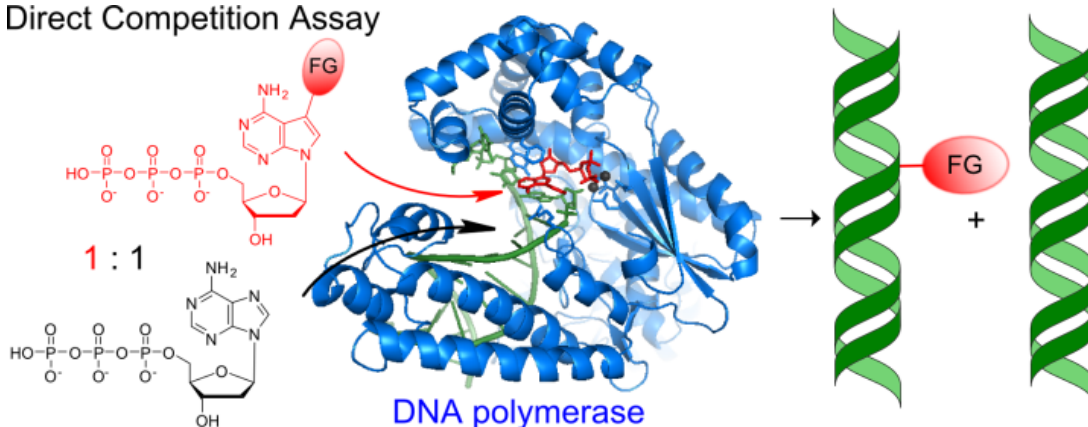
Dr. Nelson Brock carried out the construction of the plasmid, its amplification and production of the TdaD protein. The NcoI-XhoI end-digested and internally  $\text{dA}^{\text{TESE}}$  protected *tdaD* gene was then cloned into the pET28c(+) vector and the resulting ligation product was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  (**Figure 8**). It was of utmost importance for the success of the cloning strategy with internally protected DNA that the  $\text{dA}^{\text{TESE}}$  protected DNA sequence parts of the transformed plasmid DNA were replicated during cell division. This was demonstrated to be possible by isolation of plasmid DNA from *E. coli* clones and linearization by the single-cutting enzyme EcoRV. A gel electrophoretic analysis suggested insertion of the *tdaD* sequence into the multiple cloning site of pET28c(+) (**Figure 8**) as was corroborated by DNA sequencing. Therefore, the desilylation step was not needed for this cloning and amplification. The obtained expression construct was finally used for expression of TdaD followed by protein purification (**Figure 8**).

### **3.4 Study of Direct Competition Incorporations of 7-Substituted 7-Deazaadenine and 5-Substitute Cytosine 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphates in the Presence of Their Natural Counterparts**

Base functionalized DNAs are used in many areas of the chemical biology and medicinal chemistry for different purposes such as DNA sequencing, protein-DNA conjugation or *in vivo* labeling. This is usually prepared by incorporation of base modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphate in PEX or PCR. Only little attention was

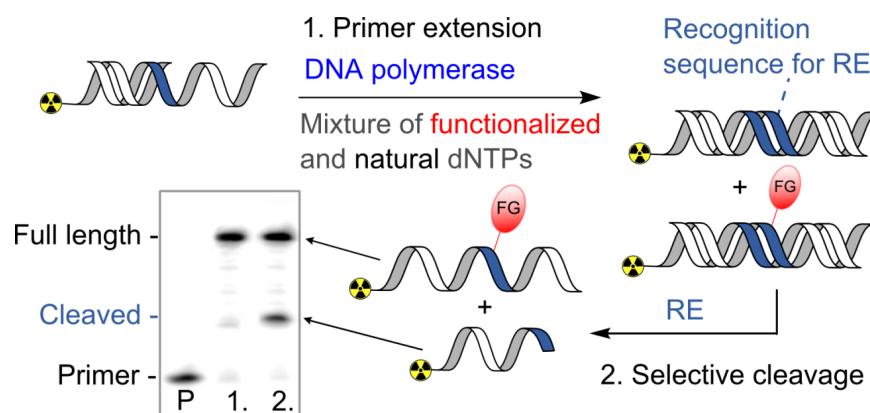
paid to competitive incorporations of modified  $\text{dN}^{\text{X}}\text{TPs}$  in the presence of the natural counterparts. Also there was not any suitable method for determination of the resulted mixture of modified and unmodified DNA. The general scheme of the competitive incorporation is illustrated in **Figure 9**.

#### Direct Competition Assay



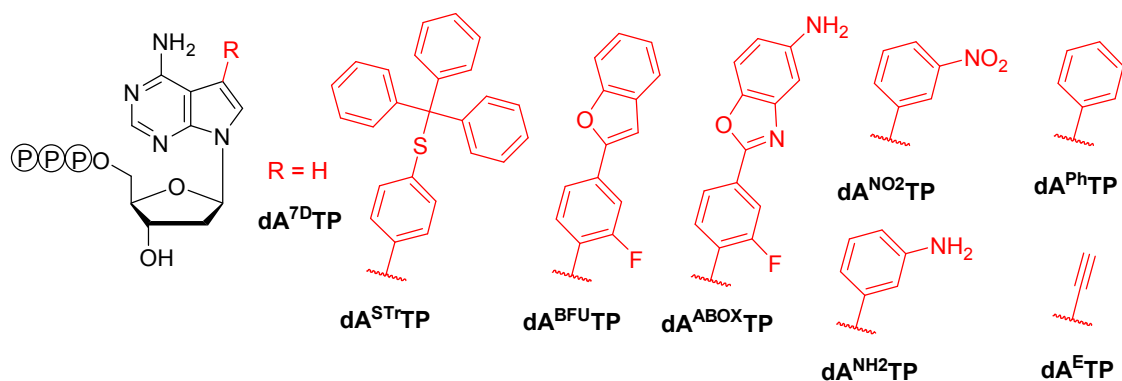
**Figure 9.** Direct competitive incorporation of functionalized  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TP}$  versus natural dATP.

First, we performed the proof-of-principle experiments, which is outlined in **Figure 10**, with the  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  and  $\text{dC}^{\text{Ph}}\text{TP}$  in the presence of Pwo polymerase followed by treatment with BamHI and ClaI respectively and separated the resulting DNA mixtures on the PAGE. Both  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  and  $\text{dC}^{\text{Ph}}\text{TP}$  were tested in different ratios of modified  $\text{dN}^{\text{Ph}}\text{TP}$  to unmodified dNTP (1:1 and 10:1). The intensity of the two spots of cleaved natural and intact modified DNA were then quantified. The PAGE analysis of RE cleavage was first compared with MALDI analysis of the products of competitive PEX experiments using  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  and  $\text{dC}^{\text{Ph}}\text{TP}$  and Pwo polymerase to validate the method. A clear correlation between the two methods was seen.

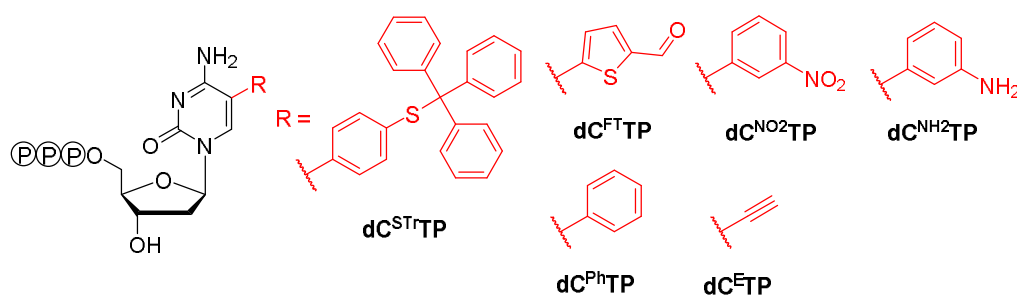


**Figure 10.** Method for analysis of competitive PEX using RE and PAGE.

With the suitable method in our hands we moved on to the batch determination of incorporation ratios of the series of 7-substituted 7-deaza-2'-deoxyadenosines and 5-substituted 2'-deoxycytidines bearing various bulky functional groups available in our group including ethynyl and phenyl derivatives, redox labels ( $\text{dN}^{\text{NO}_2}\text{TP}$  and  $\text{dN}^{\text{NH}_2}\text{TP}$ ), fluorescent labels ( $\text{dA}^{\text{BFU}}\text{TP}$ ,  $\text{dA}^{\text{ABOX}}\text{TP}$ ), reactive groups ( $\text{dC}^{\text{FT}}\text{TP}$ ), and very bulky groups ( $\text{dN}^{\text{STr}}\text{TP}$ ) (**Figure 11** and **Figure 12**).



**Figure 11.** Functionalized  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TPs}$  used in the study of competitive incorporatio.



**Figure 12.** Functionalized  $\text{dC}^{\text{X}}\text{TPs}$  used in the study of competitive.

Next, we performed the measurements of competitive PEX of  $\text{dC}^{\text{Ph}}\text{TP}$  and  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  in presence of natural counterparts in different ratios employing different DNA polymerases, results are presented in **Table 2**. Generally, the  $\text{dC}^{\text{Ph}}\text{TPs}$  was a worse substrate than dCTP for most polymerases, whereas  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TPs}$  was, surprisingly, better substrate than dATP. Competitive incorporations of all modified  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TPs}$  (**Figure 11**) with Bst DNA polymerase showed that  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TPs}$  bearing aromatic groups (except for the very bulky  $\text{A}^{\text{STr}}$ ) and ethynyl were more efficient substrates than dATP for Bst polymerase (**Table 3**). On the other hand, the unsubstituted 7-deazaadenine derivative ( $\text{dA}^{\text{7D}}\text{TP}$ ) was a poorer substrate than dATP probably because of loose of the

interaction on N-7 without replacement by other functional group capable to substitute this interaction.

**Table 2.**  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  incorporation with different DNA polymerases.

Polymeras	Competition <sup>a</sup>	Discr. <sup>b</sup>	$V_{\text{max}}/K_m$	$K_m^c$	$V_{\text{max}}^d$
Pwo	43	0.4	0.03	24	0.81
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.08	10	0.85
KOD XL	57	0.6	0.17	38	6.3
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.26	18	4.6
Taq	63	1.1	0.042	8.9	0.371
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.039	12	0.49
Vent(exo-)	65	0.4	0.03	24	0.73
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.08	8.7	0.67
Klenow	67	2.4	0.23	2.1	0.49
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.1	2.5	0.25
Bst	67	3	0.18	6.8	1.19
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.06	28	1.8
H. Pol. $\alpha$	46	-	-	>100	-
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	45	0.0009	$2.10^{-4}$

<sup>a</sup> Percent of functionalized DNA. <sup>b</sup> Discrimination reflects the efficiency of functionalized  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TP}$  incorporated compared to the efficiency of incorporation of the dATP, deduced as  $(V_{\text{max}}/K_m)_{\text{fnc}}/(V_{\text{max}}/K_m)_{\text{natural}}$ . <sup>c</sup>  $K_m$  extension is  $\mu\text{M}$ . <sup>d</sup>  $V_{\text{max}}$  extension is  $10 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{U}^{-1}$ . <sup>e</sup> dATP was incorporated by the same polymerase as in the row above.

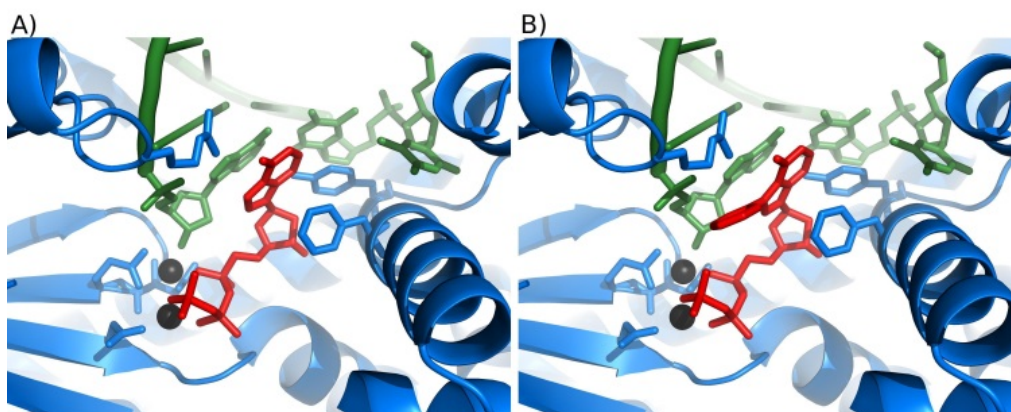
Because of the surprisingly high efficiency of 7-aryl  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TP}$ s in competitive incorporations we were curious if the affinities of the incoming modified triphosphates to the active site of the Bst polymerase are higher than the affinity of the natural dATP. Thus we studied the kinetics of the single nucleotide incorporations. Results for different  $\text{dN}^{\text{X}}\text{TP}$ s are summarized in the **Table 3**. The kinetics experiments revealed that most substrates which are better than natural substrates in competitive incorporations have lower  $K_m$  values thus higher affinity to the active site and also give higher values of the  $V_{\text{max}}/K_m$  in comparison to the natural counterparts.

