

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program:

Biochemie

Studijní obor:

Biochemie



Bc. Václav Havelka

**Výzkum DNA kompatibilních reakcí a jejich využití při přípravě DNA
kódovaných knihoven**

Study of DNA-compatible Reactions and Their Utilisation for DNA Encoded Libraries

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jiří Míšek, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl 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

DNA kódované knihovny peptidů jsou základem *in vitro* selekčních metod, které využívají různé biologické systémy („phage display“, „yeast display“, „mRNA display“). Přes velký úspěch těchto selekčních metod je jejich zřejmou nevýhodou omezený počet stavebních bloků, které jsou tvořeny pouze dvaceti proteinogenními aminokyselinami. Zapojení dalších neproteinogenních aminokyselin a dalších stavebních bloků by mohlo podstatně rozšířit spektrum možných aplikací těchto selekčních metod. Například zavedením chemických modifikací v postranních řetězcích aminokyselin v takových knihovnách by umožnilo efektivní studium posttranslačních modifikací (fosforylace, acylace, glykosylace, methylace atd.) v živých organismech. Cílem této práce byl vývoj metody pro přípravu plně syntetické DNA kódované knihovny peptidů. Základními kroky byla chemická syntéza peptidu a s tím spojená enzymová syntéza kódující DNA. Pro syntézu DNA kódovaných knihoven peptidů je nezbytná kompatibilita chemických reakcí s DNA. Jelikož finální kyselé odchránění postranních řetězců v peptidu není kompatibilní s DNA, byly testovány dva přístupy k odstranění tohoto problému. Prvním z nich byl pokus o vývoj jemnějších podmínek odchránění postranních řetězců syntetizovaných peptidů, které mohou být kompatibilní s DNA. Podařilo se najít nové, mírné podmínky odchránění BOC a *t*-Bu chránících skupin. Bohužel další běžně používané chránící skupiny byly vůči této metodě rezistentní. Druhým novým přístupem, který se jevil produktivním, byla postsyntetická stabilizace samotné DNA značky proti vlivům silně kyselého prostředí zavedením 7-deaza purinových nukleotidů. Tímto způsobem byl připraven modelový konstrukt DNA kódované knihovny peptidů, který byl testován s modelovou proteasou.

Klíčová slova: DNA kompatibilní chemické reakce, DNA syntéza a amplifikace, DNA sekvenace

Abstract

DNA-encoded peptide libraries are the basis for *in vitro* selection methods that use various biological systems (phage display; yeast display; mRNA display). Despite the great success of these selection methods, their obvious disadvantage is the limited number of building blocks, which consist of only twenty proteinogenic amino acids. The involvement of other non-proteinogenic amino acids and other building blocks could significantly expand the range of possible applications of these selection methods. For example, the introduction of chemical modifications in amino acid side chains in such libraries would allow the effective study of post-translational modifications (phosphorylation, acylation, glycosylation, methylation, etc.) in living organisms. The aim of this work was to develop a method for preparation of a fully synthetic DNA encoded library of peptides. The basic steps for the preparation were the chemical synthesis of the peptide and associated enzymatic synthesis of encoding DNA. Compatibility of chemical reactions with DNA is essential for the synthesis of DNA-encoded peptide libraries. Because the final acidic deprotection of the side chains in the peptide is not compatible with DNA, two approaches have been tested to overcome this problem. The first was an attempt to develop finer conditions for the deprotection of synthesized side chains that can be compatible with DNA. New, mild conditions for deprotection of BOC and *t*-Bu protecting groups were found. Unfortunately, other commonly used protecting groups have been resistant to this method. The second, new approach, which seemed to be productive, was the post-synthetic stabilization of the DNA tag itself against the condition of a strongly acidic environment by the introduction of 7-deaza purine nucleotides. In this way, a model DNA encoded peptide library construct was prepared and tested with a model proteases.

Key words: DNA-compatible reactions, DNA synthesis and amplification, DNA sequencing

IN CZECH

Poděkování:

Rád bych touto cestou poděkoval lidem, kteří mě na cestě studiem provázeli a podporovali. V první řadě děkuji své rodině a své milované přítelkyni Adéle Hofmanové za to, že jste. Bez vás bych řádky této práce nejspíše nepsal. Dále mnohokrát děkuji panu RNDr. Jiřímu Míškovi, Phd., mnoho jste mě toho naučil a jsem vám za to nesmírně vděčný. Moc děkuji svým kamarádům a kolegům, dny bez vás by jistě nebyly tak hezké, jak byly.

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Seznam zkratk	8
1. Úvod.....	10
2. Literární přehled.....	12
2.1. Biologické DNA kódované knihovny peptidů/proteinů.....	12
2.2. Chemické DNA kódované knihovny malých molekul.....	14
2.3. DNA kompatibilní reakce.....	17
2.4. Syntéza peptidů.....	19
2.5. Posttranslační modifikace a jejich role u onemocnění	21
3. Cíle práce.....	27
4. Materiál a metody.....	28
4.1. Použité chemikálie.....	28
4.2. Použité přístroje.....	29
4.3. Použité metody	30
4.3.1. Fmoc syntéza modelových peptidů	30
4.3.2. Testování mírných metod pro odchránění funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin.....	32
4.3.2.1. Odchránění modelového peptidu 1 v prostředí pufrů o různém pH.....	32
4.3.2.2. Vliv mírných podmínek odchránění modelového peptidu 1 na degradaci DNA	33
4.3.3. Polymerasová řetězová reakce	33
4.3.4. Porovnání stability DNA s 7-deaza purinovými nukleotidy nebo standardními purinovými nukleotidy při klasických podmínkách odchránění peptidu	34
4.3.5. Syntéza konstruktů 1a	35

4.3.6.	Zavedení 7-deaza purinových nukleotidů do kódující DNA konstruktů 1a a ochrání postranního řetězce lysinu	37
4.3.7.	Magnetická separace na streptavidinových magnetických kuličkách	38
4.3.8.	Štěpení konstruktů 1c pomocí trypsinu	39
4.3.9.	Agarosová gelová elektroforéza	39
5.	Výsledky	40
5.1.	Testování mírných metod pro ochrání funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin	40
5.2.	Porovnání stability DNA se standardními nukleotidy a DNA s 7-deaza purinovými nukleotidy při klasických podmínkách ochrání.....	43
5.3.	Syntéza konstruktů 1a	45
5.4.	Začlenění 7-deaza purinových nukleotidů do kódující DNA a ochrání postranního řetězce lysinu	48
5.5.	Separace konstruktů 1c na streptavidinových magnetických kuličkách	52
5.6.	Štěpení konstruktů 1c trypsinem.....	53
6.	Diskuze	55
7.	Závěr	57
	Seznam použité literatury	58

Seznam zkratek

ACN – acetonitril

Alloc – allyloxykarbonyl

Arg – arginin

Asn – asparagin

BOC – *tert*-butyloxykarbonyl

DCM – dichlormethan

DEL – DNA kódovaná knihovna (z angl. „DNA encoded library“)

DIEA – *N,N*-diisopropylethylamin

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

DMT-MM - 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium chlorid

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

Fmoc – 9-Fluorenylmethyloxykarbonyl

Glu – glutamová kyselina

HBTU – *N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorofosfát

HDNA – „headpiece“ DNA

His – histidin

HOBt – hydroxybenzotriazol

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC/MS – hmotnostní spektrometrie kombinovaná s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (z angl. „high performance liquid chromatography/ mass spectrometry“)

Lys – lysin

MS – hmotnostní spektrometrie

MALDI – matrix assisted laser desorption/ionization

NMP – *N*-methylpyrrolidon

pb – páru bází

Pbf – 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

PCR – polymerasová řetězová reakce (z angl. „polymerase chain reaction“)

PMSF – fenylmethansulfonyl fluorid

PTM – posttranslační modifikace

Ser – serin

t-Bu – *tert*-butyl

TFA – trifluoroctová kyselina (z angl. „trifluoroacetic acid“)

Trp – tryptofan

TRIS – 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

Trt – trityl

Tyr – tyrosin

1. Úvod

In vitro selekce pomocí tzv. „display“ technik je metoda, která využívá trvalého spojení peptidu nebo proteinu s příslušnou kódující nukleovou kyselinou¹. Takové propojení fenotypu s genotypem může být provedeno různými způsoby. První použitou metodou byla „phage display“, což je rekombinantní metoda, u níž je libovolný peptid nebo protein syntetizován na povrchu virové částice (bakteriofága) schopné infikovat bakterii². Touto metodou lze připravit rozsáhlé knihovny peptidů nebo proteinů, ze kterých lze následně selektovat jedince s vysokou afinitou k vybranému vazebnému partnerovi (malá molekula, protein, nukleová kyselina, buňka). Identitu peptidu nebo proteinu lze snadno zjistit amplifikací a sekvenací DNA. Právě snadná amplifikovatelnost DNA a její sekvenace umožňuje přípravu rozsáhlých knihoven, které mohou čítat až 10^{10} unikátních sekvencí peptidů/proteinů³. Kromě „phage display“ existují další „display“ metody umožňující expresi na povrchu mikroorganismů („bacterial display“; „yeast display“), ribozomu („ribosome display“) nebo je u nich využito kovalentního spojení kódující mRNA s proteinem nebo peptidem („mRNA display“)⁴⁻⁷. Rozvoj a aplikace těchto technik byly v roce 2018 oceněny Nobelovou cenou. Přes nespornou užitečnost přetrvává u těchto metod jedno společné omezení a tím je možnost využití pouze dvaceti proteinogenních aminokyselin. Použití dalších stavebních bloků by umožnilo rozšířit možnosti aplikací těchto metod. Toto omezení se v posledních deseti letech snaží překonat tzv. DNA kódované knihovny neproteinogenních stavebních bloků⁸. Jedná se o plně syntetické konstrukty, u nichž je syntetický ligand spojen s DNA, která kóduje jeho strukturu. DNA kódování umožňuje efektivní přípravu a screening rozsáhlých knihoven malých molekul vůči farmaceuticky významným cílům – receptorům, enzymům. Úspěšnost tohoto přístupu je potvrzená tím, že některá potenciální léčiva, objevená touto metodou, jsou již v klinické fázi testování⁹.

Pro tyto metody platí předpoklad, že syntetické reakce musí být v průběhu syntézy malé molekuly/ligandu kompatibilní s kódující DNA a nesmí výrazně poškodit její amplifikovatelnost¹⁰. Přítomnost DNA omezuje výběr reakcí, které jsou pro konstrukci ligandu použitelné. Silně nukleofilní činidla (např. Grignardova činidla) a báze nebo naopak silně kyselé podmínky jsou neslučitelné s kódující DNA¹¹. Tato omezení znemožňují přípravu syntetických DNA kódovaných knihoven peptidů, jelikož chemická syntéza peptidů vyžaduje závěrečné kyselé odchránění postranních řetězců. Příprava plně syntetické DNA kódované knihovny peptidů by umožnila aplikace, které nejsou dostupné

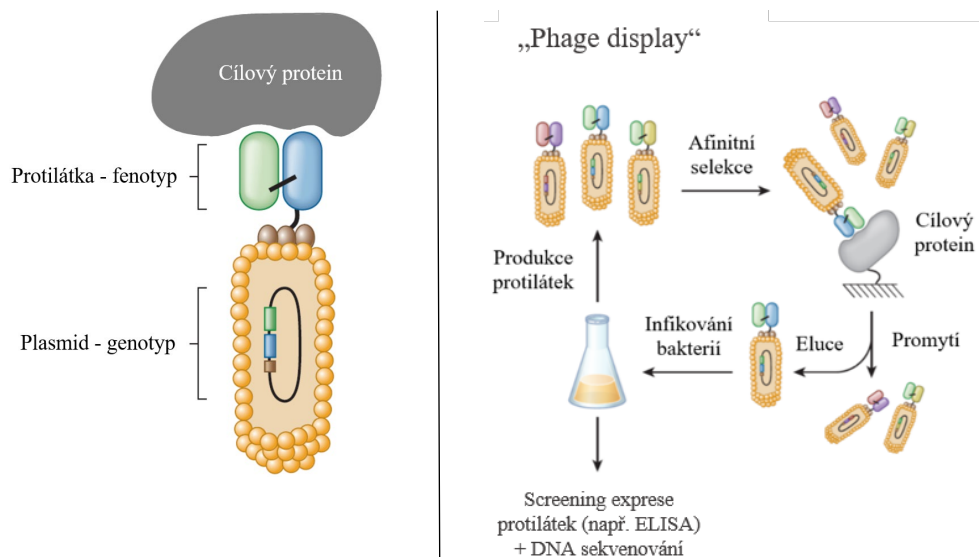
pomocí biologických „display“ metod. Například cíleným zavedením posttranslačních modifikací na postranní řetězce v DNA kódovaných knihovnách peptidů je umožněno studium jejich reaktivity v různých fenotypech. Jinou možnou aplikací je studium a objevování nových posttranslačních modifikací pomocí proteolytické eseje a následného DNA sekvenování s vysokou propustností (*Obr. 2.13*, str. 25). Vzhledem k přítomnosti nespecifické proteasy v eseji není pro takový formát experimentů možné použít žádnou z tzv. „display“ metod.

