

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 můstek 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-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 ochránění 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 ochránění 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 (s jejich přirozenými analogy) do DNA pomocí celé řady DNA polymeras. K analýze byla použita metoda založená na štěpících vlastnostech RE. Ukázalo se, že 7-aryl-7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfáty jsou lepšími substráty pro DNA polymerasy než přirozená dATP, protože mají větší afinitu k aktivnímu místu polymerasy. Zmíněná zjištění byla dále potvrzena měřením kinetik a modelováním.