In order to explain the higher affinity of the 7-aryl  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TP}$ s to the active site of polymerases, molecular modeling studies were performed. The computational studies were done by Dr. Jindřich Fanfrlík. Both dATP and  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  were docked to the complex of Bst polymerase with primer and template using the known crystal structure (pdb 4BDP).<sup>10</sup> The  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  had a larger affinity (more negative score) than dATP (-72.8 and -65.0  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectively), which indicates a possible increase in  $\pi$ - $\pi$  stacking as a result of the 7-phenyl group (**Figure 13**).

**Table 3.** Incorporation of functionalized **dN<sup>X</sup>TPs** with Bst polymerase

dN	Competition <sup>a</sup>	Discrim. <sup>b</sup>	$V_{\max}/K_m$	$K_m^c$	$V_{\max}^d$
<b>dA</b>	-	1	0.06	28	1.8
<b>dA<sup>STr</sup></b>	16.9	-	-	>100	-
<b>dA<sup>7D</sup></b>	32	0.3	0.02	60	1
<b>dA<sup>AB</sup></b>	73	1.8	0.11	8	0.94
<b>dA<sup>E</sup></b>	67	2	0.12	13	1.51
<b>dA<sup>NH2</sup></b>	61	2.3	0.14	7	1.02
<b>dA<sup>Ph</sup></b>	67	3	0.18	6.8	1.19
<b>dA<sup>BFU</sup></b>	67	3.7	0.22	5.7	1.27
<b>dA<sup>NO2</sup></b>	70	3.8	0.23	6.5	1.57
<b>dC</b>	-	1	0.27	4.4	1.2
<b>dC<sup>STr</sup></b>	5	-	-	-	-
<b>dC<sup>NO2</sup></b>	11.5	-	-	-	-
<b>dC<sup>NH2</sup></b>	32	0.2	0.06	21	1.34
<b>dC<sup>FT</sup></b>	44	-	-	-	-
<b>dC<sup>E</sup></b>	54	1.5	0.41	3.1	1.29
<b>dC<sup>Ph</sup></b>	58	2	0.54	2.4	1.32

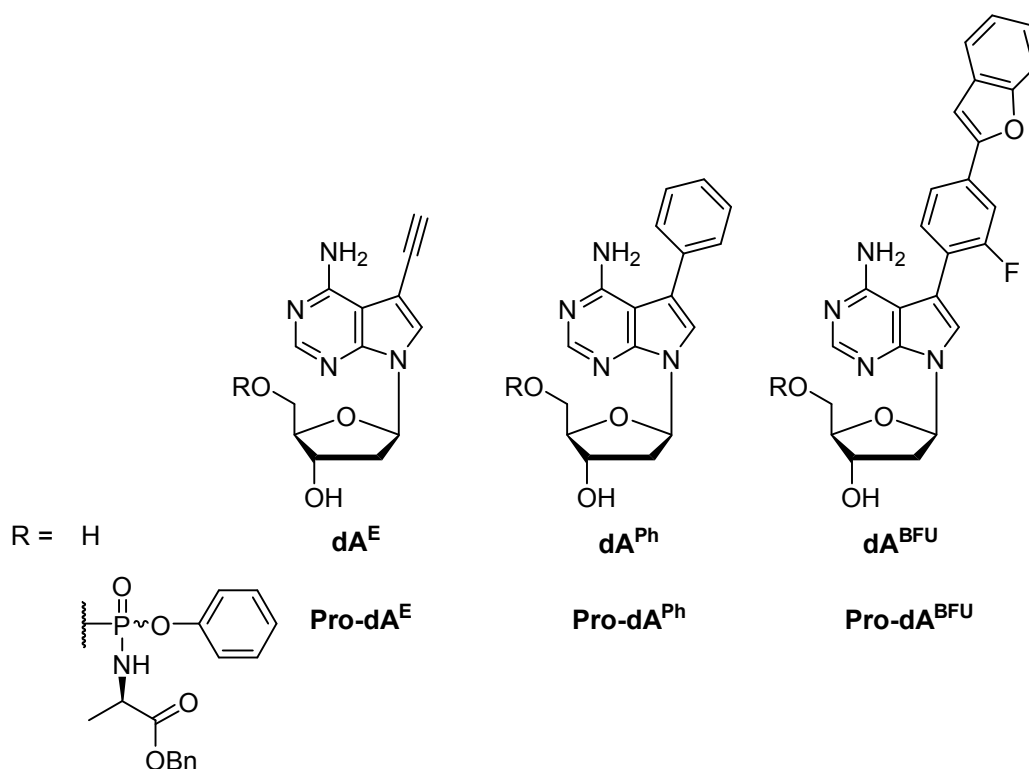
<sup>a</sup> Percent of functionalized DNA. <sup>b</sup> for definition, see footnote of **Table 2**. <sup>c</sup>  $K_m$  extension is  $\mu\text{M}$ . <sup>d</sup>  $V_{\max}$  extension is  $10 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{U}^{-1}$ .

**Figure 13.** Bst polymerase active site with modeled A) dATP and B) **dA<sup>Ph</sup>TP**.

Based on our study of competitive incorporations of modified **dN<sup>X</sup>TPs** by DNA polymerase in which we found that many 7-aryl **dA<sup>X</sup>TPs** are better substrates for DNA polymerases than a natural counterpart we have decided to try one step metabolic labeling of genomic and plasmid DNA using fluorescent **dA<sup>BFU</sup>**, as a control label we have used **dA<sup>E</sup>** and the study has been extended with **dA<sup>Ph</sup>** probe as an example of the minimalistic 7-aryl modification. All probes used in the study are illustrated in **Figure 14**. In order to fulfill the criteria for successful labeling we have decided to prepare also

corresponding pronucleotides<sup>11</sup> which were reported to penetrate easily through the cell membrane and bypass the first phosphorylation by kinases which is considered to be the most difficult part of the overall process. The rationale for using **dA<sup>BFU</sup>** for metabolic labeling is to avoid the necessity of the click-reaction chemistry used for addition of the fluorescent tag to alkyne based probes.

In conclusion, we found that both nucleosides and pronucleosides penetrate into the cell. The **dA<sup>E</sup>** and **Pro-dA<sup>E</sup>** are also metabolically phosphorylated and incorporated into the genomic DNA in HeLa cells. The more bulky **dA<sup>BFU</sup>** and **Pro-dA<sup>BFU</sup>** penetrate into the cell but were not incorporated in nucleus into the cellular DNA.



**Figure 14.** Nucleosides and pronucleotides used in the study.

## 4 Conclusion

The synthesis of the novel modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates which were incorporated into DNA and used in several chemical biology applications were developed in this work.

Synthesis of double-headed nucleosides and nucleotides was performed. The synthetic approach was based on aqueous Sonogashira cross-coupling. The modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates were then tested in PEX and PCR. They were found to be good substrates for DNA polymerase in both PEX and PCR. Thus the double-headed nucleobases containing different linkers are suitable derivatives for further investigation of interactions between such modified DNA and DNA methyltransferases. Following this line, the assay for testing of inhibition of DNA methyltransferases with DNA containing double-headed nucleobases was developed. The assay for testing the inhibition of DNA methyltransferases was successfully studied but the tested **dC<sup>PC</sup>** and **dC<sup>PFC</sup>** derivatives did not show any significant inhibition of DNA methyltransferase M.SssI.

For transient protection of the DNA against cleavage by restriction endonucleases the series of three 7-(trialkylsilyl)ethynyl-7-deazaadenines was tested as the triggerable switch. All three 7-(trialkylsilyl)ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenosine triphosphates were synthesized by use of Sonogashira cross-coupling reaction and tested on incorporation into DNA in PEX or PCR. For the PEX all three **dA<sup>XE</sup>TPs** worked well, while in PCR bulky triisopropyl derivative was an unsuitable substrate. The following study of the ability of (trialkylsilyl)ethynyl modified DNA to protect the DNA cleavage by REs revealed that the trimethylsilyl group was somehow insufficient and DNA was partially cleaved by RsaI and KpnI while the triethylsilyl and triisopropyl groups fully inhibit the cleavage reaction with tested restriction endonucleases. After treatment of the (triisopropylsilyl)ethynyl modified DNA with TBAF and (trimethylsilyl)ethynyl and (triethylsilyl)ethynyl modified DNA with aqueous ammonia and subsequent purification the resulting ethynyl modified DNA was again cleaved with all tested restriction endonucleases. The experiments clearly shows that the (triethylsilyl)ethynyl modified 7-deaza-2'-deoxyadenosine is suitable for transient protection of DNA against cleavage by REs. The reported proof-of-principle experiment also for the first time presents the

protecting group traditionally used in organic synthesis applied in regulation of biochemical reaction.

This methodology was then applied for selective protection of the internal NcoI recognition site of the *tdaD* gene which contain couple of the NcoI recognition sites. Here reported method is an alternative to other methods for cloning of the genes containing multiple recognition sites for REs, but the main aspect of this work is in the general use of base modifications as bioorthogonal protection against specific interactions of DNA with proteins and for regulation of biochemical processes.

Since the competitive incorporations of the modified **dN<sup>X</sup>TPs** in presence of their natural counterparts by DNA polymerases were investigated only scarcely it was assumed that the modified **dN<sup>X</sup>TPs** are inherently worse substrates than natural dNTPs. In this work I found that several 7-aryl-7-deazaadenine 2'-deoxyribonucleoside triphosphates are better substrates for many DNA polymerases than their natural counterparts. First the new method was developed for analysis of competitive incorporations. Because of many REs cannot cleave modified bases in their recognition sequences it was possible to selectively cleave only unmodified DNA in mixture resulting from the direct competitive incorporation in PEX. Our systematic study of competitive PEX using different **dA<sup>X</sup>TPs** and **dC<sup>X</sup>TPs** in different ratios with the natural dATP and dCTP, respectively, revealed a surprising and counterintuitive result that most tested 7-aryl **dA<sup>X</sup>TPs** are better substrates for DNA polymerases than dATP, whereas most **dC<sup>X</sup>TPs** are worse substrates. The highest incorporation rates 70 and 73 % were achieved using **dA<sup>NO2</sup>TP** and **dA<sup>BFU</sup>TP**, respectively, incorporated by Bst polymerase in ratio 1:1 with natural dATP. The kinetic study and semi-empirical calculations explain this by increased affinity of the 7-aryl **dA<sup>X</sup>TPs** to the active site of the polymerase complex with the primer and template because of increased  $\pi$ - $\pi$  stacking. This study gave us better insight into the mechanism of the incorporation of modified dNTPs by DNA polymerases, as well as opened a new window for the design of modified nucleosides and nucleotides for *in vivo* synthesis of base-modified DNA.