2. Literární přehled

2.1. Biologické DNA kódované knihovny peptidů/proteinů

Metody přípravy biologických DNA kódovaných knihoven (DEL, z angl. „DNA encoded library“) a jejich následná *in vitro selekce* jsou nazývány jako tzv. „display“ metody, mezi něž se řadí „phage display“, „ribosome display“, mRNA „display“, „yeast display“ a další neméně užitečné „display“ techniky. Jednotícím znakem zmíněných metod je exprese peptidů nebo proteinů na povrchu buňky, viru nebo organely. U biologických DEL platí, že genotyp přímo kóduje fenotyp. Díky DEL bylo umožněno efektivní objevování ligandů schopných interagovat s různými proteiny – enzymy, receptory.

První z vyvinutých „display“ metod byl „phage display“². Zásadní vlastností „display“ metod je, že v rámci jedné částice propojují funkční fenotyp (peptid nebo protein) s genotypem, který ho kóduje. U této metody, poprvé publikované v roce 1985(cit.²), dochází k expresi peptidů nebo proteinů na povrchu bakteriofága. K tomu je nutné zavést DNA kódovaného peptidu nebo proteinu do genu bakteriofága, který kóduje povrchové proteiny. Poté je DNA transformována do bakteriální buňky, v níž dochází k expresi virových proteinů a následně k uvolnění nových virových částic, které na svém povrchu nesou rekombinantní peptidy nebo proteiny. Ty jsou vystaveny na N-konci pIII povrchového proteinu. Použitím specifické knihovny DNA lze připravit rozsáhlou knihovnu variant peptidů nebo proteinů, které jsou vystaveny („display“) na povrchu bakteriofága. Takováto knihovna může být použita pro afinitní selekci s žádaným proteinem¹². Cyklus afinitní selekce je popsán na *Obr. 2.1* (str. 13). „Phage display“ byl používán pro *in vitro* selekci umělých protilátek proti různým farmaceuticky významným proteinům¹³. Jedním z příkladů je terapeutická monoklonální protilátka Humira®¹⁴, která se používá pro léčbu pacientů se zánětlivými onemocněními jako je například revmatoidní artritida. Účinkuje jako deaktivátor TNF α (tumor necrosis factor α).



Obrázek 2.1 – Vlevo je uvedený bakteriofág, na jehož povrchu je exprimovaná zkoumaná protilátka proti cílovému proteinu¹. Podstatou DNA kódovaných knihoven je trvalé spojení genotypu s fenotypem. Může pak být provedena *in vitro* selekce (vpravo), která vede k získání peptidů a proteinů s afinitou k cílovému proteinu. Samotné selekci předchází příprava rekombinantních bakteriofágů. Ty jsou namnoženy v bakteriích a mohou být podrobeny afinitní selekci na imobilizovaném cílovém proteinu. Promytím je zajištěno odstranění nedostatečně interagujících bakteriofágů. Eluce zajistí uvolnění specificky interagujících bakteriofágů, které mohou být následně namnoženy v bakteriích a podstoupit další kolo selekce, nebo mohou být identifikovány sekvenací DNA.

Další z „display“ metod je „ribosome display“⁴. Podstatou této metody je translace daného rekombinantního proteinu nebo peptidu na ribosomu. Sekvence mRNA však neobsahuje STOP kodon, který by způsoboval uvolnění translačního aparátu. Protein nebo peptid zůstává nekovalentně spojený s kódující mRNA. Po afinitní selekci je mRNA z komplexu s proteinem nebo peptidem uvolněna, reverzně transkribována do DNA a sekvenována. Tak je zjištěno, které sekvence interagovaly s cílovým proteinem.

V případě metody mRNA „display“ je postup podobný s metodou „ribosome display“ s tím rozdílem, že dochází ke kovalentnímu spojení kódující mRNA s polypeptidovým řetězcem⁷. Kovalentního spojení je docíleno pomocí vazby puromycinu na 3' konec kódující mRNA. Puromycin napodobuje 3' konec tyrosyl-tRNA, ale nemá hydrolyzovatelnou esterovou skupinu. V důsledku toho dochází ke kovalentnímu spojení peptidu a mRNA¹⁵. Díky mRNA „display“ se povedlo rozšířit možnosti stavebních bloků o nekódované aminokyseliny¹⁶ a *D*-aminokyseliny¹⁷.

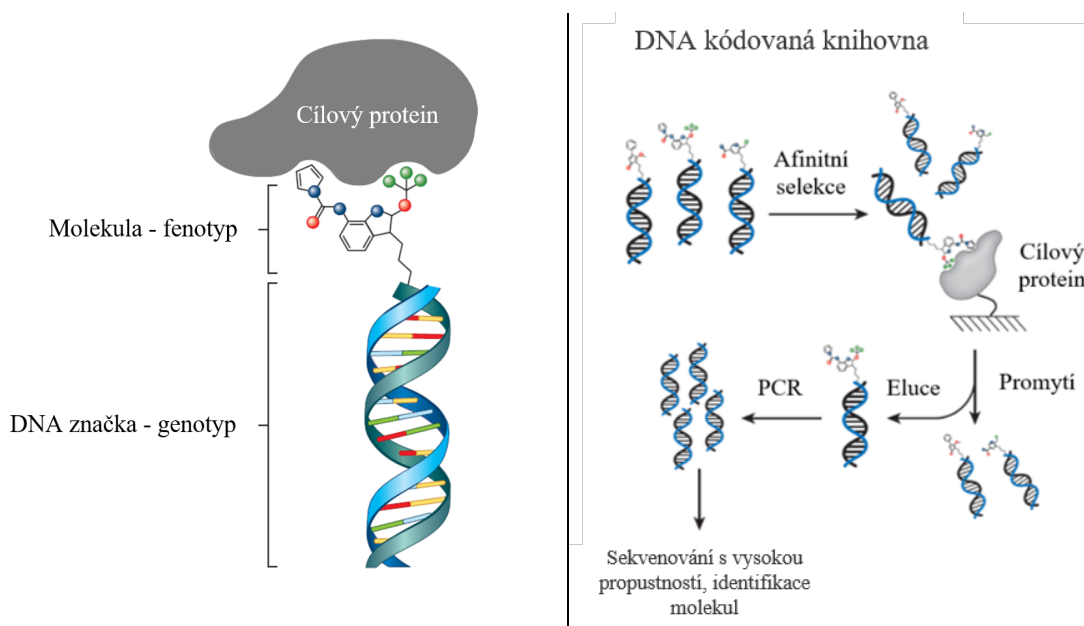
Buněčné „display“ techniky využívají pro expresi rekombinantního proteinu nebo peptidu buněčný aparát a následující *in vitro* selekce probíhá s celými buňkami, na jejichž povrchu jsou rekombinantní proteiny nebo peptidy přítomny¹⁸. Byla publikována metoda

„bacterial display“, při které je využit povrch bakterie *Escherichia coli*^{6,19}. Další buněčnou „display“ metodou je „yeast display“⁵. Metoda využívá buněčný povrch kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Její výhodou je správné sbalení proteinů, protože kvasinky jsou eukaryotické buňky umožňující posttranslační modifikace v rámci endoplasmatického retikula.

Nevýhodou u „display“ metod je, že variabilita stavebních bloků nad rámec dvaceti proteinogenních aminokyselin je velmi omezená. Tato omezení mohou být překonána pomocí chemických DNA kódovaných knihoven malých molekul popsanych v následující kapitole.

2.2. Chemické DNA kódované knihovny malých molekul

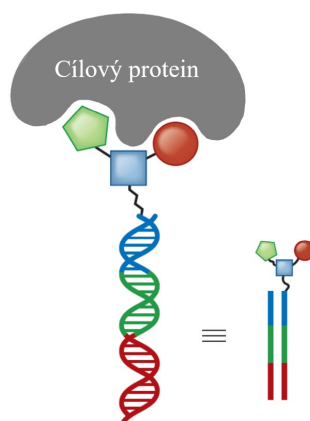
Biologické DEL peptidů nebo proteinů zmíněné v předchozí kapitole přinesly mnoho možností pro objevování molekul s afinitou k cílovému proteinu. Jak je vidět na *Obr. 2.2* biologické DEL peptidů nebo proteinů poskytly inspiraci pro vývoj chemických DNA kódovaných knihoven malých molekul¹. Inspirace plynula především z jednoznačné identifikace molekuly pomocí nukleotidové značky. Chemický přístup k DEL nese výhodu oproti biologickým knihovnám ve využití většího množství stavebních bloků. Kódovat lze každou molekulu při splnění dvou základních podmínek. Zaprvé, že molekula může být vázána na DNA značku a zadruhé, že všechny reakce prováděné v přítomnosti DNA značky ji nesmí zcela degradovat.



Obrázek 2.2 –. Vlevo je uvedeno schéma DNA kódované malé molekuly a vpravo je uvedená selekce DEL malých molekul¹, která nese mnoho společných znaků s „display“ metodami. V prvním kroku je

produkována knihovna DNA kódovaných molekul. Afinitní selekce probíhá na imobilizovaném cílovém proteinu. Molekuly, které s cílovým proteinem interagují dostatečně i v průběhu promytí, jsou poté elucí uvolněny do roztoku. Následně probíhá identifikace molekul amplifikací DNA značek a DNA sekvenací.

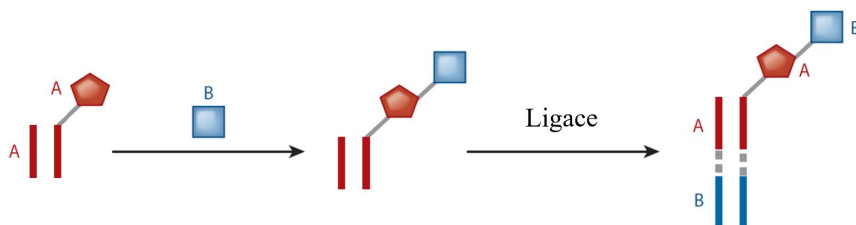
Označení malých molekul pomocí DNA značky (*Obr. 2.3*) dává možnost pro dekódování jejich struktur. Princip chemických DEL byl poprvé publikován v roce 1992(cit.²⁰). Inspirací pro něj byly právě „display“ metody, konkrétně jejich propojení fenotypu a genotypu, ačkoliv DNA značka nefunguje jako templát pro syntézu DNA, ale pouze jako identifikační „čárový kód“ pro rozpoznání označené malé molekuly. Poprvé byl princip aplikován v roce 1993 pro DEL peptidů²¹. Donedávna bylo objevování nových syntetických molekul s afinitou k proteinům (enzymům, receptorům) závislé na prohledávání chemických knihoven. Tento přístup však vyžaduje velmi náročnou logistiku, funkční esej a je velmi nákladný. Připojení DNA značky na zkoumané molekuly hledání cílových sloučenin velmi zjednodušuje. Nukleotidové značky u chemické DEL je možné amplifikovat pomocí metody polymerasové řetězové reakce (PCR), což tuto metodu činí velmi citlivou. Molekuly označené DNA značkou mohou být skladovány ve směsi a může být prováděna afinitní selekce s cílovými proteiny dle *Obr. 2.2* (str. 14) stejně jako je tomu u biologických „display“ metod popsaných výše.



Obrázek 2.3 – Schématické znázornění DNA kódované malé molekuly¹. Strategie kódování je demonstrována tím, že barvy úseků DNA značky odpovídají barvám jednotlivých částí molekul, které značka kóduje. Tím je malá molekula jednoznačně identifikována.

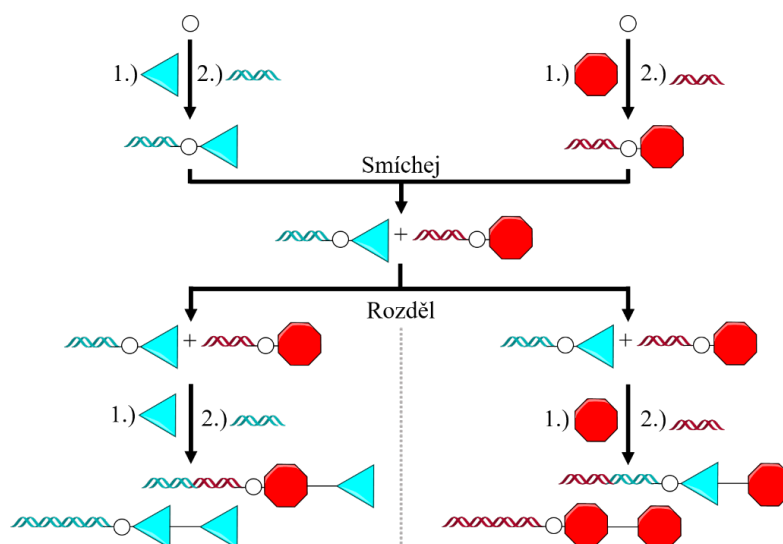
Syntéza DEL začíná na molekule oligonukleotidu s funkční skupinou (nejčastěji aminovou), která slouží pro výstavbu malé, kódované molekuly. Pomocí chemické syntézy je na jedné straně vystavěna molekula a na druhé straně jsou ligační reakcí připojeny příslušné oligonukleotidy jako značky²².