## 5 References

---

- 1 (a) Bentley, D. R. *et al.*: *Nature* **2008**, *456*, 53–59. (b) Balintová, J.; Plucnara, M.; Vidláková, P.; Pohl, R.; Havran, L.; Fojta, M.; Hocek, M.: *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 12720–12731.
- 2 (a) Hocek, M.; Fojta, M.: *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5802–5814. (b) Salic, A.; Mitchison, T. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2415–2420.
- 3 McLaughlin, L. W.; Wilson, M.; Ha, S. B.: *Compr. Nat. Prod. Chem.* **1999**, *7*, 251.
- 4 (a) Macíčková-Cahová, H.; Hocek, M.: *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 7612–22. (b) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, I.: *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1105–1111.
- 5 (a) Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y.: *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875–1916. (b) Hocek, M.; Fojta, M.: *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2233–2241.
- 6 (a) Cheng, X.; Roberts, R.: *Nucleic Acids Res.* **2001**, *18*, 3784–3795. (b) Bestor, T. H.; Verdine, G. L.: *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 380–389.
- 7 Loenen, W. A.; Dryden, D. T.; Raleigh, E. A.; Wilson, G. G.; Murray, N. E.: *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 3–19.
- 8 Macíčková-Cahová, H.; Pohl, R.; Hocek, M.: *ChemBioChem* **2011**, *12*, 431–438.
- 9 Berger, M.; Brock, N. L.; Liesegang, H.; Dogs, M.; Preuth, I.; Simon, M.; Dickschat, J. S.; Brinkhoff, T.: *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 3539–3551.
- 10 Kiefer, J. R.; Mao, C.; Braman, J. C.; Beese, L. S.: *Nature* **1998**, *391*, 304–307.
- 11 Perrone, P.; Daverio, F.; Valente, R.; Rajyaguru, S.; Martin, J. A.; Lévêque, V.; Le Pogam, S.; Najera, I.; Klumpp, K.; Smith, D. B.; McGuigan, C.: *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5463–5470.

# 1 Úvod

Struktura deoxyribonukleové kyseliny (DNA) byla odhalena Jamesem Watsonem a Francisem Crickem. Poznatky týkající se struktury, fyzikálních a chemických vlastností a funkce DNA měly významný podíl na vývoji současné medicíny, molekulární biologie, chemické biologie a chemie.

Bylo připraveno velké množství nukleosidů a nukleotidů s modifikovanými bázemi, z nichž mnohé mají významnou biologickou aktivitu, zatímco některé další našly využití v chemické biologii například při sekvenování,<sup>12</sup> značení,<sup>13</sup> zkoumání struktury<sup>14</sup> DNA nebo interakcí mezi DNA a proteiny.<sup>15</sup>

Modifikace mohou být k nukleobázím připojeny například pomocí vodné palladiem katalyzované reakce<sup>16</sup> příslušného halogenovaného 2'-deoxyribonukleosid trifosfátu s terminálními alkyly, alkenyly nebo arylboronovými kyselinami.

Oligonukleotidy a delší DNA mohou být připraveny chemickou nebo enzymatickou syntézou. Při použití enzymatické syntézy, DNA polymerázy inkorporují modifikované 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty do DNA. Testy ukázaly, že velké množství DNA polymeráz má potřebné vlastnosti pro inkorporaci modifikovaných dNTP. Rozsah modifikací, který je tolerován DNA polymerázami, je velmi široký. Modifikace je většinou vázána na nukleobázi přes linkr do pozice 7 7-dezapurinů nebo pozice 5 pyrimidinů. Takovéto modifikace po inkorporaci do DNA zaujímají prostor ve velkém žlábků DNA.

DNA methyltransferázy hrají důležitou roli při regulaci genové transkripce, tím, že přidávají methylovou skupinu do pozice 5 cytosinů. Při katalýze této reakce se vychlípí celý nukleotid z DNA dvoušroubovice do aktivního místa DNA methyltransferasy a vytvoří kovalentní komplex. Tato reakce může být nevratná pokud je přirozený cytosin nahrazen 5-aza nebo 5-fluor cytosinem.

Restrikční endonukleázy (RE) rozeznávají specifické sekvence v DNA a v nich pak štěpí fosfodiesterovou vazbu. RE se hojně využívají při manipulaci s DNA, např.: při klonování. Ve skupině prof. Hocka bylo zjištěno, že některé menší modifikace nukleobází jsou tolerovány některými RE a naopak, že větší modifikace štěpící reakci většiny RE inhibují.

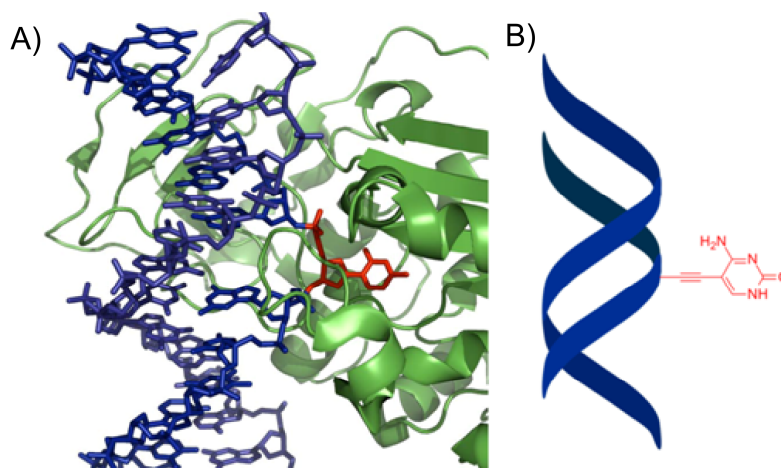
## 2 Cíle práce

1. Syntéza modifikovaných 2'-deoxyribonukleosidů a nukleotidů substituovaných v pozici 5 pyrimidinů a pozici 7 7-deazaadeninů další nukleobazí, studium jejich inkorporace do DNA a zkoumání interací těchto modifikovaných DNA s DNA methyltransferázama.
2. Syntéza série (trialkylsilyl)ethynyl modifikovaných 7-deaza-2'-deoxyriboadenosinů a korespondujících trifosfátů.
3. Vývoj metody pro přechodné chránění DNA proti štěpení DNA restrikcními endonukleázami a aplikace této metody při klonování a proteinové expresi.
4. Studium kompetitivních inkorporací modifikovaných 2'-deoxyribo nukleosid trifosfátů za přítomnosti jejich přirozených protějšků.

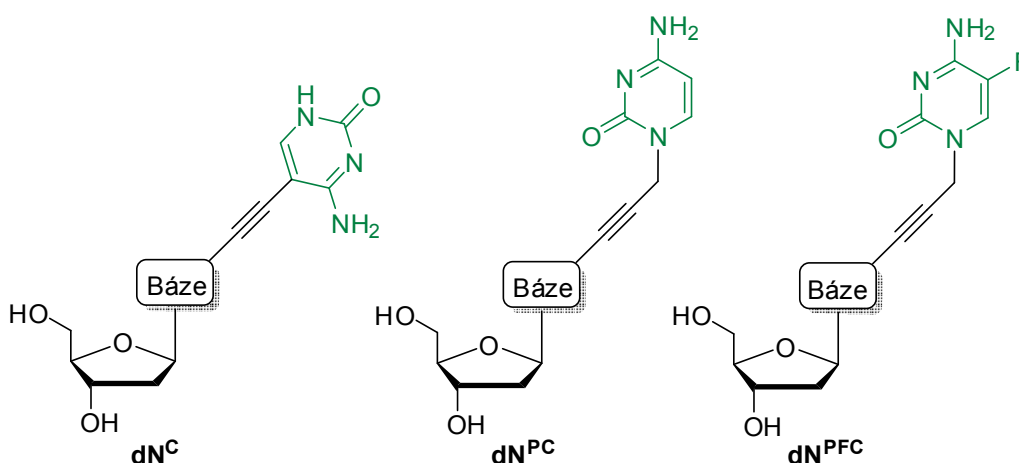
## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Syntéza “dvouhlavých” nukleosidů a nukleotidů, enzymatická jejich inkorporace a interakce s DNA methyltransferasami

DNA methyltransferázy hrají významnou roli při regulaci transkripce. Pro “editaci” DNA využívají tyto enzymy vychlípění nukleotidu z DNA dvoušroubovice do svého aktivního místa (**Obrázek 1**). Na základě znalosti tohoto mechanismu jsme se rozhodli vytvořit modifikovanou DNA, která by obsahovala “dvouhlavé” nukleobáze mimikující tento vychlípěný nukleotid ven z DNA (**Obrázek 1**). Dvouhlavé nukleobáze by tímto způsobem mohly interagovat nebo inhibovat DNA methyltransferázy. Byly připraveny tři menší série “dvouhlavých” nukleosidů (**Obrázek 2**) a nukleotidů. 5-Fluorcytosin jsme použili z důvodu známého mechanismu inhibice DNA methyltransferáz 5-fluor-2'-deoxycytidine, který po inkorporaci do DNA vytváří kovalentní vazbu s DNA methyltransferasou. Proto jsem se také zaměřil na syntézu “dvouhlavých” 2'-deoxynukleosidů a nukleotidů, které po inkorporaci do DNA, by mohli interagovat s DNA methyltransferázami nebo je inhibovat.

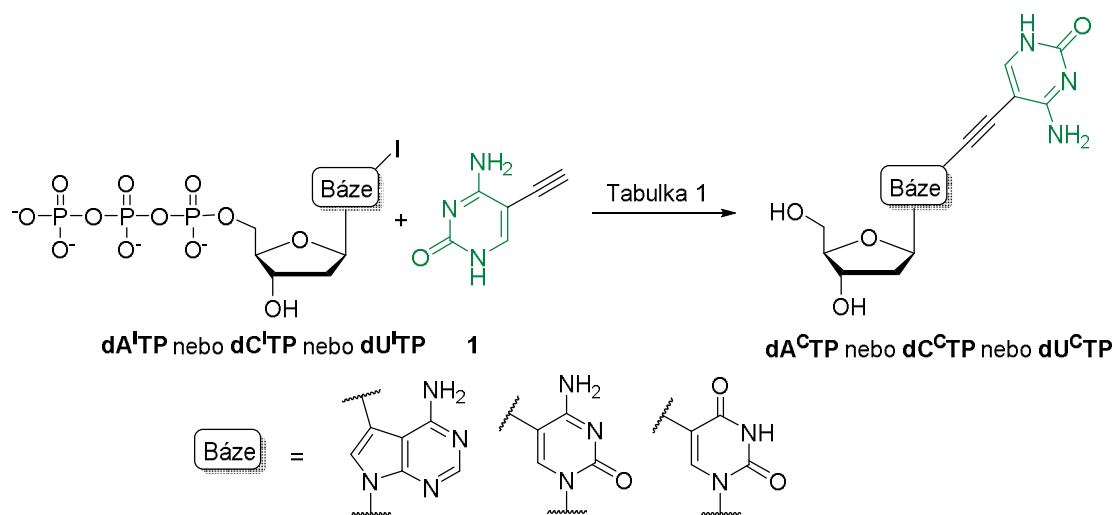


**Obrázek 1.** (A) Nukleotid (červeně) vychlípnutý z DNA dvoušroubovice (modře) do aktivního místa DNA methyltransferázy (zeleně). (B) Ilustrace DNA s “druhým” cytosinem z dvouhlavé nukleobáze ve velkém žlábků.

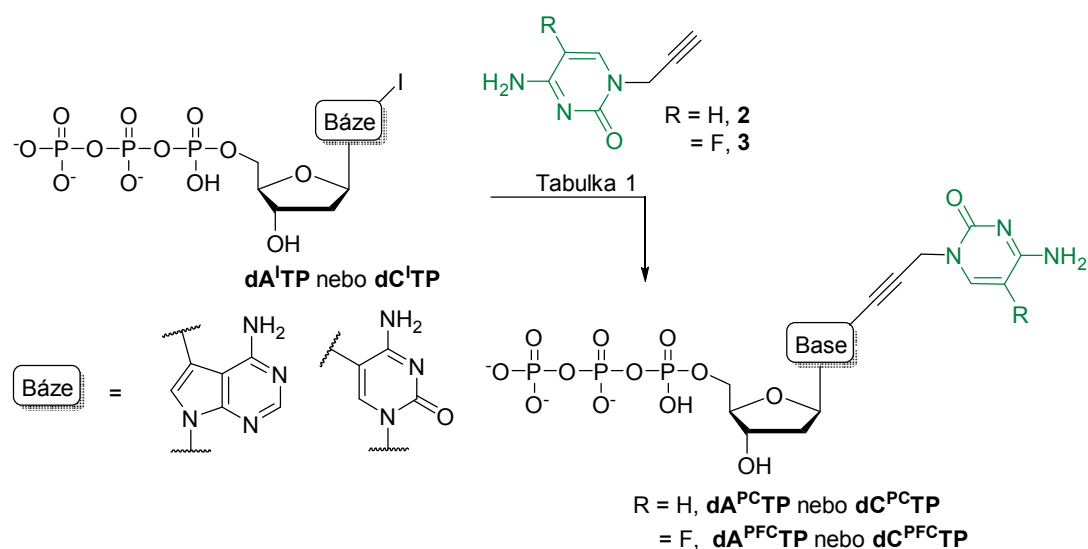


**Obrázek 2** “Dvouhlavé” 2'-deoxyribonukleosidy.

Syntetický postup se zakládal na Sonogashirově cross-couplingu 5-ethynylcytosinu (1) nebo 1-*N*-(prop-2-yn-1-yl)cytosinu (2) nebo 5-fluor-1-*N*-(prop-2-yn-1-yl)cytosinu (3) s halogenovanými nukleosidy (shrnuto v **Tabulce 1**) a nukleotidů (**Schéma 1** a **Schéma 2**). Sonogashirův cross-coupling 5-alkyncytosinu 1, 2 nebo 3 s  $\text{dC}^{\text{I}}\text{TP}$ ,  $\text{dU}^{\text{I}}\text{TP}$  nebo  $\text{dA}^{\text{I}}\text{TP}$  byl proveden za dříve optimalizovaných podmínek ve vodném prostředí ve směsi  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  1:2 za přítomnosti  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{CuI}$ , ligandu TPPTS a báze  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  při  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . Všechny zmiňované trifosfáty  $\text{dN}^{\text{C}}\text{TP}$ ,  $\text{dN}^{\text{PC}}\text{TP}$  a  $\text{dN}^{\text{PFC}}\text{TP}$  byly připraveny v dostatečném výtěžku (**Tabulka 1**).



**Schéma 1.** Syntéza 5-ethynylcytosin modifikovaných  $\text{dN}^{\text{C}}\text{TP}$ .



**Schéma2.** Syntéza 1-N-(prop-2-yn-1-yl)cytosin modifikovaných  $\text{dN}^{\text{PC}}\text{TP}$  a  $\text{dN}^{\text{PFC}}\text{TP}$ .

Všechny připravené cytosinem modifikované  $\text{dN}^{\text{C}}\text{TP}$ ,  $\text{dN}^{\text{PC}}\text{TP}$  a  $\text{dN}^{\text{PFC}}\text{TP}$  byly inkorporovány do DNA v PEXu DNA polymerázou KOD XL. Navrhli jsme několik různě obtížných templátů pro PEX, abychom vyzkoušeli, jak jsou tyto modifikované  $\text{dN}^{\text{XC}}\text{TP}$  dobrými substráty pro DNA polymerázy. Ukázalo se, že všechny  $\text{dN}^{\text{XC}}\text{TP}$  slouží, jako velmi dobrý substrát a vždy poskytly produkt v plné délce. Následně jsem také zjistil, že  $\text{dN}^{\text{XC}}\text{TP}$  jsou vhodné také pro přípravu delší DNA pomocí PCR.

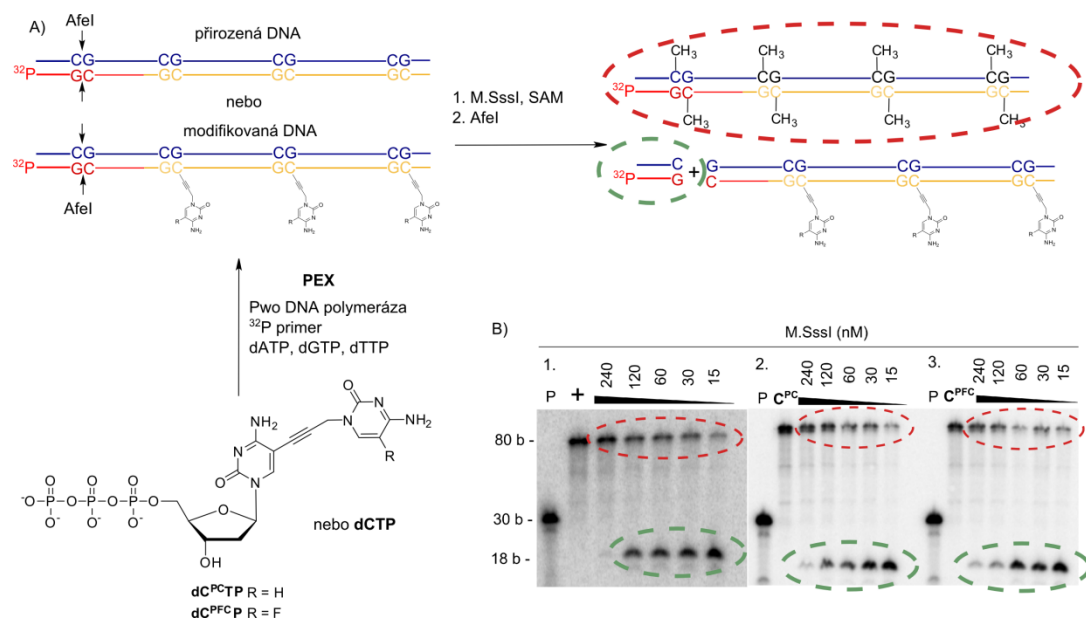
**Tabulka 1.** Podmínky cross-coupling reakcí jodo-2'-deoxyribonukleosidů a nukleotidů s alkynyletyosiny.

Vstup	dN <sup>I</sup> /dN <sup>I</sup> TP	Katalyzátor	Rozpouštědlo	Podmínky [°C, h]	Produkt	Výtěžek (%)
1 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>C</sup></b>	49
2 <sup>b</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>C</sup></b>	73
3 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 0.5 h	<b>dC<sup>PC</sup></b>	30
4 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 0.1 h	<b>dC<sup>PFC</sup></b>	95
5 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	50 °C, 1 h	<b>dU<sup>C</sup></b>	40 <sup>c</sup>
6 <sup>b</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	50 °C, 1 h	<b>dU<sup>C</sup></b>	60 <sup>d</sup>
7 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dFP<sup>C</sup></b>	30
8 <sup>b</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	80 °C, 1 h	<b>dFP<sup>C</sup></b>	78
9 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	50 °C, 1 h	<b>dU<sup>PC</sup></b>	95
10 <sup>b</sup>	dU <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	50 °C, 0.5 h	<b>dU<sup>PFC</sup></b>	69
11 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>C</sup></b>	38
12 <sup>b</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DMF	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>C</sup></b>	51
13 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 0.5 h	<b>dA<sup>PC</sup></b>	61
14 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>PFC</sup></b>	58
15 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>C</sup>TP</b>	35
16 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1.5 h	<b>dC<sup>PC</sup>TP</b>	30
17 <sup>a</sup>	dC <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dC<sup>PFC</sup>TP</b>	80
18 <sup>a</sup>	dU <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dU<sup>C</sup>TP</b>	31
19 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	105 °C, 1 h	<b>dA<sup>C</sup>TP</b>	17
20 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>PC</sup>TP</b>	80
21 <sup>a</sup>	dA <sup>I</sup> TP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	80 °C, 1 h	<b>dA<sup>PFC</sup>TP</b>	43

<sup>a</sup> použití Et<sub>3</sub>N jako báze. <sup>b</sup> ligand: TPPTS, báze: *i*Pr<sub>2</sub>NEt. <sup>c</sup> izolováno také 11 % **dFP<sup>C</sup>**. <sup>d</sup> izolováno také cca. 40 % nezreagovaného **dU<sup>I</sup>**.

Dále byly studovány interakce připravených DNA s “dvouhlavými” nukleobázemi v reakci s DNA methyltransferázami. Při methylaci cytosinu dochází ke vzniku kovalentního komplexu DNA s methyltransferázou. Předpokládáme, že díky navržené “druhé” nukleobázi ve velkém žlábků by bylo možné iniciovat interakci s DNA methyltransferázou nebo ji inhibovat.

Prvně jsem vyvinul test, jak analyzovat probíhající inhibici (**Obrázek 3 A**). Pomocí něhož jsem otestoval  $dC^{PC}$  a  $dC^{FC}$  (**Obrázek 3**). Ukázalo se, že  $dC^{PC}$  ani  $dC^{FC}$  významně neinhibují testovanou methyltransferázu M.SssI. Na druhou stranu jsem zjistil, že tento test, je skutečně možné využít, pro určení zda daná modifikace methyltransferázu inhibuje nebo neinhibuje.



**Obrázek 3.** Test inhibice M.SssI A) Schéma inhibice methylace M.SssI pomocí “dvouhlavých“ nukleobází inkorporovaných v DNA. B) PAGE separace po testu inhibice M.SssI, při různých koncentracích M.SssI. 1. PAGE: přirozená DNA; 2. PAGE:  $dC^{PC}$  modifikovaná DNA; 3. PAGE:  $dC^{FC}$  modifikovaná DNA. P označuje primer.

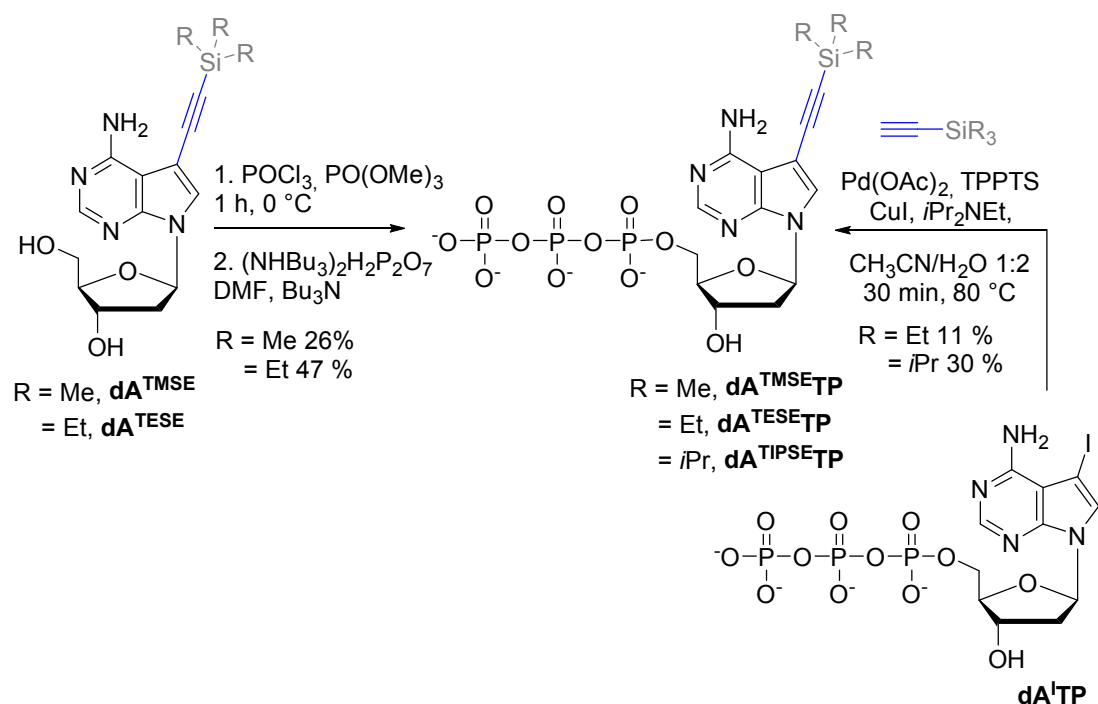
### 3.2 Přechodné a přepínatelné chránění DNA proti štěpení restričními endonukleázami za pomoci (trialkylsilyl)ethynyl modifikovaných 7-deazaadeninů

Chemické chránění DNA proti štěpení restričními endonukleázami (RE) za pomoci modifikovaných nukleotidů inkorporovaných do DNA by mohlo najít využití v biotechnologiích nebo chemické biologii. Ve skupině profesora Hocka se systematicky zkoumal vliv 5 substituovaných pyrimidinů a 7 substituovaných 7-deazaadeninů na štěpení DNA RE. Bylo zjištěno, že některé RE jsou schopny rozpoznávat a štěpit sekvence obsahující 7-ethynyl modifikované 7-deazaadeniny, zatímco větší substituce jako například fenyl štěpení inhibují. Předpokládali jsme, že 7-(trialkylsilyl)ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenosiny v rozpoznávací sekvenci pro RE by

mohli štěpení inhibovat, zatímco po odchránění trialkylsilylové chránící skupiny, by výsledná ethynyl-modifikovaná DNA byla opět rozpoznána a štěpena RE.