Bylo publikováno několik strategií pro DNA kódování^{23,24}. Nejpoužívanější je metoda, při níž je každá chemická reakce na DNA kódované malé molekule kódována ligací daného oligonukleotidu. Strategie kódování je uvedena na *Obr. 2.4*.



Obrázek 2.4. – Schéma DNA kódování – syntéza zaznamenávaná v DNA¹. Stavební blok A je vázán na kódující oligonukleotid A. V dalším kroku dochází k vazbě stavebního bloku B, který je následně indikován ligací kódujícího oligonukleotidu B.

Užitečný způsob pro tvorbu kombinatoriální knihovny, kde je zastoupeno více stavebních bloků, je metoda „rozděl a smíchej“ (z angl. split and pool)²⁵, jejíž průběh je naznačen na *Obr. 2.5* (str.17). Syntéza probíhá s n různými stavebními bloky a jsou při ní syntetizovány všechny kombinace řetězce o délce x zástupců. Pokud budeme uvažovat kombinatoriální knihovnu molekul se všemi možnými kombinacemi stavebních bloků, tak pak řetězec o počtu x různých stavebních bloků bude tvořit x^n kombinací. Pro každý stavební blok je nutné mít jiný oligonukleotid, celkem tedy n druhů oligonukleotidů. Po navázání každého stavebního bloku je DNA kód opatřen dalším příslušným oligonukleotidem. Po syntéze celé DEL malých molekul dochází k afinitní selekci, jejíž průběh je znázorněn na *Obr. 2.3* (str. 15).



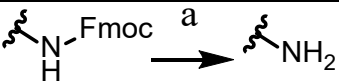
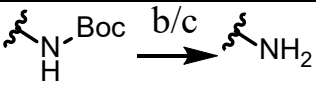
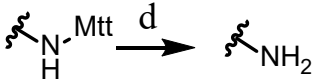
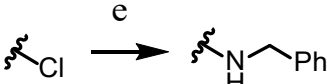
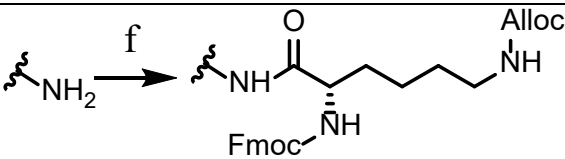
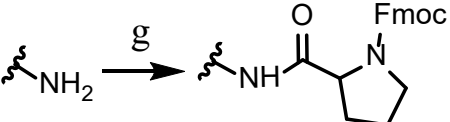
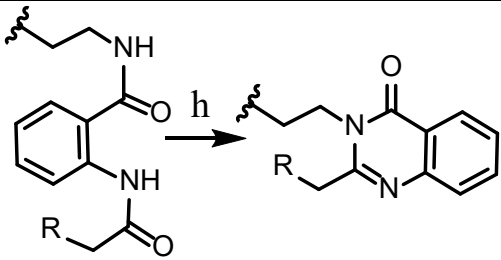
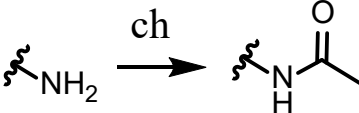
Obrázek 2.5– Schéma syntézy metodou „rozděl a smíchej“ (z angl. split and pool)²⁵. Syntetizují se všechny kombinace dvou druhů stavebních bloků, kterým odpovídají kódující oligonukleotidy. V prvním kroku probíhá navázání stavebního bloku a v druhém kroku je navázán kódující oligonukleotid. Po reakci jsou smíchány reakční směsi a následně rozděleny na dva díly, v oddělených reakčních směsích probíhá připojení druhého stavebního bloku a následně druhého kódujícího oligonukleotidu.

Před samotným dekódováním DNA značky proběhne nejprve amplifikace značky pomocí PCR²⁶. V sekvenci každé značky je ze začátku a na konci konstantní úsek. Ten slouží k hybridizaci PCR primerů pro následnou amplifikaci. Uprostřed sekvence je kódující úsek kódované malé molekuly. Dekonvoluce DNA značky probíhá po získání sekvencí DNA značek. Jelikož při afinitních selekcích nikdy nezískáme jedinou molekulu, která je vázána na cílový protein, je nutné pro následné DNA sekvenování použít sekvenování s vysokou propustností. Pro vyhodnocení výsledků jsou používány vícedimenzionální grafy zajišťující přehledné zobrazení výsledků selekce a výběr nejlépe se vázajících molekul.

2.3. DNA kompatibilní reakce

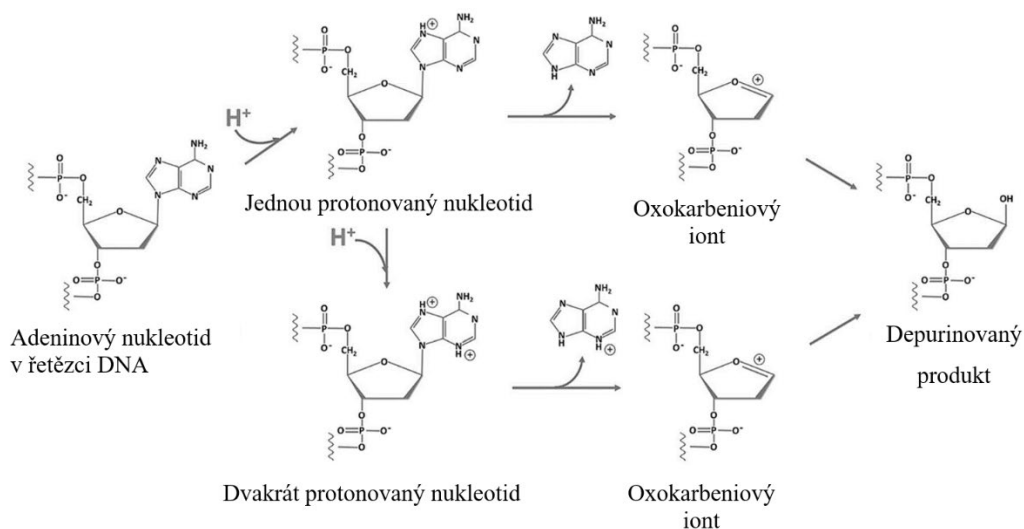
Podmínkou pro přípravu chemických DEL je kompatibilita použitých reakcí pro stavbu malé molekuly s kódující molekulou DNA¹⁰. Syntetické reakce nesmí zcela degradovat DNA, aby bylo zachováno kódování. Po dokončení syntézy musí zůstat ve vzorku amplifikovatelná DNA. Řada standardních reakčních podmínek pro konstrukci malých organických molekul (Grignardova reakce, použití silných kyselin) je nekompatibilních s molekulou DNA, jelikož dochází k její degradaci¹¹. Nicméně existuje relativně pestrá škála reakcí, které dle dostupných informací jsou s DNA kompatibilní a mohou být využity pro syntézu malých molekul (*Tab. 2.1*).

Tabulka 2.1 – Výběr některých reakcí kompatibilních s DNA při syntéze chemických DNA kódovaných knihoven¹⁰. Pro syntézu DNA kódovaných peptidů jsou nejdůležitější reakce, při kterých dochází k odstěpení chránících skupin pro další krok syntézy. Reakční podmínky: (a) piperidin (10% ve vodě, laboratorní teplota, 4 h); (b) octan sodný / chlorid hořečnatý (30 / 200 mM, voda, 70 °C, 16 h); (c) borátový pufr (kyselina boritá 250 mM, pH=9,4; 90 °C, 16 h); (d) trifluoroctová kyselina (1% v dichlormethanu, laboratorní teplota, 15 min); (e) benzylamin (1 M, dimethylformamid (DMF), 37 °C, 3 h); (f) Fmoc-Lysin(Alloc)-OH / DMT-MM (27 / 27 mM, 18% v DMF / H₂O, 4 °C, 18 h); (g) Fmoc-Prolin-OH / hydroxyazabenzotriazol / diisopropylkarbodiimid (40 / 40 / 57 mM, DMF, 37 °C, 1 h); (h) hydroxid sodný (0,5 M, 125 mM kyselina boritá pH=9,4; 90 °C, 16 h); (ch) anhydrid octové kyseliny (20% v DMF, laboratorní teplota, 15 min)

Reakce	Výtěžek reakce (%)	% Amplifikovatelné DNA
	95	70
	Nedetekovatelný	90/80
	>95	50
	>95	80
	65	69
	>95	51
	Nedetekovatelný	0,2
	>95	70

Nukleotidy s purinovými bázemi jsou náchylné ke kyselé katalyzovanému štěpení N – glykosidické vazby dle mechanismu znázorněného na Obr. 2.6 (str. 19)²⁷. Při kyselé katalyzované depurinaci dochází k protonaci atomu dusíku v pozici 7 a následně eliminaci purinové báze. Zmíněný jev je důvodem toho, že příprava chemických DEL peptidů podobně jako biologických DEL je velmi obtížná. Chemická syntéza peptidů

totiž vyžaduje kyselé odchránění postranních řetězců, což jsou podmínky nekompatibilní s kódující DNA.



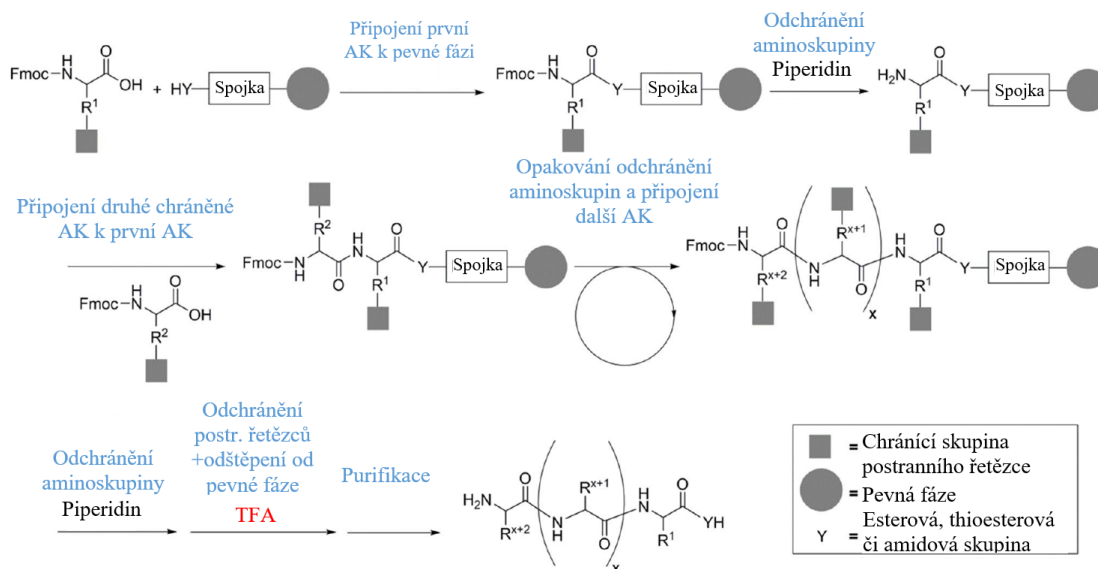
Obrázek 2.6 – Reakční schéma kyselé katalyzovaného odštěpení purinové báze v DNA²⁸. Pro její odštěpení je nezbytný atom dusíku na pozici 7, který je protonován. Depurinace je spojená se vznikem oxokarbeniového iontu. Následnou adicí vody zaniká násobná vazba a připojuje se hydroxylová skupina na první uhlík pentosy.

2.4. Syntéza peptidů

Chemickou syntézu peptidů je možné provádět několika způsoby²⁹. Převratné vylepšení v peptidové syntéze provedl R. B. Merrifield. Vyvinul peptidovou syntézu na pevné fázi, za kterou byl oceněn i Nobelovou cenou. Pevná fáze je tvořena pórovitým materiálem, který nese funkční skupinu umožňující kovalentní vazbu rostoucího peptidu³⁰. Peptid zůstává navázaný na pevné fázi po celou dobu syntézy, protože mezi jednotlivými kroky syntézy je nutné reakční směs obměňovat a promývat pevnou fázi. Díky vazbě peptidu na pevnou fázi odpadá nutnost mezi každým krokem provádět chromatografické čištění.