Rozhodli jsme se pro přípravu tří trialkylsilylových derivátů: trimethylsilyl (TMS), triethylsilyl (TES) a triisopropylsilyl (TIPS) jako chránění ethynylu v pozici 7 7-deaza-2'-deoxyadenosinu. Syntéza i následné odchránění bylo prvně zkušeno na 2'-deoxyadenosin monofosfátech. Ukázalo se, že chránění pomocí TMS a TES lze snadno odchránit pomocí vodného amoniaku, zatímco TIPS bylo potřeba odchránit tetrabutylammonium fluoridem (TBAF). K syntéze chráněných 7-ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfátů byla použita, analogicky k přípravě monofosfátů, Sonogashirova reakce (**Schéma 6**).

Všechny tři připravené  $\mathbf{dA}^{\text{XE}}\text{TP}$  byly dobrými substráty pro DNA polymerasy v PEXu. Obě testované DNA polymerasy KOD XL a Vent(exo-) inkorporovaly do DNA všechny tři  $\mathbf{dA}^{\text{XE}}$  za vzniku stejného produktu, jako s přirozeným dATP.



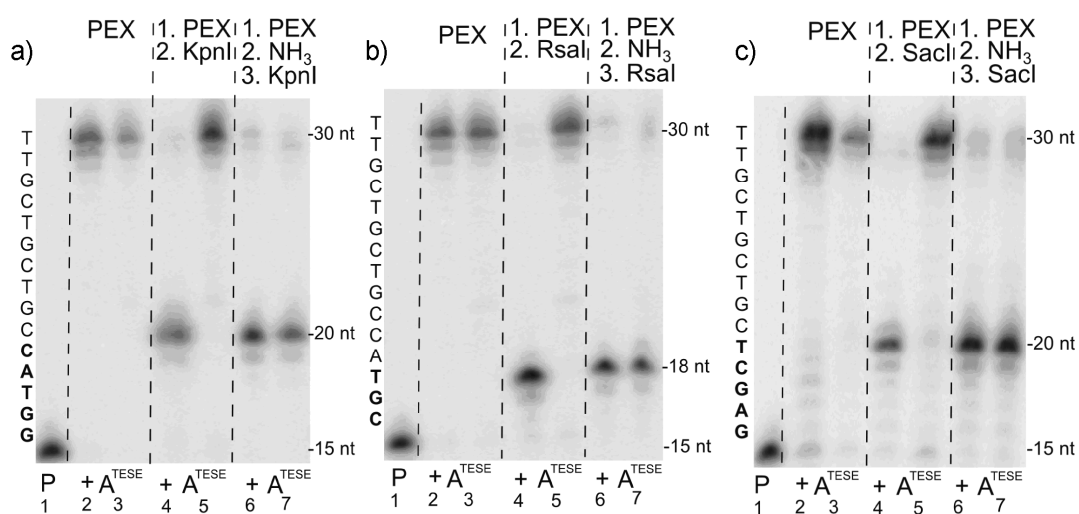
**Schéma 3.** Syntéza (trialkylsilyl)ethynyl substituovaných 7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfátů.

V následujícím kroku jsme inkorporovali  $\mathbf{dA}^{\text{XE}}$  do rozpoznávacích sekvencí pro RE KpnI, RsaI a SacI (všechny tyto RE tolerují ethynyl-modifikaci v rozpoznávací sekvenci) a nechali reagovat s danou RE. Zjistili jsme, že TMSE-modifikovaná DNA byla



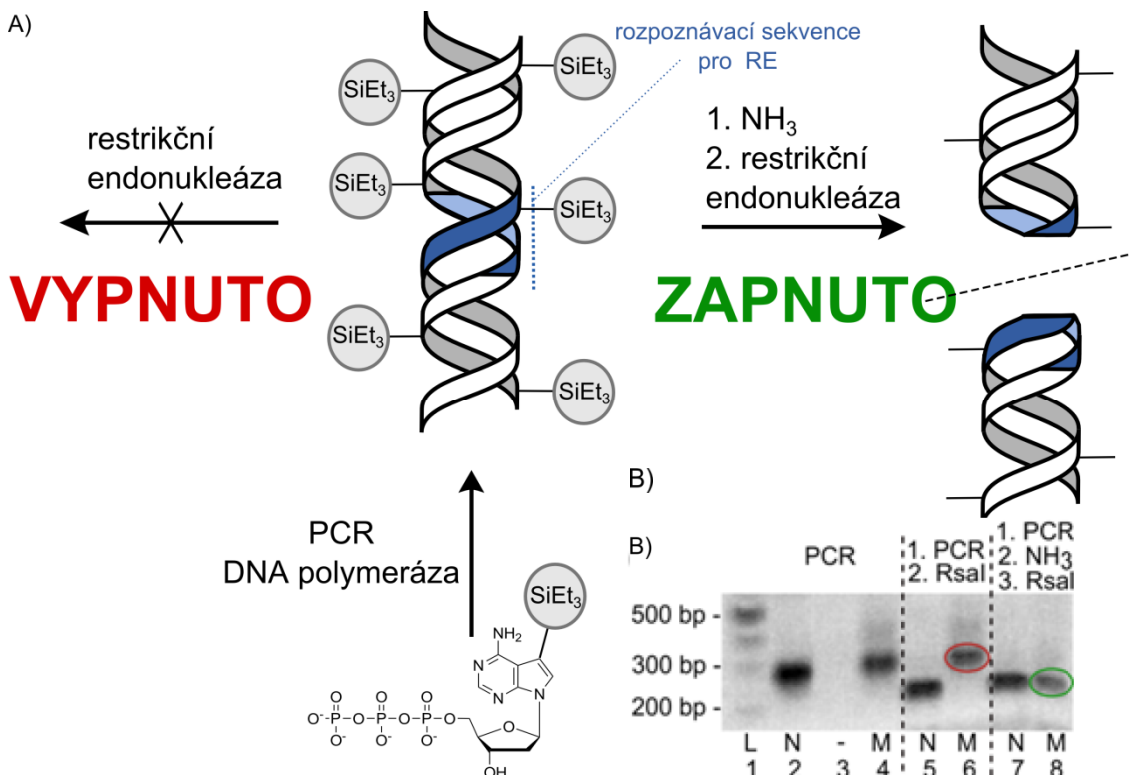
částečně štěpena KpnI a RsaI. Štěpení pomocí SacI bylo inhibováno. Zatímco TESE- (**Obrázek 4**) a TIPSE-modifikovaná DNA plně inhibovala reakci se všemi třemi RE.

(Trimethylsilyl)- a (triethylsilyl)ethynyl-modifikovaná DNA byla ochráněna vodným roztokem amoniaku. Výsledná ethynyl-modifikovaná DNA byla, jak se předpokládalo, štěpena všemi RE (**Obrázek 4**). Kvůli nízké stabilitě a nedostatečné schopnosti chránit DNA proti štěpení RE byla TMS chránící skupina vyloučena z dalších experimentů. K deprotekcí TIPS chránící skupiny byl použit TBAF, který komplikoval další zpracování, důsledkem toho byl nižší výtěžek ethynyl-modifikované DNA. Všechny takto připravené ethynyl-DNA byly po deprotekcí plně štěpeny danými RE.



**Obrázek 4.** PAGE separace po PEXu, deprotekcí a štěpení RE: a) PEX s  $temp^{Kp}$ , štěpení KpnI; b) PEX s  $temp^{Rs}$ , štěpení RsaI; c) PEX s  $temp^{Sa}$ , štěpení SacI. Pruh 1: primer; pruh 2: produkt PEXu s přirozenými dNTP; pruh 3: produkt PEXu s dTTP, dCTP, dGTP,  $dA^{TESE}TP$ ; pruh 4: štěpení přirozeného PEX produktu s RE; pruh 5: štěpení TESE-modifikovaného PEX produktu s RE (DNA není štěpena); pruh 6: reakce přirozeného PEX produktu s  $NH_3$  následována štěpením RE; pruh 7: reakce TESE-modifikovaného PEX produktu s  $NH_3$  následována štěpením RE (DNA je plně štěpena).

Na závěr jsme jasně dokázali, že  $dA^{TESE}TP$  byl dobře inkorporován do delších DNA pomocí KOD XL polymerázy. Výsledná TESE-modifikovaná DNA obsahující restriční místo pro RsaI, byla plně chráněna proti štěpení RsaI, ale po ochránění TES chránící skupiny, byla toto restriční místo opět rozpoznáno RsaI a štěpeno (**Obrázek 5**). Výše popsaná metoda může najít využití při regulaci rozpoznávání DNA transkripčními factory nebo expresi genů.



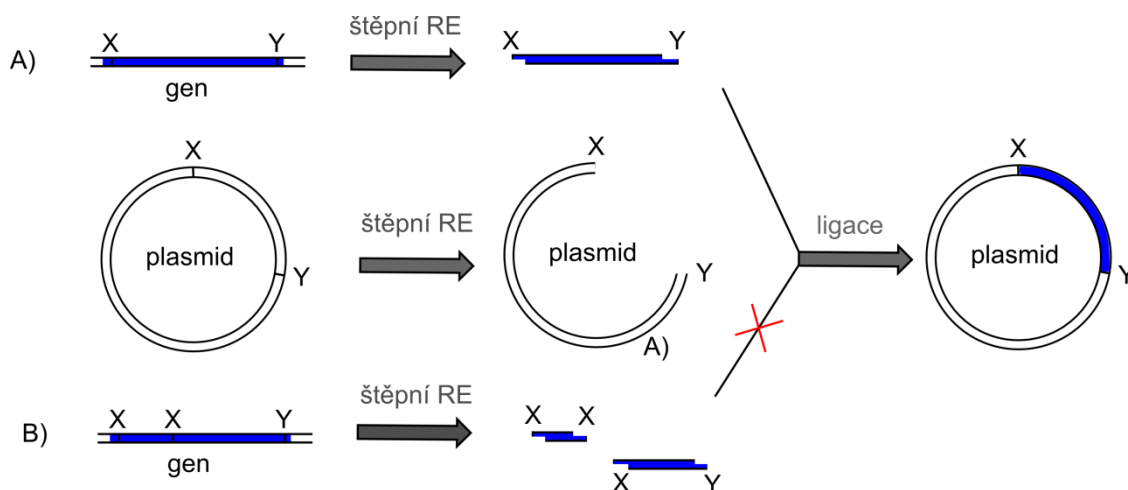
**Obrázek 5.** Přechodné chránění DNA proti štěpení restrikčními endonukleázami za pomoci (triethylsilyl)ethnyl-modifikované DNA A) Schématicky znázorněný postup metody b) Separace PCR produktů a produktů po štěpení RE v agarozovém gelu. Pruh 1: DNA ladder; pruh 2: produkt PCR s přirozenými dNTP; pruh 3: produkt PCR s dTTP, dCTP, dGTP; pruh 4: produkt PCR s dTTP, dCTP, dGTP, **dA<sup>TESE</sup>TP**; pruh 5: štěpení PCR produktu s RsaI; pruh 6: štěpení TESE-modifikovaného PCR produktu s RsaI (neštěpeno, červeně zakroužkováno); pruh 7: reakce přirozeného PCR produktu s NH<sub>3</sub> následována štěpením RsaI; pruh 8: reakce TESE-modifikovaného PCR produktu s NH<sub>3</sub> následována štěpením RsaI (plně štěpeno, zeleně zakroužkováno).

### 3.3 Využití chráněných nukleobází při klonování genů a expresi

Již dříve byly popsány různé techniky, pro klonování genů obsahujících více restrikčních míst pro jednu RE, která by měla být použita pro štěpení a následnou ligaci do plasmidu. Běžně využívaná je tak například mutace kodonu v restrikčním místě. Ne vždy je však možné tuto metodu použít, například, když daný expresní systém neobsahuje příslušnou t-RNA s komplementárním antikodonem.