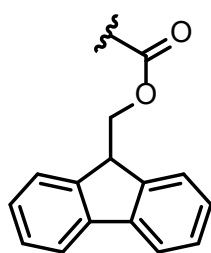
V současnosti nejpoužívanější metodou je tzv. Fmoc syntéza³¹ uvedená na *Obr.2.7* (str.20), při níž je aminoskupina využívaná pro tvorbu peptidové vazby chráněna Fmoc (9-fluorenylmethoxykarbonylovou) skupinou uvedenou na *Obr. 2.8* (str. 20). Při samotné syntéze je karboxylová skupina první aminokyseliny aktivována pro reakci s pevnou fází pomocí činidel jako *N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorofosfátem (HBTU), (Benzotriazol-1-yloxy) tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát (BOP) a podobně³². Následně je Fmoc skupina první aminokyseliny bazicky odstraněna (20% piperidin), pevná fáze je promyta a následuje reakce s druhou aminokyselinou, která je též aktivována pomocí aktivačního činidla. Tento postup je opakován, dokud není získán

peptid s požadovanou délkou. Při syntéze jsou funkční skupiny postranních řetězců, které by mohly interferovat s tvorbou peptidové vazby, chráněny pomocí ortogonálních chránících skupin. Ty jsou odstraněny v posledním kroku syntézy pomocí koncentrované trifluoroctové kyseliny (TFA).

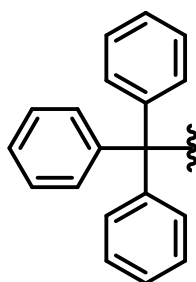


Obrázek 2.7– Schéma Fmoc peptidové syntézy²⁹. V prvním kroku je vázána první aminokyselina na pevnou fázi. Následuje odštěpení Fmoc skupiny, čímž dojde k odchránění aminoskupiny. To umožňuje vazbu další chráněné aminokyseliny v následujícím kroku. Analogicky jsou navazovány další aminokyseliny. Po získání kompletní sekvence peptidu dochází k odchránění postranních řetězců a odštěpení peptidu z pevné fáze.

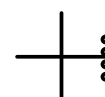
Existuje celá řada ortogonálních skupin používaných pro chránění funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin³³. Běžně používané chránící skupiny jsou uvedeny na Obr. 2.8. Všechny je možné odštěpit pomocí silně kyselých podmínek. Nejčastěji se používá směs koncentrované TFA a fenolu. V reakční směsi pro odchránění, obsahující trifluoroctovou kyselinu, jsou často používány ještě molekuly tzv. „scavengery“. Jsou to protektivní molekuly, které brání uvolněným chránícím skupinám nespecificky reagovat.



Fmoc



Trt



t-Bu

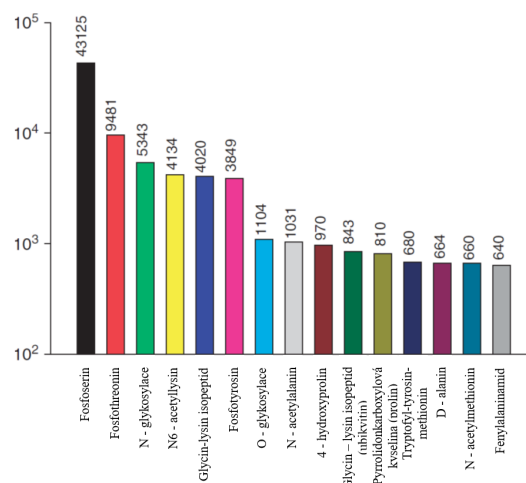


Obrázek 2.8 - Struktury některých chránících skupin používaných při syntéze peptidů³³. Všechny skupiny, s výjimkou Fmoc, je možné odehránit kyselé. Fmoc je využíván pro ochranu α -aminoskupiny při Fmoc syntéze peptidů, přičemž se k jeho štěpení využívají bazické podmínky. Trifenylmethylová skupina neboli trityl (Trt) se používá pro ochranu hydroxylové skupiny. *Tert*-butyl (*t*-Bu) je využíván pro ochranu karboxylové skupiny. *Tert*-butyloxykarbonylová (BOC) skupina chrání aminovou skupinu a 2,2,4,6,7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonylová skupina (Pbf) je používána pro chránění guanidinové skupiny argininu.

2.5. Posttranslační modifikace a jejich role u onemocnění

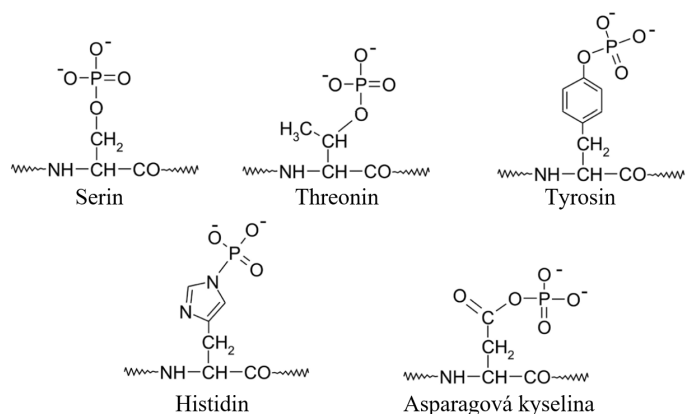
Posttranslační modifikace (PTM) jsou reakce na postranních řetězcích aminokyselin, které probíhají v organismech až po syntéze polypeptidového řetězce na ribozomu³⁴. Díky PTM je rozšířena chemická variabilita peptidů a proteinů nad rámec dvaceti proteinogenních aminokyselin. Výsledkem PTM je kovalentní vazba skupiny atomů na postranní řetězec aminokyseliny. Mimo jiné se mezi tyto modifikace řadí i štěpení polypeptidového řetězce. Většina proteinů a peptidů po translaci podstupuje ještě řadu modifikací, aby dosáhly své biologické aktivity. Reverzibilní PTM jsou velmi důležitým nástrojem regulace dějů v buňce³⁵.

Posttranslačních modifikací je celá řada. Jejich zastoupení je zobrazeno na grafu na Obr. 2.9 (str. 22)³⁶. Některé enzymy pro svou funkci nezbytně potřebují prostetickou skupinu, která je vázána na polypeptidový řetězec. Po navázání této prostetické skupiny se z apoenzymu stává holoenzym. Dále PTM rozhodují o zapnutí nebo vypnutí enzymové aktivity proteinu. Další velkou skupinou modifikací jsou proteinové značky. Ty zajišťují například označení proteinů pro transport do proteasomu, kde jsou následně degradovány. Konformační změny nově syntetizovaného proteinu jsou výrazně ovlivňovány PTM.



Obrázek 2.9 – Graf zastoupení posttranslačních modifikací³⁷. Experiment vychází z celkem 87308 detekovaných posttranslačních modifikací.

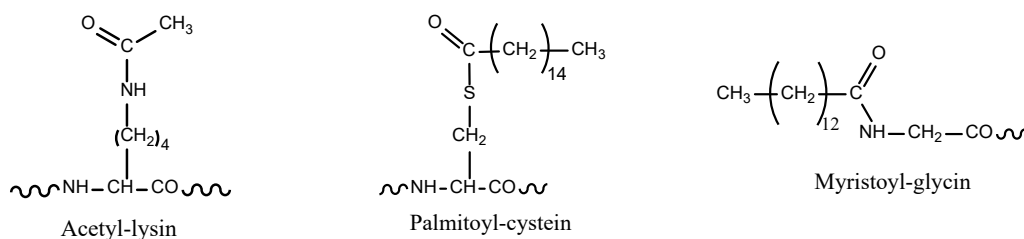
Regulace enzymové aktivity je často zajištěna fosforylací či defosforylací³⁶. K fosforylaci dochází na postranních řetězcích aminokyselin s hydroxylovou skupinou tedy na tyrosinu, serinu, threoninu. Mimo to byly popsány i fosforylace na histidinu a asparagové kyselině. Struktury fosforylovaných aminokyselin jsou uvedeny na *Obr. 2.10* (str. 23). Enzymy zajišťující přenos fosfátu patří do třídy transferas a nazývají se kinasy. Naopak odštěpení fosfátové skupiny katalyzují enzymy patřící do skupiny hydrolas – fosfatasy. Kinasy i fosfatasy plní důležité funkce v signálních drahách, přičemž je kinasová aktivita často vázána na membránové receptory. Příkladem kinas je G-protein, který má extracelulární receptorovou část zodpovědnou za vazbu hormonu či dalších látek³⁸. Po vazbě ligandu se spustí enzymová aktivita uvnitř buňky způsobující mimo jiné i fosforylaci postranních řetězců aminokyselin v molekulách enzymů. Ta zajišťuje jejich aktivaci či deaktivaci. Konkrétními příklady využití G-proteinů jsou aktivace apoptosy³⁹ nebo sekreční dráha proteinů⁴⁰. Porozumění mechanismům apoptosy přináší vysvětlení pro mnoho patologických stavů organismu. Maligní zvrát buňky je zapříčiněn mimo jiné zvýšenou mírou fosforylace, která způsobuje spuštění nebo vypnutí mnohých onkogenů či tumor supresorových genů⁴¹.



Obrázek 2.10 – Chemické struktury fosforylovaných postranních řetězců aminokyselin³⁶. Zavedení záporně nabitě fosfátové skupiny je spojené s konformační změnou proteinu, která často vede k aktivaci nebo deaktivaci enzymové aktivity proteinu.

Acetylace proteinů je další z posttranslačních modifikací³⁶. Tato reakce probíhá na ϵ -aminoskupině lysinu a vzniká tak acetyl-lysín, jehož struktura je uvedena na *Obr. 2.11*. Donorem acetylového zbytku je acetyl-koenzym A. Bazická aminoskupina lysinu, která je v neutrálním pH kladně nabitá, se stává po navázání acetylu nenabitou, což má velký vliv na konformaci proteinu. Acetylace je častá u molekul histonů⁴². Ve chvíli, kdy se má chromozom stát transkripčně aktivním, dochází účinkem transacetylasy ke specifické modifikaci a tím se ruší kladný náboj, který elektrostaticky interaguje se záporně nabitou pentosa-fosfátovou páteří DNA. V důsledku toho dochází k rozvolnění chromatinu a může začít transkripce.

Acylem však nemusí být pouze acetyl, ale může být připojen i delší acyl³⁶. Toho se používá ve chvíli, kdy má být protein zakotven ve fosfolipidové membráně. Nejčastěji zaváděnými acyly jsou zbytky myristové kyseliny na α -aminoskupinu N-koncového glycinu a zbytky palmitové kyseliny na thiolovou skupinu cysteinu⁴³. Struktury obou uvedených modifikací jsou uvedeny na *Obr. 2.11*.

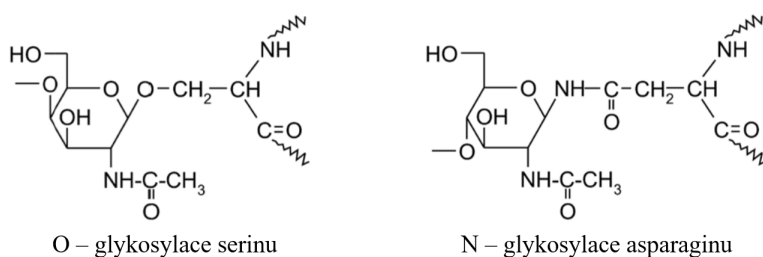


Obrázek 2.11 – Chemická struktura acylovaných postranních řetězců aminokyselin. Původně kladně nabitá ϵ -aminoskupina lysinu ztrácí svůj náboj, což například u histonů vede ke snížení schopnosti interagovat s DNA, čímž je podpořen začátek transkripce. Zbytky mastných kyselin (myristové, palmitové) zajišťují afinitu k fosfolipidovým membránám⁴³.

Ubikvitinace je modifikace pro označení proteinu určeného k degradaci v rámci proteasomu⁴⁴. Degradace je podmíněna minimálně čtyřmi ubikvitiny. Vazba jednoho ubikvitinu na enzym často znamená jeho deaktivaci, jako je tomu například při přechodu z metafáze do anafáze při mitose³⁶. Při tomto přechodu je nutné deaktivovat metafázové enzymy.

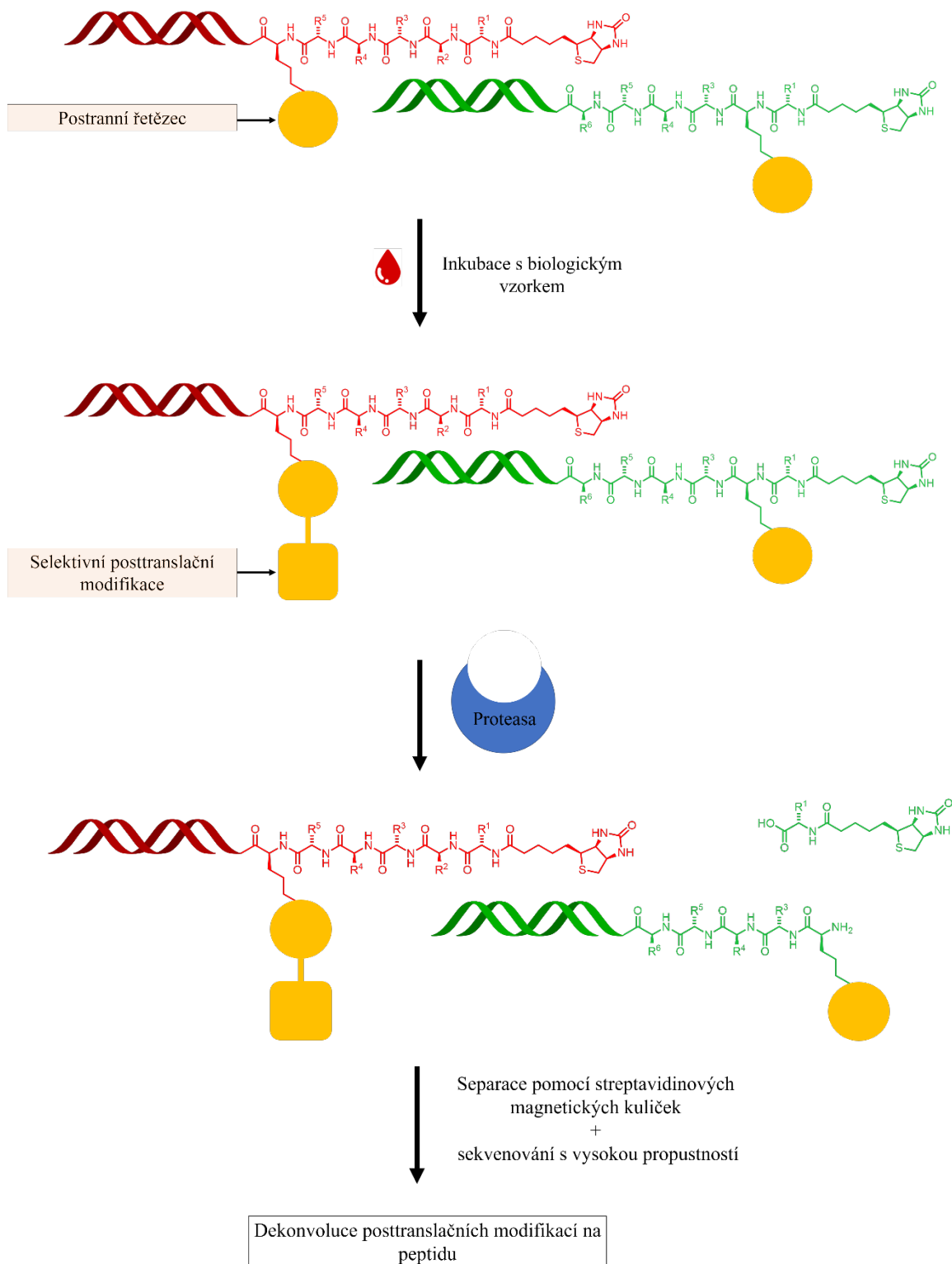
Alkylace proteinů zahrnuje jak připojení methylového zbytku⁴⁵, tak prenylaci, což je připojení farnesyly nebo geranyl-geranylu⁴⁶. Methylace je katalyzována enzymy methyltransferasami. Tyto transferasy jsou vysoce specifické vůči určitým typům histonů. Dokáží přenést jeden či více methylových zbytků na lysin nebo arginin a tím podpořit aktivaci transkripce. Dříve bylo předpokládáno, že methylace je ireversibilní modifikace, ale to bylo vyvráceno objevením methylas. Dynamika methylových modifikací je důležitá pro epigenetickou regulaci⁴⁷. Zavedený prenyl (farnesyl nebo geranyl-geranyl) do struktury proteinu umožňuje jeho afinitu k membránovým lipidům. Prenyl je vázán na cystein. Touto modifikací je vytvořeno místo pro specifické protein-proteinové interakce³⁶.

Glykosylace proteinů má dvě podoby, strukturně znázorněné na *Obr. 2.12*(cit.³⁴). O takzvanou O – glykosylaci se jedná když dochází k modifikaci hydroxylových skupin postranních řetězců serinu a threoninu. Pokud dojde ke glykosylaci na amidové skupině asparaginu, pak se jedná o N – glykosylaci. Ta probíhá téměř na každé sekvenci serin/threonin – X – asparagin. Tato glykosylace na proteinech je velmi důležitá pro správnou funkci chaperonů, které zajišťují správné sbalení glykoproteinů. Jako oligosacharidový prekurzor pro N - glykosylaci slouží dolichol-difosfát, který je přenesen na amidovou skupinu pomocí oligosacharyltransferasy. Dolichol je čtrnáctičlenný oligosacharidový zbytek, který je dále zpracován hydrolasami a transferasami. O-glykosylace je oproti N-glykosylaci mnohem méně komplexní³⁶.



Obrázek 2.12 – Produkty připojení N-acetylglukosaminu skrze N – a O – glykosylaci postranních řetězců aminokyselin serinu a asparaginu³⁶.

PTM a jejich deregulace hrají významnou roli při vzniku a rozvoji řady závažných onemocnění (neurodegenerativní onemocnění, onkologická onemocnění)⁴⁸. Důvodem proč tomu tak je, že jsou výrazně zapojeny v signálních drahách, regulaci transkripce a buněčného cyklu a dalších esenciálních buněčných dějích⁴⁹. Proto je jejich studium důležitým odvětvím biomedicínského výzkumu. PTM je možné studovat hlavně metodami hmotnostní spektrometrie a blotovacími technikami⁵⁰. Přes nesporný úspěch těchto metod pro ně existují též omezení, kterými jsou například citlivost, dynamický rozsah či nutnost znalosti chemické podstaty/struktury dané modifikace. Aplikace chemických DEL peptidů by mohla vést k vývoji vysoce citlivé metody identifikace posttranslačních modifikací a příslušných enzymů v komplexních biologických vzorcích. Návrh takové aplikace je znázorněn na *Obr. 2.13* (str. 26). DNA kódovaná knihovna peptidů je nejprve inkubována s biologickým vzorkem (sérum, buněčný lyzát), což se projeví posttranslačními modifikacemi peptidů specifickými pro daný fenotyp. Následně je knihovna inkubována s nespecifickou proteasou (trypsin, pepsin atd.). PTM postranních řetězců aminokyselin, jejichž sekvence je specifická k dané protease, mnohdy značně mění chemickou strukturu postranního řetězce a tím zabraňují štěpení danou proteasou. Následuje separace štěpených a neštěpených peptidů a jejich identifikace pomocí DNA sekvenování s vysokou propustností. Sekvenace DNA značek peptidů, které obsahují sekvenci aminokyselin specifickou pro danou proteasu, avšak u nich nedošlo ke štěpení, jsou takové sekvence, u kterých mohlo dojít k posttranslačním modifikacím. Tento formát lze využít i k porovnávání různých fenotypů (vzorek nemocného a zdravého jedince) a tím sledování výskytu a důležitosti PTM v daných fenotypech. Oproti biologickým DEL peptidům jsou chemické DEL peptidů kompatibilní s přítomností nespecifických proteas, protože neobsahují peptidovou spojku, v níž může docházet k proteolytickému štěpení mimo zkoumanou sekvenci aminokyselin, čímž by docházelo k nespecifickému odštěpování značky pro imobilizaci (biotin).



Obrázek 2.13 – Schéma aplikace DEL peptidů pro studium posttranslačních modifikací. Kombinatoriální chemická DEL peptidů může být smíchána s biologickým vzorkem (krev, sérum), který obsahuje enzymy katalyzující modifikační reakce postranních řetězců aminokyselin. Po inkubaci může dojít ke štěpení peptidové části konstruktů proteasou. Pokud však došlo k posttranslační modifikaci, tak nemusí být sekvence štěpena, i když by odpovídala specifitě proteasy. Při separaci pomocí streptavidinových magnetických kuliček dojde k oddělení DNA kódovaných peptidů s biotinem (neštěpených) od fragmentů DNA kódovaných peptidů s již štěpeným biotinem. Sekvenací je zjištěna identita DNA značek v jednotlivých frakcích.

3. Cíle práce

- Syntéza chráněných modelových tetrapeptidů
- Screening mírných podmínek odchránění modelových tetrapeptidů
- Studium stability DNA s 7-deaza purinovými nukleotidy v silně kyselých podmínkách
- Syntéza konstruktů **1** jako modelového zástupce DNA kódované knihovny peptidů
- Zavedení 7-deaza purinových nukleotidů do konstruktů **1** a odchránění postranního řetězce
- Štěpení konstruktů **1** trypsinem

4. Materiál a metody

4.1. Použité chemikálie

(4,6-dimethoxy-(1,3,5)triazin-2-yl)-4-methyl-morfolinium chlorid (DMT – MM)	Sigma-Aldrich
10× TBE pufr	BioRad
2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (TRIS)	Sigma-Aldrich
7-deaza-dATP, 7-deaza-dGTP	Jena Biosciences
Agarosa pro molekulárně biologické aplikace	BioRad
Biotin	Sigma-Aldrich
CutSMART pufr 10×	NEB
Délkové standardy pro agarosovu elektrofézu: EZ Load 1kbp Molecular Ruler, EZ Load 100bp Molecular Ruler	BioRad
Délkový standard pro agarózovou elektroforézu: Quick-Load Purple 100bp DNA Ladder	VWR
Dichlormethan	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
dNTP samostatné vialky s dA, dC, dG, dT	VWR
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fenol	Sigma-Aldrich
Fenylmethansulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Fmoc- <i>L</i> -Arg(Pbf)-OH	Iris Biotech
Fmoc- <i>L</i> -Asn(Trt)-OH	Iris Biotech
Fmoc- <i>L</i> -Glu(tBu)-OH·H ₂ O	Iris Biotech
Fmoc- <i>L</i> -His(Trt)-OH	Iris Biotech
Fmoc- <i>L</i> -Lys(Boc)-OH	Iris Biotech
Fmoc- <i>L</i> -Ser(tBu)-OH	Iris Biotech
Fmoc- <i>L</i> -Trp(Boc)-OH	Iris Biotech
Fmoc- <i>L</i> -Tyr(tBu)-OH	Iris Biotech
HDNA – 5 Micromole DNA oligo	IDT
Hydroxid sodný	Sigma-Aldrich
Hydroxybenzotriazol (HOBt)	Sigma-Aldrich
Chlorid draselný	Sigma-Aldrich
Chlorid hořečnatý	Sigma-Aldrich
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich
Chlorovodíková kyselina	Sigma-Aldrich
Interkalační barvivo: Gelred™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000× in water	Biotium
Kyselina trihydrogenboritá	Sigma-Aldrich
<i>L</i> -glycin	Sigma-Aldrich
Ligační pufr 10x	NEB
Methanol	Sigma-Aldrich
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU)	Sigma-Aldrich

<i>N,N</i> -diisopropylethanolamin (DIEA)	Sigma-Aldrich
Nanášecí pufr – 5× Nucleic Acid Sample Loading Buffer	BioRad
Nanášecí pufr - Gel Loading Dye purple (6×) no SDS	VWR
Nedenaturovaný ethanol (96%)	P-LAB
Nicking endonukleasa Nt.BbvCI - 10 U/ml	New England Biolabs
NMP	Sigma-Aldrich
Octová kyselina	Sigma-Aldrich
Oligonukleotid „Forward primer anti“ o sekvenci: 5' -Phos-TGAGTAGCGAAGCGAGCAGCTGAGGGCGGC	Sigma-Aldrich
Oligonukleotid „Forward primer“ o sekvenci: 5' -Phos-GCCGCCCTCAGCTGCTCGCTTCGCTAC	Sigma-Aldrich
Oligonukleotid „Testovací oligonukleotid + reverse primer anti“ o sekvenci: 5' -GGGGGACTGCTCGTAGTGTTTTTAGCTGCGAGTT CAGTCTCCACCGCTTTGGGCTGTCCTGATATTTCTAT GGTCCGCAATCAGCTGCTCGCTTCGCTAC	Sigma Aldrich
Oligonukleotid „Testovací oligonukleotid + reverse primer“ o sekvenci: 5' -Phos-TCATTGCGGACCATAGAAATATCAGGACA GCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAGCTAAAAAC ACTACGAGCAGTCCCCC	Sigma Aldrich
PCR primer: PCR test „forward“ o sekvenci 5' - GCGGCCATATCGAAGGTC	Sigma-Aldrich
PCR primer: PCR test „reverse“ o sekvenci: 5' - CGGGCTTTGTTAGCAGCC	Sigma-Aldrich
PCR primer: Testovací oligonukleotid „forward“ o sekvenci: 5' -TCAGCTGCTCGCTTCGCTAC	Sigma-Aldrich
PCR primer: Testovací oligonukleotid „reverse“ o sekvenci: 5' -GGGGGACTGCTCGTAGTGTTTT	Sigma-Aldrich
Pevná fáze HMPB ChemMatrix® Resin	Sigma-Aldrich
Modelová plasmidová DNA (175 nM, M _w = 200000 g/mol)	—
Pyridin	Sigma-Aldrich
Red Taq DNA polymerasa 2× MasterMix, 1,5 mM MgCl ₂	VWR
Streptavidinové magnetické kuličky Dynabeads M-270	Invitrogen
T4 DNA ligasa (400 U/ml)	New England Biolabs
Taq DNA polymerasa – 5 U/μl	VWR
Tekutý dusík	Linde
Trifluoroctová kyselina (TFA)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