V této práci popisují, první enzymatický způsob přípravy chemicky modifikovaného genu s přesně definovanými nemodifikovanými sekvencemi, selektivní štěpení daných restrikčních míst, jeho klonování do plasmidu a využití pro expresi proteinu. Tato práce byla provedena ve spolupráci s prof. J. S. Dickschatem a Dr. N. L. Brockem

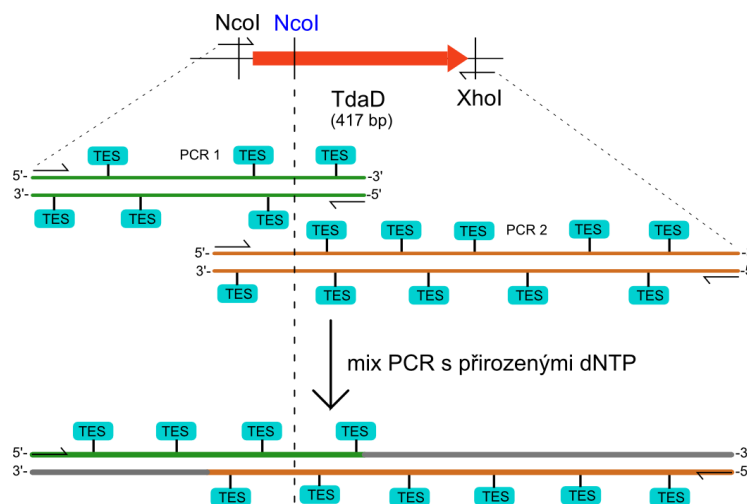
z Braunschweig Universität v Německu, kteří studují *tdaD* geny.<sup>17</sup> *TdaD* geny kódují možné thioester hydrolázy *tdaD* a obsahují restrikční místo pro NcoI v sekvenci genu. Přičemž NcoI RE by měla být použita pro klonování, při použití by tedy docházelo k rozštěpení samotného genu (**Obrázek 6**).



**Obrázek 6.** Klonování genů s A) jedním restrikčním místem pro danou RE B) s více restrikčními místy pro danou RE.

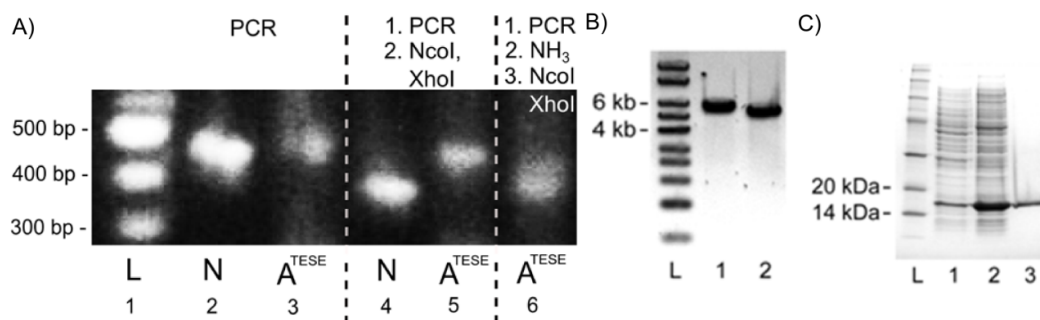
Často používaný expresní systém pET28c(+) pro isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidem (IPTG) indukovatelnou expresi v *E. coli*, který zároveň obsahuje sekvenci His-tag umožňující snadnou purifikaci, využívá při klonování NcoI RE. NcoI restrikční místo totiž obsahuje start kodon. Tato sekvence je zahrnuta ve forward primeru tak, že ATG sekvence se shoduje se start kodonem potřebného genu. Reversní primer je potom navržen tak, aby obsahoval stop kodon původního genu spolu se sekvencí následujících tří párů bází shodných s CTCGAG (rozpoznávací sekvenci pro XhoI RE). Po štěpení a klonování PCR produktu do vektoru pET28c(+), sekvence klonovaného genu je sloučena s XhoI restrikčním místem, které je následováno Histagem a stop kodonem (TGA).

Pro přípravu TESE-modifikovaného PCR produktu pro klonování, který by bylo možné štěpit RE v oblasti primerů, bylo potřeba nejprve navrhnout nový způsob přípravy částečně modifikovaného PCR produktu. Námi navržený postup je znázorněn v **Obrázku 7**. Tento spočívá nejprve v přípravě dvou navzájem se překrývajících PCR produktů, které se připraví za použití dvou párů primerů a  $dA^{TESE}TP$ . V dalším kroku, jsou produkty PCR 1 a PCR 2 použity jako primery při třetím PCR s přirozenými dNTP.



**Obrázek 7.** Postup PCR amplifikace za účelem chránění rozpoznávací sekvence pro NcoI uvnitř genu.

Podářilo se připravit produkty PCR 1 (125 bp) a PCR 2 (399 bp) KOD XL polymerázou s  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\mathbf{TP}$  a tyto byly použity v třetím PCR s přirozenými dNTP (Obrázek 8).



**Obrázek 8.** Separace PCR produktů a proteinů pomocí gelové elektroforézy. Štěpení pomocí NcoI a XhoI. Pruh 1: 100 bp DNA ladder; pruh 2: PCR produkt amplifikace *tadD* s přirozenými dNTP; pruh 3: produkt mix PCR s  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\mathbf{TP}$ ; pruh 4: *tadD* PCR produkt bez modifikace po štěpení s NcoI a XhoI; pruh 5: *tadD* PCR produkt PCR s  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\mathbf{TP}$  (pruh 3) po štěpení s NcoI a XhoI; pruh 6: *tadD* PCR produkt PCR s  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}\mathbf{TP}$  (pruh 3) po reakci s  $\text{NH}_3$  a následným štěpení s NcoI a XhoI. B) Linearizovaný (EcoRV) pET-28c(+) expresní vektor obsahující *tadD* gen (pruh 1, 5647 bp) a linearizovaný pET-28c(+) expresní vektor neobshující *tadD* gen (pruh 2, 5367 bp). E) Produkce TdaD-His<sup>6</sup>. Pruh 1: rozpustné proteiny bez IPTG indukce; pruh 2: rozpustné proteiny po indukci IPTG; pruh 3: Ni<sup>2+</sup>-NTA-chromatografie TdaD-His<sup>6</sup> (16.9 kDa); L: DNA nebo proteinový marker. Gel A byl obarven GelRedem, gel B byl obarven ethidium bromidem, a gel C byl obarven Coomassie brilantní modř.

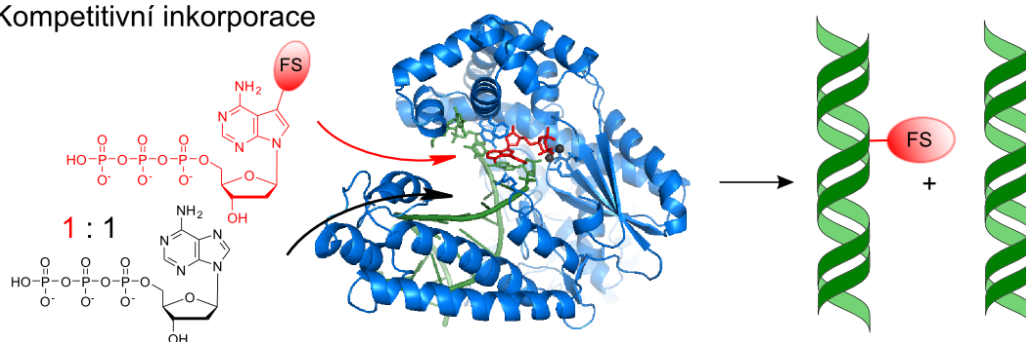
Dr. Nelson Brock provedl konstrukci plasmidu, jeho amplifikaci v *E. coli* a následnou produkci TdaD proteinu. PCR produkt s  $\mathbf{dA}^{\text{TESE}}$  chráněnou vnitřní sekvencí

pro NcoI byl štěpen NcoI a XhoI (pouze restriční místa obsažena v sekvenci primerů) a klonován do pET28c(+) vektoru a výsledný produkt ligace byl transformován do *E. coli* DH5 $\alpha$  (**Obrázek 8**). Pro úspěšnou amplifikaci plasmidu bylo nutné, aby **da**<sup>TESE</sup> modifikovaná sekvence plasmidu byla také replikována během dělení. Jak se potvrdilo izolací plasmidu, jeho linearizací EcoRV a následnou gelovou elektroforézou, plasmid byl úspěšně amplifikován spolu s *tdaD* sekvencí (**Obrázek 8**). Tato skutečnost byla dále potvrzena sekvenací plasmidu. Těmito experimenty bylo také prokázáno, že není potřeba ochránit triethylsilylovou chránicí skupinu před amplifikací. Výsledný konstrukt byl použit pro produkci TdaD (**Obrázek 8**).

### 3.4 Studium kompetitivních inkorporací 7-substituovaných 7-deazaadenin a 5-substituovaných cytosin 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů v přítomnosti jejich přirozených protějšků

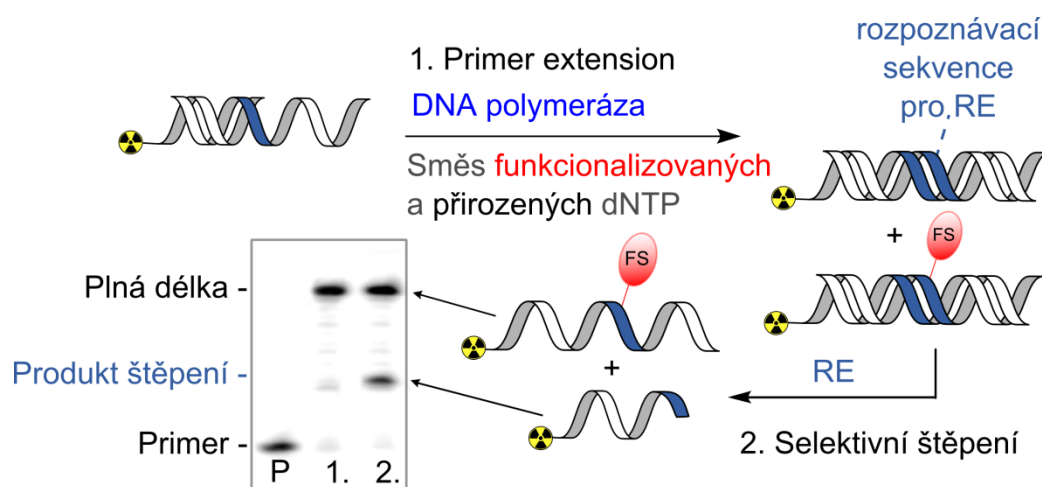
DNA s funkcionalizovanými bázemi našly uplatnění v mnoha odvětvích chemické biologie a medicíně, například: sekvenování DNA, konjugace DNA s proteiny nebo značení DNA *in vivo*. Tyto DNA jsou většinou připraveny pomocí pomocí PEXu nebo PCR. Jen málo pozornosti bylo zatím věnováno kompetitivním inkorporacím modifikovaných **dN<sup>X</sup>TP** v přítomnosti jejich přirozených protějšků. To bylo způsobeno také tím, že nebyla dostupná metoda pro analýzu směsi modifikované a nemodifikované DNA. Obecné schéma kompetitivních inkorporací je znázorněno v **Obrázku 9**.

Kompetitivní inkorporace



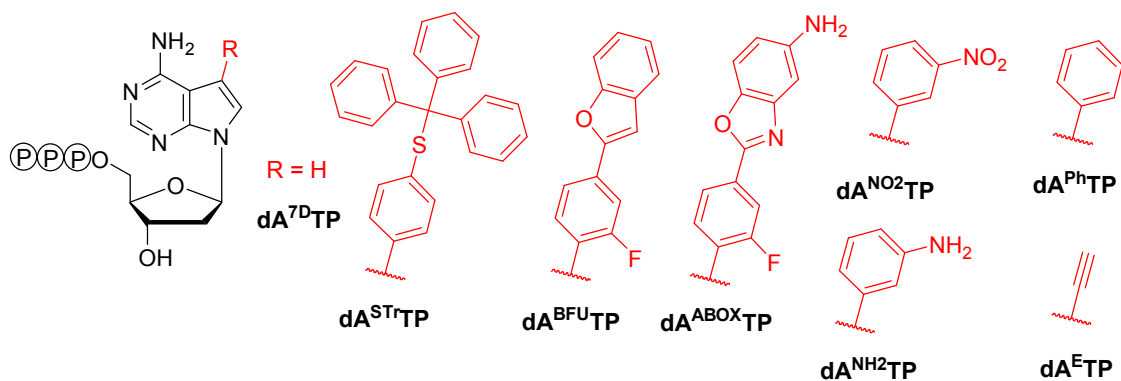
**Obrázek 9.** Kompetitivní inkorporace funkcionalizovaných **dA<sup>X</sup>TP** s přirozeným dATP.