4.2. Použité přístroje

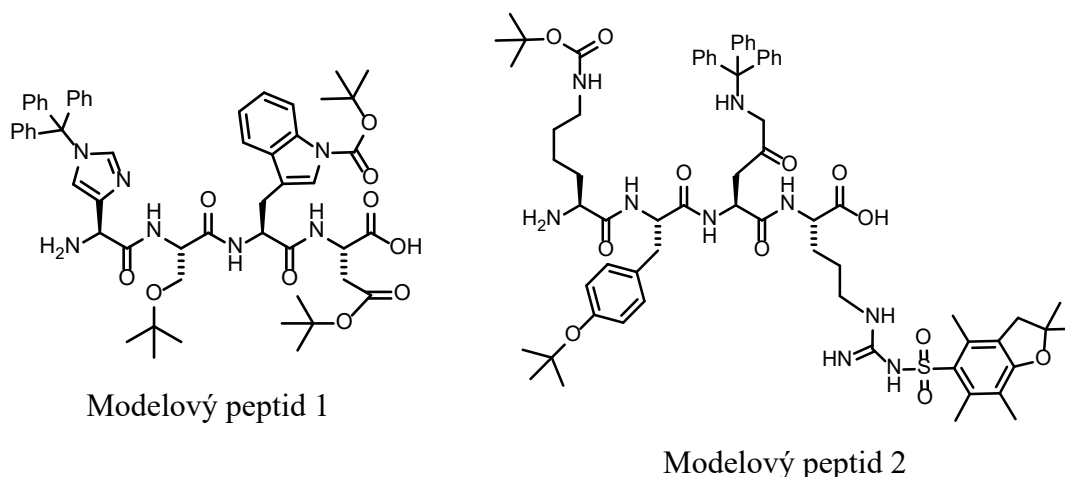
Analytické váhy	Schoeller
Automatické pipety Research plus	Eppendorf AG
Centrifuga 5418 R	Eppendorf AG

CentriVap	LABCONCO
HPLC: 1260 Infinity	Agilent Technologies
HPLC/MS: 6530 Q-TOF LC/MS	Agilent Technologies
Lyofilizátor Freezone 2.5	LABCONCO
Magnetická míchačka s ohřevem	IKA
Mikrovlnná trouba	—
PCR termocykler Aeri D-48× 0,2ml	Esco Micro Pte Ltd
pH metr	Mettler
Programovatelný rotátor Multi Bio RS-24	Biosan Ltd.
Předvážky AQT-600	AE ADAM
Rameno vakuové odpary pro míchání	Agilent
Sonikační lázeň	Bandelin
Stojánek na mikrozkuhavky s magnetem	General Electric
UV transiluminátor T-GENIUS	SYNGENE
Vakuová pumpa	VWR
Zdroj pro elektroforézu PowerPac HV Power Supply+ vanička pro DNA elektroforézu	BioRad

4.3. Použité metody

4.3.1. Fmoc syntéza modelových peptidů

Pro syntézu peptidu byla použita pevná fáze HMPB ChemMatrix® resin. Na této pevné fázi byly pomocí Fmoc peptidové syntézy vystavěny dva chráněné modelové peptidy (peptid 1 a peptid 2), jejichž struktury jsou uvedeny na *Obr. 4.1*.



Obrázek 4.1 – Struktury modelových tetrapeptidů před odchráněním. Vlevo je sekvence lysin – tyrosin – asparagin – arginin (Lys-Tyr-Asn-Arg) a vpravo je histidin – serin – serin – tryptofan – glutamová kyselina (His-Ser-Trp-Glu). Typy chránících skupin byly zobrazeny na *Obr. 2.8* (str. 21). Ph = fenyl.

Při syntéze peptidu na pevné fázi bylo použito aktivační činidlo *N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU)⁵¹. Dále byl přidán hydroxybenzotriazol

(HOBt). Tato látka zamezuje vzniku nereaktivního derivátu močoviny. Bazické podmínky reakce jsou zajištěny *N,N*-diisopropylethylaminem (DIEA).

Nejprve bylo odváženo 152 mg pevné fáze s kapacitou (loading) 400 – 650 $\mu\text{mol/g}$. Tato navážka odpovídá teoretické kapacitě resinu $9,88 \times 10^{-5}$ mol peptidu. Syntéza peptidů probíhala ve stříkačce s polyethylenovou fritou. Nejprve byla navážka pevné fáze převedena do stříkačky. K pevné fázi byly přidány 2 ml NMP a suspenze byla inkubována za laboratorní teploty po dobu 20 minut a za stálého míchání. Všechny roztoky aminokyselin byly připraveny v NMP o koncentraci 0,5 M, stejně jako roztoky HBTU a HOBt. Roztok DIEA byl připraven v koncentraci 1 M. Po promytí pevné fáze bylo rozpouštědlo odebráno a do stříkačky byla přidána předem připravená reakční směs pro navázání první aminokyseliny. Tato směs byla předem smíchána v plastové zkumavce dle poměrů v *Tab. 4.1*. Následovala inkubace za laboratorní teploty po dobu 1 hodiny a za stálého míchání. Výše uvedený postup reakce s první aminokyselinou byl ještě jednou opakován. Po inkubaci s druhou reakční směsí byla pevná fáze pětkrát promyta 2 ml NMP. Před navázáním další aminokyseliny bylo nutné odštěpení skupiny Fmoc z již vázané aminokyseliny. K pevné fázi byly přidány 2 ml 50% (v/v) roztoku piperidinu v dimethylformamidu (DMF) a směs byla inkubována za laboratorní teploty po dobu 20 minut a za stálého míchání. Postup ochrání byl ještě jednou opakován. Po ochrání následovalo promytí pevné fáze následující sekvencí rozpouštědel: DMF (čtyřikrát), dichlormethan (DCM, třikrát), DMF (dvakrát), NMP (třikrát). U každého kroku promývání byly přidány 2 ml daného rozpouštědla do stříkačky a stříkačka byla několikrát převrácena a rozpouštědlo odstraněno.

Tabulka 4.1 – Reakční poměry složek při syntéze peptidu na pevné fázi

Reakční složka (koncentrace)	Objem (μl)	Počet ekvivalentů látkového množství složky ke kapacitě pevné fáze
Aminokyselina (0,5 M)	593	3
HOBt (0,5 M)		3
HBTU (0,5 M)		3
DIEA (1 M)		6

Všechny aminokyseliny jsou postupně navazovány do sekvence peptidu opakováním výše uvedeného postupu. Peptid byl následně odštěpen od pevné fáze dle návodu Novabiochem® „Fmoc resin cleavage protocols“ (Metoda 5 – štěpení zředěnou TFA)⁵².

K resinu bylo přidáno 1 ml 1% (v/v) roztok TFA v DCM. Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 2 min a za stálého míchání. Roztok byl přemístěn do 10ml plastové zkumavky, do které bylo předtím pipetováno 200 μ l 10% (v/v) roztoku pyridinu v methanolu. Tento postup byl opakován ještě třikrát. Pevná fáze byla celkem třikrát promyta 1 ml DCM. Následně byly filtráty smíseny a odpařeny na vakuové rotační odparce na 5 % objemu. Byly přidány 3 ml deionizované vody. Peptidy byly čištěny pomocí preparativní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC): přístroj Agilent Technologies 1260 Infinity, kolona Agilent ZORBAX SBC18 (5 μ l, 9.4 \times 150 mm), gradientová eluce (voda – ACN od 70:30 do 0:100 v průběhu 20 min, průtok 4 ml/min). Detekce probíhala při $\lambda = 254$ nm. Po preparativním HPLC byla provedena lyofilizace modelového peptidu 1. Při pokusech o odštěpení modelového peptidu 2 z pevné fáze byl získáván tento peptid již s ochráněnými postranními řetězci aminokyselin, a proto následující experimenty byly prováděny pouze s modelovým peptidem 1.

Kontrola čistoty a identity peptidů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie kombinované s vysokoúčinnou kapalinová chromatografie (HPLC/MS): přístroj Agilent 6530 Q-TOF LC/MS, gradientová eluce (voda – ACN od 95:5 do 0:100 v průběhu 13 min, průtok = 0.4 ml/min). Detekce probíhala při $\lambda = 254$ nm.

4.3.2. Testování mírných metod pro ochránění funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin

4.3.2.1. Odchránění modelového peptidu 1 v prostředí pufrů o různém pH

Lyofilizát modelového peptidu 1 o hmotnosti 5 mg byl rozpuštěn ve 400 μ l ACN (dále označen jako „zásobní roztok peptidu 1 v ACN“). Pro testování byly připraveny pufrы o různém pH, jejichž složení je uvedeno v *Tab. 4.2* (str. 33). Od každého z pufrů bylo pipetováno 45 μ l do plastové mikrozkuavky a k tomu bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku peptidu 1 v ACN. Každý vzorek byl připraven třikrát. Jeden byl ponechán při laboratorní teplotě. Druhý byl inkubován při 95 °C po dobu 20 min (cit.⁵³). Třetí inkubován při 70 °C po dobu 16 h (cit.¹⁰). Následně bylo ke vzorkům přidáno 150 μ l ACN a byla provedena HPLC/MS analýza.

Tabulka 4.2 – Složení pufrů používaných pro testování odchránění modelového peptidu

Název pufru	Složení
Acetátový pH=5	30 mM octová kyselina, 200 mM chlorid hořečnatý, dotitrováno do daného pH 1 M hydroxidem sodým
Acetátový pH=4	
Acetátový pH=3	
Glycin-HCl pH=2,2 s MgCl ₂	50 mM glycin, 200 mM chlorid hořečnatý, titrován do daného pH roztokem 3,5% HCl (v/v)
Glycin-HCl pH=2,2 bez MgCl ₂	50 mM glycin, titrován do daného pH roztokem 3,5% HCl (v/v)
KCl-HCl pH=1,0	100 mM chlorid draselný, titrován do daného pH roztokem 3,5% (v/v) HCl

4.3.2.2. Vliv mírných podmínek odchránění modelového peptidu 1 na degradaci DNA

Pro studium vlivu mírných podmínek odchránění na degradaci DNA byly zvoleny podmínky acetátového pufru (pH= 3). Modelový plasmid byl ředěn acetátovým puftrem (11,7 μl) na koncentraci 100 nM. Inkubace byla provedena při 70 °C po dobu 16 h. Po inkubaci byl z reakční směsi odebrán vzorek o objemu 0,5 μl a byla provedena amplifikace DNA pomocí PCR 2 (primery PCR test „forward“, PCR test „reverse“), jejíž průběh je uveden v následující kapitole 4.3.3.

4.3.3. Polymerasová řetězová reakce

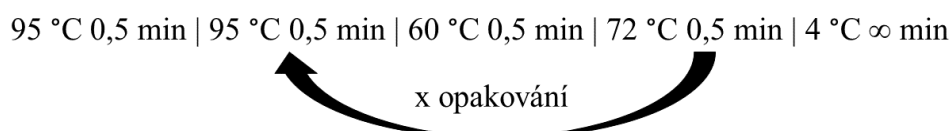
Pro amplifikaci DNA v různých experimentech byla využita metoda PCR. Při potřebě amplifikace DNA byly prováděny dva typy metody PCR, které byly označeny PCR 1 a PCR 2. Použité podmínky jsou shrnuty v *Tab. 4.3* a *Tab. 4.4* (str. 34). Schéma využitého tepelného programu pro oba typy metody PCR je znázorněno na *Obr. 4.2* (str. 34).

Tabulka 4.3 – Složení reakční směsi pro metodu PCR 1

Reakční složka	Objem (μl)
Forward primer (5 μM)	2,5
Reverse primer (5 μM)	2,5
dATP nebo 7-deaza dATP (10μM)	2
dGTP nebo 7-deaza dGTP (10μM)	2
dTTP (10μM)	2
dCTP (10μM)	2
Key pufr 10×	5
sterilní deionizovaná voda	30
Taq DNA polymerasa (5 U/μl)	1
DNA templát	1
Celkem: 50 μl	

Tabulka 4.4 – Složení reakční směsi pro metodu PCR 2

Reakční složka	Objem (μl)
DNA templát	1
Forward primer (5 μM)	2,5
Reverse primer (5 μM)	2,5
sterilní deionizovaná voda	19
Red Taq DNA polymerasa 2× MasterMix	25
Celkem: 50 μl	



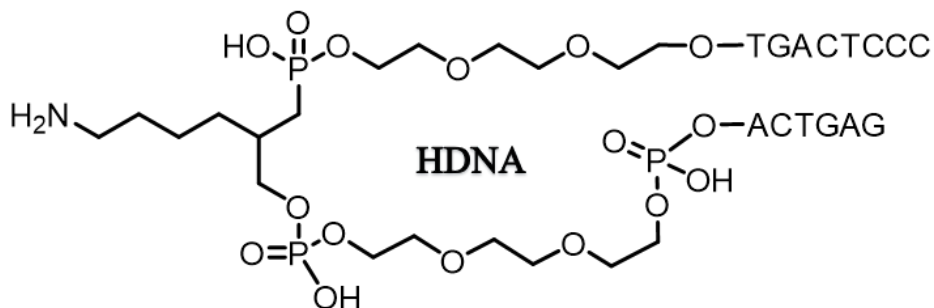
Obrázek 4.2 – Obecné schéma uspořádání PCR. Tento program byl využíván v průběhu práce, akorát s jiným počtem opakování

4.3.4. Porovnání stability DNA s 7-deaza purinovými nukleotidy nebo standardními purinovými nukleotidy při klasických podmínkách odchránění peptidu

PCR produkty získané amplifikací modelového plasmidu (dle kapitoly 4.3.3) pomocí PCR 1 s 7-deaza purinovými nukleotidy a PCR produkty s standardními purinovými nukleotidy byly inkubovány v prostředí klasických podmínek odchránění postranních řetězců peptidu. Z reakční směsi po PCR 1 byly odebrány 4 μl a smíchány s 16 μl čerstvě připraveného roztoku 5% (w/v) fenol v TFA, v plastové mikrozkušavce. Inkubace probíhala za laboratorní teploty po dobu 10 min. Následně byla reakční směs odpařována při 30 °C po dobu 45 min. Amplifikace DNA byla provedena pomocí PCR 2 s 24 cykly (primery PCR test „forward“, PCR test „reverse“).

4.3.5. Syntéza konstruktů 1a

Jako výchozí stavební blok pro syntézu konstruktů **1a** byla využita molekula HDNA („headpiece“ DNA), jejíž struktura je uvedena na *Obr. 4.3*.



Obrázek 4.3 – Struktura molekuly „headpiece“ DNA (HDNA)¹⁰, která slouží jako výchozí bod pro syntézu DNA kódované knihovny. V levé části je reaktivní primární aminová funkční skupina pro navázání DNA kódované molekuly – peptidu. Pravá část slouží pro výstavbu DNA značek ligační reakcí.

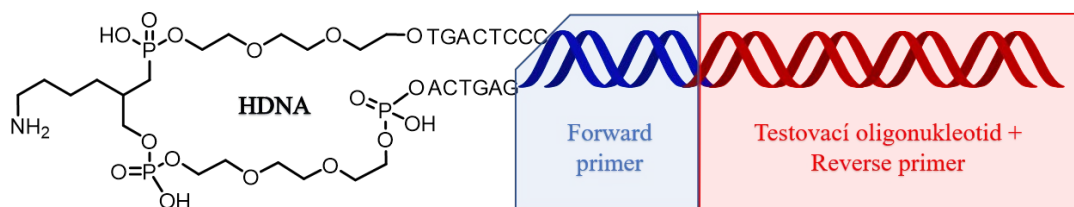
Dvouvláknové DNA oligonukleotidy pro ligační reakci s HDNA byly získány hybridizací komerčních, navzájem komplementárních, jednovláknových oligonukleotidů. Roztoky oligonukleotidů (100 μM) byly podrobeny tepelnému programu (95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 90 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 85 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 80 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 75 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s).

Ligace oligonukleotidu na HDNA probíhala dle podmínek⁸ shrnutých v *Tab 4.5*. Reakční směs byla inkubována při 16 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 16 h. Deaktivace T4 DNA ligasy probíhala při 65 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min. Reakční směs byla doplněna sterilní deionizovanou vodou na objem 50 μl a byla purifikována pomocí Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit⁵⁴, návod – „oligonucleotide cleanup“ (purifikace meziprojektu **2**) nebo návod 5 : 1 (purifikace meziprojektu **3**).

Tabulka 4.5 – Podmínky ligace oligonukleotidů na HDNA

Reakční složka	Objem (μl)
HDNA (83 μM)	1
Hybridizovaný oligonukleotid (100 μM)	3,5
Ligační pufr 10 \times	2
FS DI H ₂ O	12,5
T4 DNA ligasa (400 U/ml)	1
Celkem: 20 μl	

Výše popsaným způsobem byl na molekulu HDNA připojen oligonukleotid „forward primer“, čímž vznikl meziprodukt **2**, a následně oligonukleotid „testovací oligonukleotid + reverse primer“, čímž vznikl meziproduktu **3** uvedený na *Obr. 4.4*.



Obrázek 4.4 – Struktura meziproduktu **3**. Meziprodukt byl připravený pro následnou reakci s aminokyselinou, která se váže na volnou aminoskupinu.

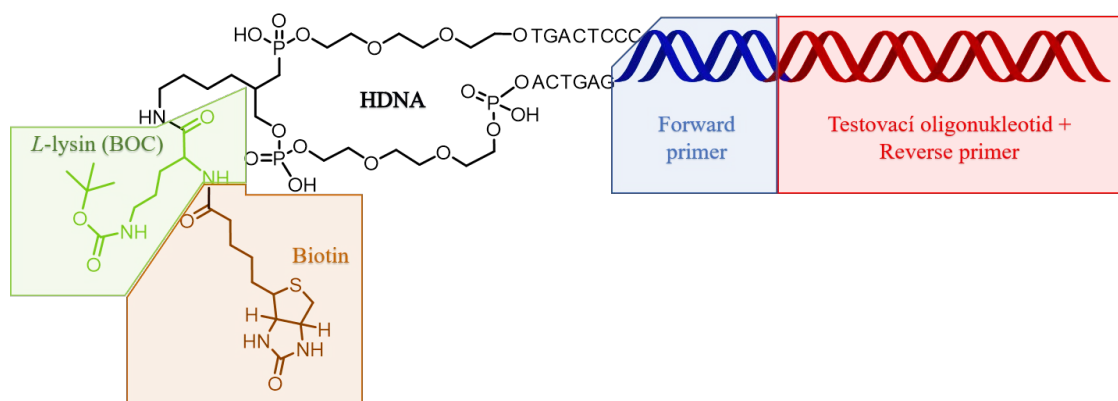
Volná aminoskupina meziproduktu **3** nebo meziproduktu **5** byla využita pro výstavbu peptidové části. Podmínky reakcí⁸ pro navázání aminokyseliny nebo biotinu jsou shrnuty v *Tab. 4.6*. Reakční směs byla inkubována při 4 °C po dobu 18 h. Purifikace byla provedena pomocí Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (návod – 5 : 1, eluce 20 µl sterilní deionizované vody).

Tabulka 4.6 – Složení reakční směsi pro vazbu Fmoc-*L*-lysinu (BOC) nebo biotinu

Reakční složka	Objem (µl)
Meziprodukt 3 nebo 5	6
Borátový pufr (kyselina boritá 150 mM, pH=9,5)	12,5
Fmoc- <i>L</i> -lysin (BOC) nebo biotin (150 mM, DMF)	3,2
DMT – MM (250 mM, H ₂ O)	1,9
Celkem: 23,6 µl	

Odštěpení Fmoc skupiny z navázaného Fmoc-*L*-lysinu před vazbou biotinu bylo provedeno dle následujícího postupu. Ve zkumavce byl smíchán výsledný meziprodukt **4** s 10% (v/v) roztokem piperidinu ve sterilní deionizované vodě v objemovém poměru 1 : 4 (meziprodukt **4** : roztok piperidinu). Reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 4 h. Neutralizace reakční směsi byla provedena přidáním acetátového pufru (3 M octan sodný, pH=5,2) v objemovém poměru 1 : 1,5 (reakční směs : acetátový pufr). Purifikace byla provedena pomocí Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (návod – 5 : 1, eluce – 6 µl)

Sekvenčí reakce meziproduktu **3** s Fmoc-*L*-lysin (BOC), ochráněním Fmoc skupiny z Fmoc-*L*-lysinu (BOC) a následné reakce s biotinem byl získán konstrukt **1a** (*Obr. 4.5*, str. 37).



Obrázek 4.5 – Schéma syntetizovaného konstrukt **1a** jako modelového zástupce DNA kódované knihovny peptidů. Jádrem je molekula HDNA, na jejíž oligonukleotidové části probíhá výstavba DNA značky. Na volnou aminovou skupinu je vázán aminokyselina *L*-lysin s chráněným postranním řetězcem, na níž je vázán biotin.

4.3.6. Zavedení 7-deaza purinových nukleotidů do kódující DNA konstrukt **1a** a odchránění postranního řetězce lysinu

Jedno vlákno DNA konstrukt **1a** bylo štěpeno pomocí tzv. „nicking“ endonukleasy Nt.BbvCI. Podmínky této reakce jsou shrnuty v *Tab. 4.7*. Reakční směs byla inkubována při 37 °C po dobu 60 minut. Enzym byl deaktivován při 80 °C po dobu 20 minut. Purifikace byla provedena pomocí Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit, návod – 5 : 1.

Tabulka 4.7 – Složení reakční směsi pro štěpení DNA pomocí „nicking“ endonukleasy

Reakční složka	Objem (μl)
Konstrukt 1a (7 ng/μl)	6
CutSMART pufr 10×	2,5
DI FS H ₂ O	16
Endonukleasa Nt.BbvCI (10 U/ml)	0,5
Celkem: 25 μl	

Tento meziprodukt byl podroben tzv. „nick translation“ pomocí amplifikace za podmínek PCR 1 (jedno kolo, bez použití primerů) se 7-deaza purinovými nukleotidy, s tím rozdílem, že elongační část tepelného cyklu byla prodloužena na dobu 5 min. Následně byla provedena purifikace pomocí Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit, návodu 5 : 1. Takto byl získán konstrukt **1** se začleněnými 7-deaza purinovými nukleotidy, který byl označen jako konstrukt **1b**.

Následně byl konstrukt **1b** inkubován s odchraňovací směsí (5% (w/v) fenol v TFA) v objemovém poměru 19 : 1 (odchraňovací směs : konstrukt **1b**). Inkubace probíhala za laboratorní teploty po dobu 10 min. Reakční směs byla odpařována pomocí centrivapu při 30 °C po dobu 45 min. Produkt reakce byl rozpuštěn v DMSO (5 µl) a inkubován při 60 °C po dobu 25 min. Dále bylo přidáno 45 µl sterilní deionizované vody a produkt byl purifikován pomocí Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (návod „oligonucleotide cleanup“). Eluce byla provedena 6 µl sterilní deionizované vody, což přibližně odpovídalo 1 µl původního konstruktu **1b** před inkubací s odchraňovací směsí. Odchráněním postranního řetězce lysinu konstruktu **1b** byl získán konstrukt **1c**.

4.3.7. Magnetická separace na streptavidinových magnetických kuličkách

Pro magnetickou separaci konstruktu **1c** byly využity streptavidinové magnetické kuličky Dynabeads M-270, Invitrogen. Složení používaných pufrů je uvedeno v *Tab. 4.8*. Všechny pufrы byly sterilizovány pomocí stříkačkového filtru (0,2 µm).

Tabulka 4.8 – Složení pufrů použitých při magnetické separaci konstruktu **1c**

Pufr	Složení
B & W 2×	10 mM Tris – HCl (pH = 7,5) 1 mM EDTA 2 mM NaCl
B & W 1×	5 mM Tris – HCl (pH = 7,5) 500 µM EDTA 1 mM NaCl
B & W 1× s Tween	5 mM Tris – HCl (pH = 7,5) 500 µM EDTA 1 mM NaCl 0,02 % (v/v) Tween 20
B & W 1× bez EDTA	5 mM Tris – HCl (pH = 7,5) 1 mM NaCl

Nejprve byla suspenze (5 µl) magnetických kuliček (10 mg/ml, kapacita \geq 950 pmol biotin/mg kuliček) čtyřikrát promyta pufrem B & W 1× s Tween (500 µl). Separace byla prováděna na stojánku s magnetem. K takto promytým magnetickým kuličkám bylo přidáno 10 µl pufru B & W 2× a 10 µl konstruktu **1c** (6 µl konstrukt **1c** + 4 µl sterilní deionizovaná voda). Suspenze byla inkubována za laboratorní teploty po dobu 30 min a za stálého míchání. Poté byl magneticky separovány kuličky od supernatantu. Ty byly dále promyty postupně pufrem B & W 1× (50 µl), B & W 1× s Tween (50 µl), B & W 1× (50 µl), B & W 1× s Tween (500 µl) a B & W 1× bez EDTA (50 µl).