Nejprve jsme testovali navrženou metodu, která je zřejmá z **Obrázku 10**, s  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  a  $\text{dC}^{\text{Ph}}\text{TP}$  za přítomnosti Pwo polymerázy a následným štěpením BamHI a ClaI v tomto pořadí. Separace vzniklé směsi DNA gelovou elektroforézou, rozdělila štěpenou nemodifikovanou DNA od nerozštěpené modifikované DNA za vzniku dvou teček na gelu, které byly kvantifikovány a porovnány za pomoci obrazové analýzy.  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  i  $\text{dC}^{\text{Ph}}\text{TP}$  byly testovány v různých poměrech k přirozenému dNTP (1:1 a 10:1). Výsledky získané analýzou gelu po štěpení RE byly porovnány s výsledky z MALDI analýzy produktů DNA po kompetitivní inkorporaci. Porovnáním byla prokázána shoda mezi oběmi metodami.

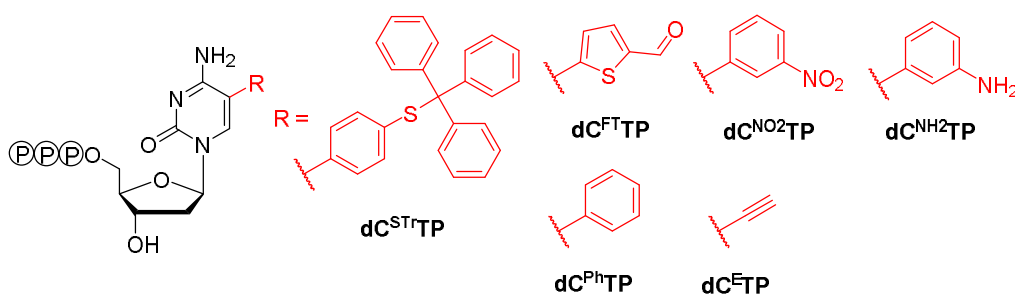


**Obrázek 10.** Navrhnutá metoda na analýzu komeptitivních inkorporací restrikními endonukleázami a následné gelové elektroforézy.

Pomocí výše popsané metody byla dále testována v kompetitivních inkorporacích celá řada různých 7-substituovaných 7-deaza-2'-deoxyadenosinů a 5-substituovaných 2'-deoxycytidinů připravených v naší laboratoři. Tento výběr zahrnoval ethynyl a fenyl deriváty, redoxní značky ( $\text{dN}^{\text{NO}_2}\text{TP}$  a  $\text{dN}^{\text{NH}_2}\text{TP}$ ), fluorescentní značky ( $\text{dA}^{\text{BFU}}\text{TP}$  a  $\text{dA}^{\text{ABOX}}\text{TP}$ ), reaktivní skupiny ( $\text{dC}^{\text{FT}}\text{TP}$ ) a velmi objemné skupiny ( $\text{dN}^{\text{STr}}\text{TP}$ ) (**Obrázek 11 a 12**).



**Obrázek 11.** Funkcionalizované  $dA^XTP$  studované v kompetitivních inkorporacích.



**Obrázek 12.** Funkcionalizované  $dC^XTP$  studované v kompetitivních inkorporacích.

Následně byly testovány kompetitivní inkorporace v PEXu s  $dC^{Ph}TP$  a  $dA^{Ph}TP$  za přítomnosti jejich přirozených protějšků v různých poměrech s různými DNA polymerázami (výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 2**). Obecně  $dC^{Ph}TP$  byl horším substrátem pro většinu DNA polymerázy než dCTP, zatímco  $dA^{Ph}TP$  byl překvapivě lepší substrát než dATP. Kompetitivní inkorporace všech modifikovaných  $dA^XTP$  (**Obrázek 11**) Bst polymerázou ukázala, že  $dA^XTP$  s aromatickými substituenty (kromě příliš velkého  $dA^{STr}$  a ethynylu) jsou lepšími substráty než dATP (**Tabulka 3**). Na druhou stranu derivát 7-deazaadeninu ( $dA^{7D}TP$ ) byl horším substrátem než dATP, pravděpodobně díky ztrátě interakcí na N-7.

**Tabulka 2.** Inkorporace **dA<sup>Ph</sup>TP** různými DNA polymerázami.

Polymeraz	Kompetice <sup>a</sup>	Diskr. <sup>b</sup>	$V_{\max}/K_m$	$K_m^c$	$V_{\max}^d$
Pwo	43	0.4	0.03	24	0.81
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.08	10	0.85
KOD XL	57	0.6	0.17	38	6.3
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.26	18	4.6
Taq	63	1.1	0.042	8.9	0.371
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.039	12	0.49
Vent(exo-)	65	0.4	0.03	24	0.73
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.08	8.7	0.67
Klenow	67	2.4	0.23	2.1	0.49
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.1	2.5	0.25
Bst	67	3	0.18	6.8	1.19
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	0.06	28	1.8
H. Pol. $\alpha$	46	-	-	>100	-
(dATP) <sup>[e]</sup>	-	-	45	0.0009	2.10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup> Procent funkcionalizované DNA. <sup>b</sup> Diskriminace je podíl efektivity inkorporace funkcionalizovaného **dA<sup>X</sup>TP** a efektivity inkorporace dATP, vypočteno podle vzorce:  $(V_{\max}/K_m)_{\text{fnc}}/(V_{\max}/K_m)_{\text{natural}}$ . <sup>c</sup> jednotky  $K_m$  jsou  $\mu\text{M}$ . <sup>d</sup> jednotky  $V_{\max}$  jsou  $10 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{U}^{-1}$ . <sup>e</sup> dATP bylo inkorporováno DNA polymerázou vypsanou o řádek výše.

**Tabulka 3.** Inkorporace funkcionalizovaných **dN<sup>X</sup>TPs** Bst polymerázou.

dN	Competition <sup>a</sup>	Discrim. <sup>b</sup>	$V_{\max}/K_m$	$K_m^c$	$V_{\max}^d$
<b>dA</b>	-	1	0.06	28	1.8
<b>dA<sup>STr</sup></b>	16.9	-	-	>100	-
<b>dA<sup>7D</sup></b>	32	0.3	0.02	60	1
<b>dA<sup>AB</sup></b>	73	1.8	0.11	8	0.94
<b>dA<sup>E</sup></b>	67	2	0.12	13	1.51
<b>dA<sup>NH2</sup></b>	61	2.3	0.14	7	1.02
<b>dA<sup>Ph</sup></b>	67	3	0.18	6.8	1.19
<b>dA<sup>BFU</sup></b>	67	3.7	0.22	5.7	1.27
<b>dA<sup>NO2</sup></b>	70	3.8	0.23	6.5	1.57
<b>dC</b>	-	1	0.27	4.4	1.2
<b>dC<sup>STr</sup></b>	5	-	-	-	-
<b>dC<sup>NO2</sup></b>	11.5	-	-	-	-
<b>dC<sup>NH2</sup></b>	32	0.2	0.06	21	1.34
<b>dC<sup>FT</sup></b>	44	-	-	-	-
<b>dC<sup>E</sup></b>	54	1.5	0.41	3.1	1.29
<b>dC<sup>Ph</sup></b>	58	2	0.54	2.4	1.32

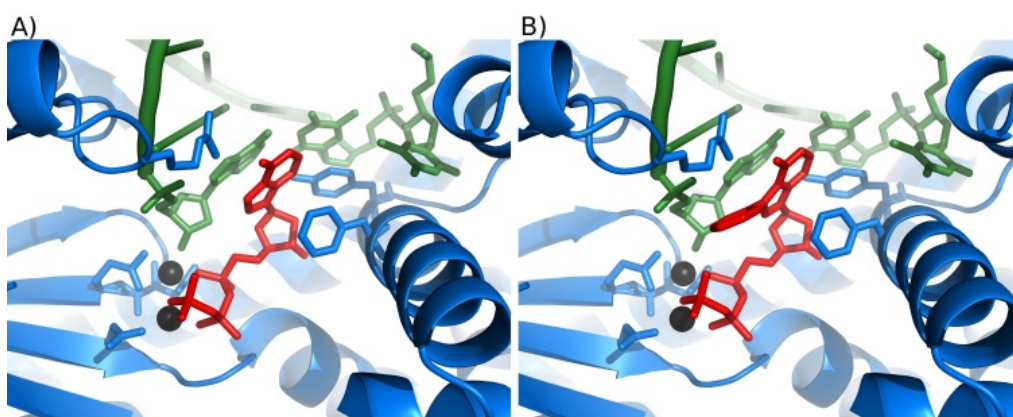
<sup>a</sup> Procent funkcionalizované DNA. <sup>b</sup> Pro definici viz Tabulku 2. <sup>c</sup> jednotky  $K_m$  jsou  $\mu\text{M}$ . <sup>d</sup> jednotky  $V_{\max}$  jsou  $10 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{U}^{-1}$ .

Překvapivě vysoká efektivita 7-aryl **dA<sup>X</sup>TP** v kompetitivních inkorporacích nás přivedla k měření kinetiky jednotlivých **dA<sup>X</sup>TP**. Zajímala nás afinity **dA<sup>X</sup>TP**



k aktivnímu místu Bst polymerázy. Výsledky pro jednotlivé  $\text{dN}^{\text{X}}\text{TP}$  jsou shrnuty v **Tabulce 3**. Tyto experimenty ukázaly, že většina  $\text{dA}^{\text{X}}\text{TP}$ , které byly lepšími substráty v kompetitivních inkorporacích mají také vyšší afinitu k aktivnímu místu Bst polymerázy, tedy nižší  $K_{\text{m}}$  a zároveň vyšší podíl  $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$  než dATP.

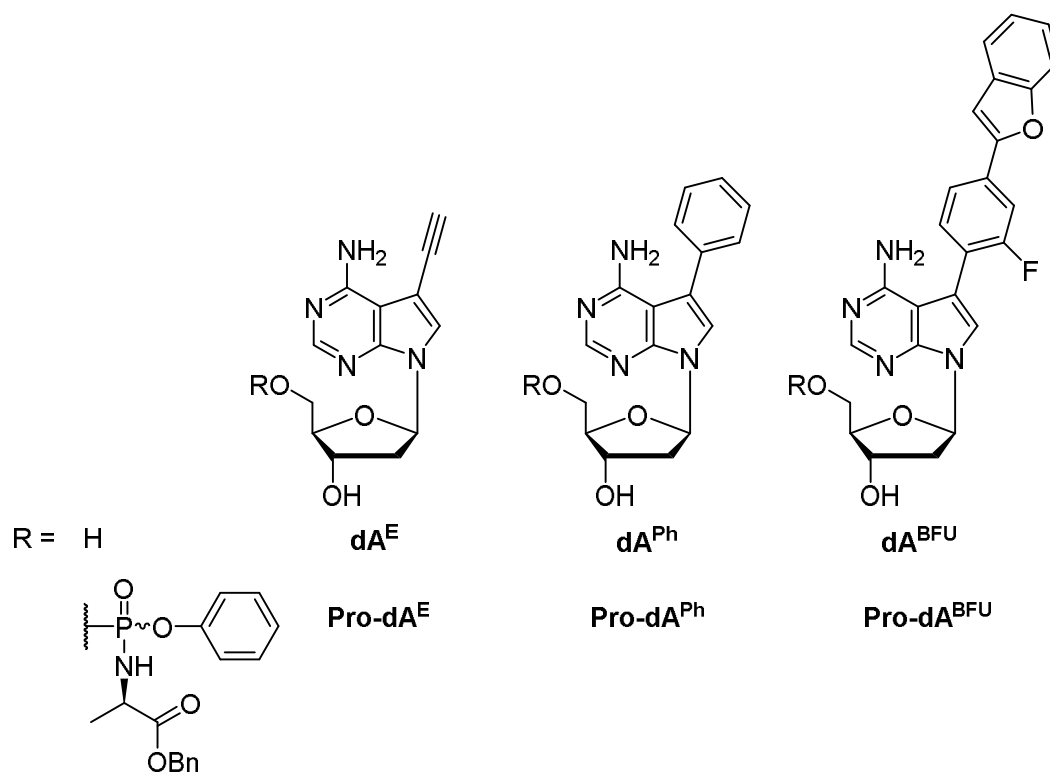
Předešlé experimentální výsledky jsme vysvětlili také pomocí molekulového modelování. Výpočetní studie byla provedena Dr. Jindřichem Fanfrlíkem. dATP a  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  byly dokovány do popsaného komplexu Bst polymerázy s primerem a templátem (pdb 4BDP).<sup>18</sup> Ukázalo se, že  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$  má větší afinitu (negativnější skóre) než dATP (-72,8 a -65,0 kcal.mol<sup>-1</sup>), tento nárůst je způsoben pravděpodobně zesílením  $\pi$ - $\pi$  interakcí 7-fenylového substituentu (**Obrázek 13**).



**Obrázek 13.** Aktivní místo Bst polymerasy s namodelovaným A) dATP a B)  $\text{dA}^{\text{Ph}}\text{TP}$ .

Na základě studia kompetitivních inkorporací modifikovaných  $\text{dN}^{\text{X}}\text{TP}$ , popsaných výše, jsme se rozhodli vyzkoušet metabolické značení genomové DNA a plasmidů pomocí fluorescenčního  $\text{dA}^{\text{BFU}}$ . Jako kontrolní značku jsme použili  $\text{dA}^{\text{E}}$  a studii jsme rozšířili ještě o  $\text{dA}^{\text{Ph}}$ , který sloužil jako příklad nejmenšího 7-aryl derivátu. Všechny použité deriváty jsou znázorněny v **Obrázku 15**. Aby byla splněna kritéria pro úspěšné metabolické značení, tak jsme se rozhodli připravit také jednotlivé pronukleotidy (**Obrázek 14**).<sup>19</sup> Všechny připravené sondy byly použity v metabolickém značení genomové DNA HeLa buněk a plasmidu v *E. coli*. Zjistili jsme, že jak nukleosidy, tak pronukleotidy prostupují do buněk.  $\text{dA}^{\text{E}}$  a  $\text{Pro-dA}^{\text{E}}$  jsou také metabolicky fosforylovány an inkorporovány do DNA HeLa buněk. Objemnější  $\text{dA}^{\text{BFU}}$  a  $\text{Pro-dA}^{\text{BFU}}$

také prostupují do buněk, ale nebylo pozorováno, že by byly inkorporovány do buněčné DNA.



**Obrázek 14.** Nukleosidy a pronukleotidy použité ve studii.

## 4 Závěr

V této práci byla vyvinuta syntéza nových modifikovaných 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů, které byly inkorporovány do DNA a využity v několika chemicko biologických aplikacích.

Byla provedena syntéza "dvouhlavých" nukleosidů a nukleotidů. Syntetický přístup byl založen na vodném Sonogashirově cross-couplingu. Modifikované 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty byly testovány v PEXu a PCR. Zjistilo se, že v obou případech byly dobrými substráty pro DNA polymerázy. Proto mohou být dvouhlavé nukleobáze s různými linkry použity pro přípravu DNA s "druhou" bází ve velkém žlábků. Dále byla vyvinuta metoda na testování inhibice DNA methyltransferáz pomocí modifikované DNA obsahující "dvouhlavé" nukleobáze. Pomocí této metody byly testovány  $\mathbf{dC}^{\text{PC}}$  a  $\mathbf{dC}^{\text{PFC}}$ , ale ukázalo se, že ani jeden z těchto derivátů nevykazuje významnou inhibici testované DNA methyltransferázy M.SssI.

Pro přechodné chránění DNA proti štěpení restričními endonukleázami byla vyzkoušena série tří 7-(trialkylsilyl)ethynyl-7-deazaadeninů. Všechny tři 7-(trialkylsilyl)ethynyl-7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfáty byly syntetizovány Sonogashirovým cross-couplingem a byla vyzkoušena jejich inkorporace do DNA pomocí PEXu a PCR. V PEX reakci byly všechny  $\mathbf{dA}^{\text{XETP}}$  dobrými substráty. Zatímco v PCR (triisopropylsilyl)ethynylová modifikace byla pravděpodobně příliš objemná a tento derivát nebyl v této reakci vhodným substrátem pro polymerázu. Následně bylo vyzkoušeno zda jednotlivé trialkylsilylové deriváty chrání DNA proti štěpení RE. Bylo zjištěno, že trimethylsilylový derivát pouze částečně inhiboval štěpící reakci RsaI a KpnI, zatímco triethylsilylový a triisopropylsilylový derivát štěpící reakci všech zkoušených RE plně inhibovali. Po odchránění triisopropylsilylové skupiny z modifikované DNA pomocí TBAF, trimethylsilylové a triethylsilylové skupiny z modifikované DNA pomocí vodného roztoku amoniaku byly všechny výsledné ethynyl-modifikované DNA opět štěpeny všemi testovanými RE. Popsané experimenty ukazují, že (triethylsilyl)ethynyl-modifikovaný 7-deaza-2'-deoxyadenosin je vhodný pro přechodné chránění DNA proti štěpení restričními endonukleázami. Tato metoda poprvé využívá chránící skupiny tradičně používané v organické syntéze pro regulaci biochemických reakcí.

Metoda přechodného chránění DNA, proti štěpení RE, byla následně aplikována při klonování a expresi proteinu. V této práci popsaná metoda je alternativou k ostatním metodám pro klonování genů, které obsahují více restričních míst pro jednu RE, která se zároveň používá při manipulaci s tímto genem. Hlavní přínos práce spočívá, v použití modifikovaných nukleobází, pro bioorthogonální chránění DNA proti interakcím s proteiny a regulaci biochemických reakcí.

Kompetitivní inkorporace modifikovaných **dN<sup>X</sup>TP** v přítomnosti jejich přirozených protějšků DNA polymerázami byly studovány jen velmi málo, a bylo předjíháno, že modifikované **dN<sup>X</sup>TP** jsou horšími substráty pro DNA polymerázy než přirozené dNTP. Nejprve byla vyvinuta metoda pro analýzu kompetitivních inkorporací založená na RE. Následná systematická studie kompetitivní inkorporací **dN<sup>X</sup>TP** a **dC<sup>X</sup>TP** v PEXu ukázala, že většina 7-aryl **dA<sup>X</sup>TP** je lepším substrátem pro DNA polymerasu než dATP, zatímco většina **dC<sup>X</sup>TP** je horším substrátem než dCTP. Následná studie kinetik a semi-empirické výpočty ukázaly, že tato vysoká efektivita inkorporace je dána nejspíše nárustem  $\pi$ - $\pi$  stackingu arylové modifikace k aktivnímu místu DNA polymerázy s primerem a templátem. Tyto významné poznatky mohou být využity při návrhu nových modifikovaných nukleosidů a nukleotidů pro aplikace v chemické biologii, například pro metabolické značení DNA *in vivo*.

## 5 Použitá literatura

---

- 12 (a) Bentley, D. R. *et al.*: *Nature* **2008**, *456*, 53–59. (b) Balintová, J.; Plucnara, M.; Vidláková, P.; Pohl, R.; Havran, L.; Fojta, M.; Hocek, M.: *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 12720–12731.
- 13 (a) Hocek, M.; Fojta, M.: *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5802–5814. (b) Salic, A.; Mitchison, T. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2415–2420.
- 14 McLaughlin, L. W.; Wilson, M.; Ha, S. B.: *Compr. Nat. Prod. Chem.* **1999**, *7*, 251.
- 15 (a) Macíčková-Cahová, H.; Hocek, M.: *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 7612–22. (b) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, I.: *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1105–1111.
- 16 (a) Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y.: *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875–1916. (b) Hocek, M.; Fojta, M.: *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2233–2241.
- 17 Berger, M.; Brock, N. L.; Liesegang, H.; Dogs, M.; Preuth, I.; Simon, M.; Dickschat, J. S.; Brinkhoff, T.: *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 3539–3551.
- 18 Kiefer, J. R.; Mao, C.; Braman, J. C.; Beese, L. S.: *Nature* **1998**, *391*, 304–307.
- 19 Perrone, P.; Daverio, F.; Valente, R.; Rajyaguru, S.; Martin, J. A.; Lévêque, V.; Le Pogam, S.; Najera, I.; Klumpp, K.; Smith, D. B.; McGuigan, C.: *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5463–5470.

## Seznam publikací vztahujících se k této práci - List of publications of the author related to the thesis

1. Kielkowski, P.; Pohl, R.; Hocek, M.: "Synthesis of Acetylene Linked Double-Nucleobase Nucleos(t)ide Building Blocks and Polymerase Construction of DNA Containing Cytosines in the Major Groove" *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3457–3462.
2. Kielkowski, P.; Macíčková-Cahová, H.; Pohl, R.; Hocek, M.: "Transient and Switchable (Triethylsilyl)ethynyl Protection of DNA against Cleavage by Restriction Endonucleases" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8727–8730.
3. Kielkowski, P.; Brock, N. L.; Dickschat, J. S.; Hocek, M.: "Nucleobase Protection Strategy for Gene Cloning and Expression" *ChemBioChem* **2013**, *14*, 801-804.
4. Kielkowski, P.; Fanfrlík, J.; Hocek, M.: "7-aryl-7-deazaadenine dNTPs are better substrates for DNA polymerases than dATP in competitive incorporations" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7552–7555.

## Konferenční příspěvky - Conference contributions

*Poster presentations are marked with a "P", oral presentations with an "O".*

Kielkowski, P.; Hocek, M.: "Polymerase synthesis of modified DNA containing cytosine in major groove (P)." XVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid, Český Krumlov, Czech Republic. June 5–10, 2011.

Kielkowski, P.; Pohl, R.; Hocek, M.: "Synthesis of modified DNA containing cytosine on acetylene linker in major groove (P)." 17<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry. Hersonissos in Crete, Greece. July 10–15, 2011.

Kielkowski, P.; Macíčková-Cahová, H.; Pohl, R. Hocek, M.: "Přechodné (triethylsilyl)ethynylové chránění DNA proti štěpení restričními endonukleasami (P)."

XII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků. Počátky u Pelhřimova, Czech Republic. May 29 – June 1, 2012.

Kielkowski, P.; Macíčková-Cahová, H.; Pohl, R. Hocek, M.: "Transient Triethylsilyl)ethynyl Protection of DNA against Cleavage by Restriction Endonucleases (P)." 13<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium—Challenges in organic and bioorganic chemistry. Amsterdam, Netherlands. July 26–29, 2012.

Kielkowski, P.; Macíčková-Cahová, H.; Pohl, R. Hocek, M.: "Transient Triethylsilyl)ethynyl Protection of DNA against Cleavage by Restriction Endonucleases (P)." 4th EuCheMS Chemistry Congress. Prague, Czech Republic. August 26–29, 2012.

Kielkowski, P.; Macíčková-Cahová, H.; Hocek, M.: " Transient Triethylsilyl)ethynyl Protection of DNA against Cleavage by Restriction Endonucleases (P)." 47. konference POKROKY V ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ A FARMACEUTICKÉ CHEMII – Liblice 2012. 2–4 Listopad, 2012.

Kielkowski, P.; Macíčková-Cahová, H.; Pohl, R.; Hocek, M.: "Switchable Protection of DNA against Cleavage by Restriction Endonucleases (P)." 14<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium – Challenges in organic and bioorganic chemistry, Vienna, Austria. 25-28 June 2013.

Kielkowski, P.; Hocek, M.: "Competitive Incorporations of Modified versus natural nucleotides by DNA Polymerases (O + P)." XVI<sup>th</sup> Symposium on Chemistry of Nucleic Acids Components. Český Krumlov, Czech Republic. June 8–13, 2014.

## Curriculum vitae

- since 2009     **PhD study**, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i., supervisor associate professor M. Hocek
- 2007–2009     **undergraduate study**, Prague Institute of Chemical Technology, MS degree, Thesis: Model reactions usable for the synthesis of (1→3)-C-disaccharides, supervisor associate profesor L. Kniežo.

2004–2007 **undergraduate study**, Prague Institute of Chemical Technology, Bc degree, supervisor associate profesor L. Kniežo.