Supernatant byl purifikován pomocí Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit – „oligonucleotide cleanup“ návod a eluován do 23 µl sterilní deionizované vody. Purifikovaný supernatant a promytá suspenze magnetických kuliček byly podrobeny PCR 2 (specifické primery: testovací oligonukleotid „forward“ a testovací oligonukleotid „reverse“) k amplifikaci DNA značky.

4.3.8. Štěpení konstruktů 1c pomocí trypsinu

Konstrukt 1c (1 ng/µl) byl inkubován v reakční směsi s trypsinem, jejíž složení je uvedeno v Tab.4.9. Jako kontrola byla připravena stejná reakční směs s tepelně denaturovaným trypsinem (denaturace: 100 °C, 1 h). Reakční směsi byly inkubovány při 37 °C po dobu 21 h. Po inkubaci byl přidán 1 µl roztoku PMSF (10 mM v ethanolu) a následovala inkubace při 4 °C po dobu 18 h. . Následovala inkubace reakční směsi se streptavidinovými magnetickými kuličkami s magnetickou separací, způsobem popsaným v kapitole 4.3.7.

Tabulka 4.9 – Reakční směs pro štěpení konstruktů 1c trypsinem

Reakční složka	Objem (µl)
Konstrukt 1c (1 ng/µl)	6
CaCl ₂ (200 mM)	1
Tris-HCl (500 mM, pH=8)	1
Sterilní deionizovaná voda	1
Trypsin (1 mg/ml, v 20 mM CaCl ₂ , 50 mM Tris-HCl)	1
	Celkem: 10 µl

4.3.9. Agarosová gelová elektroforéza

Elektroforéza byla prováděna v 3% agarosového gelu v 0,5× TBE pufru (50 ml) s 5 µl 10 000× GelRed. Byly při ní použity komerční délkové standardy. Bezbarvé vzorky byly nanášeny v aplikačním pufru v objemovém poměru 1 : 5 (nanášecí pufr : vzorek). Pro případnou kvantifikaci DNA byl použit 1,1 kb standard o koncentraci DNA 20 ng/µl. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V po dobu 15 až 16 minut. Vizualizace gelů byla provedena pomocí UV transiluminátoru. Případná kvantifikace signálů na obrázku vizualizovaného gelu byla provedena pomocí software ImageJ.

5. Výsledky

Hlavním cílem této práce bylo prověření možností chemické syntézy DNA kódovaných peptidů a jejich aplikace. Hlavní překážkou při syntéze DNA kódovaných peptidů je nutnost kyselého odchránění postranních řetězců na závěr syntézy peptidu. Tyto podmínky vedou k degradaci DNA značky. V této práci byly testovány mírné podmínky pro odchránění peptidu, které by mohly být kompatibilní s molekulou DNA. Další testovanou strategií byla stabilizace DNA vůči silně kyselým podmínkám použitím 7-deaza purinových nukleotidů.

5.1. Testování mírných metod pro odchránění funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin

Pro testování mírných metod odchránění postranních řetězců aminokyselin byl chráněný modelový peptid 1 inkubován při podmínkách různých pufrů (*Tab 4.2*, str. 33). Úroveň odchránění postranních řetězců byla sledována pomocí HPLC/MS analýzy. Jak je patrné z *Tab. 5.1* (str. 41) byly nalezeny efektivní podmínky pro štěpení chránících skupin Boc (ϵ -aminoskupina Lys) a *t*-Bu (hydroxylová skupina Tyr). Struktury štěpených chránících skupin jsou zobrazeny na *Obr. 5.1*. Chránící skupiny Trt a Pbf byly rezistentní i vůči poměrně agresivním podmínkám v pufru při pH=1 a 95 °C.



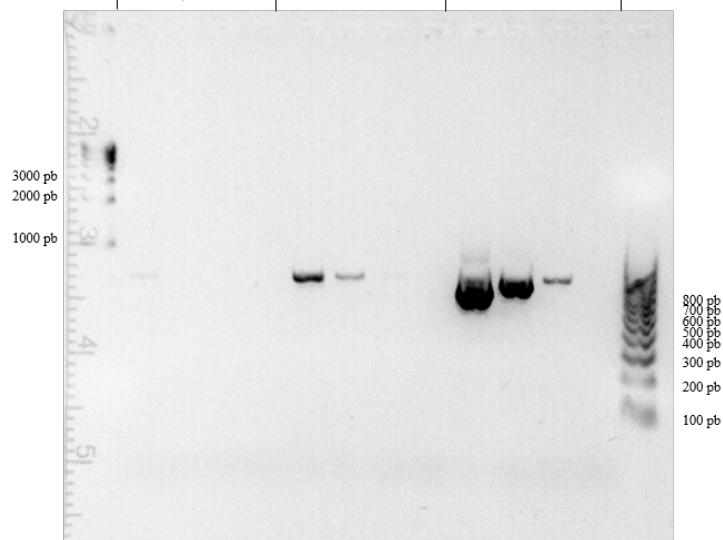
Obrázek 5.1 – Struktury chránících skupin, které byly odštěpeny pomocí mírných podmínek odchránění

Tabulka 5.1 – Výsledky kvalitativního stanovení ochrání postranního řetězce modelového peptidu 1 v mírných podmínkách ochrání v pufrech uvedených v *Tab. 4.2* (str. 33). Ve sloupci „ochrání“ je kvalitativně zhodnoceno, zda došlo ke štěpení chrání skupiny (+) či nikoliv (-)

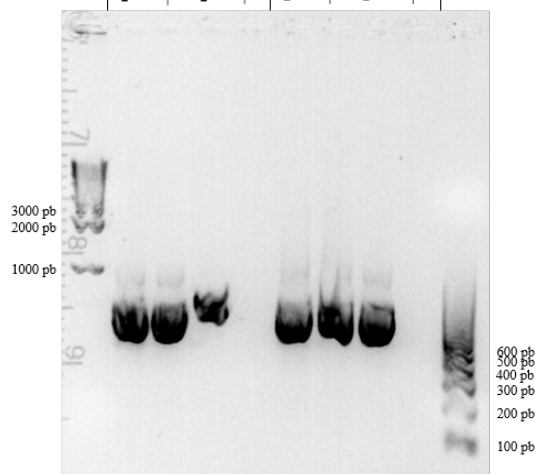
Název pufru (experimentální podmínky)	Typ chrání skupiny	Odstěpení
Acetátový pH=5 (95 °C, 20 min)	<i>t</i> -Bu	-
	BOC	-
	Trt	-
	Pbf	-
Acetátový pH=4 (95 °C, 20 min)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
Acetátový pH=3 (95 °C, 20 min)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
Acetátový pH=5 (70 °C, 16 h)	<i>t</i> -Bu	-
	BOC	-
	Trt	-
	Pbf	-
Acetátový pH=4 (70 °C, 16 h)	<i>t</i> -Bu	-
	BOC	-
	Trt	-
	Pbf	-
Acetátový pH=3 (70 °C, 16 h)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
Glycin-HCl pH=2,2 s MgCl ₂ (95 °C, 20 min)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
Glycin-HCl pH=2,2 bez MgCl ₂ (95 °C, 20 min)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
Glycin-HCl pH=2,2 s MgCl ₂ (70 °C, 16 h)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
Glycin-HCl pH=2,2 bez MgCl ₂ (70 °C, 16 h)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
KCl-HCl pH=1,0 (95 °C, 20 min)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-
KCl-HCl pH=1,0 (lab. teplota, 1 h)	<i>t</i> -Bu	+
	BOC	+
	Trt	-
	Pbf	-

Podmínky nejvyšší hodnoty pH, při kterých docházelo k efektivnímu odstranění BOC a *t*-Bu chránících skupin byly testovány na kompatibilitu s DNA. Modelový plasmid byl inkubován v daných podmínkách a následně proběhla amplifikace (PCR 2, specifické primery: PCR test „forward“, PCR test „reverse“) s počtem cyklů uvedeným v popisku vizualizace agarosového gelu na *Obr. 5.2*.

Číslo jamky:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Počet kol PCR:		5				10				15				
pH=3		-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
70 °C		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	



Číslo jamky:	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Počet kol PCR:		20				25				
pH=3		-	-	+	+	-	-	+	+	
70 °C		-	+	-	+	-	+	-	+	

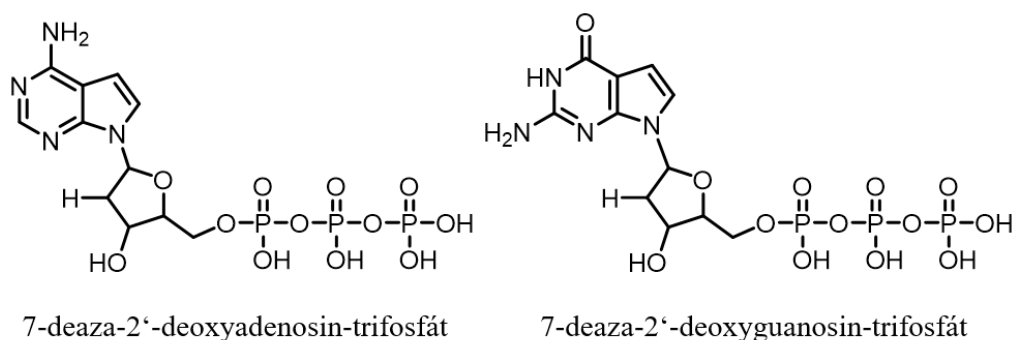


Obrázek 5.2 – Vizualizace agarosového gelu – inkubace modelového plasmidu s acetátovým pufrům (pH = 3) nebo vodou při různých teplotách a jeho následná amplifikace. V každé jamce byly naneseny 3 μ l vzorku. Dráhy **1, 14, 15, 24** délkový standard; dráhy **2, 3, 4, 5** vzorky po 5. cyklu amplifikace; dráhy **6, 7, 8, 9** vzorky po 10. cyklu amplifikace; dráhy **10,11,12,13** vzorky po 15. cyklu amplifikace; dráhy **16, 17, 18, 19** vzorky po 20. cyklu amplifikace; dráhy **20, 21, 22, 23** – vzorky po 25. cyklu amplifikace

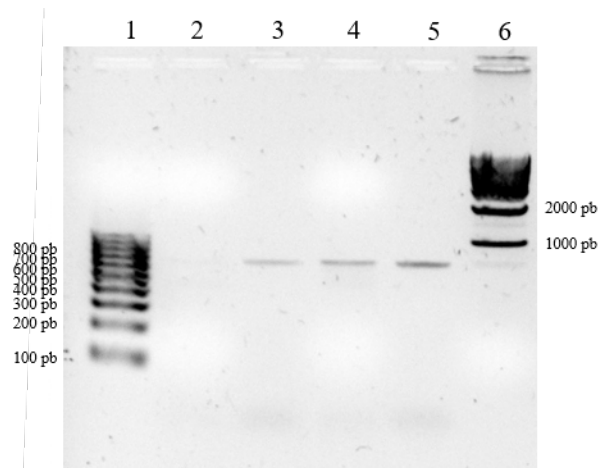
Z výsledků těchto experimentů je zřejmé, že odstranění chránících skupin na modelovém peptidu 1 pomocí mírnějších podmínek bylo úspěšné pouze pro chránící skupiny Boc a *t*-Bu. Skupiny Trt a Pbf byly rezistentní vůči testovaným podmínkám. Zároveň, jak lze usoudit z *Obr. 5.2* (str. 42), byly podmínky stále moc agresivní vůči DNA, protože po inkubaci v těchto podmínkách nedošlo k amplifikaci ani při 25. kole PCR. Z výše uvedených důvodů bylo přistoupeno k nové strategii přípravy DNA kódovaných peptidů, při níž je možné zachovat amplifikovatelnou DNA i při odchránění peptidu pomocí klasických, silně kyselých podmínek.

5.2. Porovnání stability DNA se standardními nukleotidy a DNA s 7-deaza purinovými nukleotidy při klasických podmínkách odchránění

Pro tento experiment byla využita DNA, která byla amplifikována z modelového plasmidu se specifickými primery – PCR test „forward“, PCR test „reverse“. K tomu byla využita PCR 1 reakce (25 cyklů) modelového plasmidu, ve které jsou využity buď standardní nebo 7-deaza purinové nukleotidtrifosfáty, jejichž struktura je na *Obr. 5.3*. Jelikož DNA se 7-deaza purinovými nukleotidy je obtížně barvitelná interkalačními barvivy, tak pro potvrzení syntézy DNA byly vzorky z předchozí reakce (PCR 1) použity v reakční směsi následné reakce PCR 2 (7 kol, stejné primery), v níž byly obsaženy standardní purinové nukleotidy. Vizualizace agarosového gelu je uvedena na *Obr. 5.4* (str. 44).



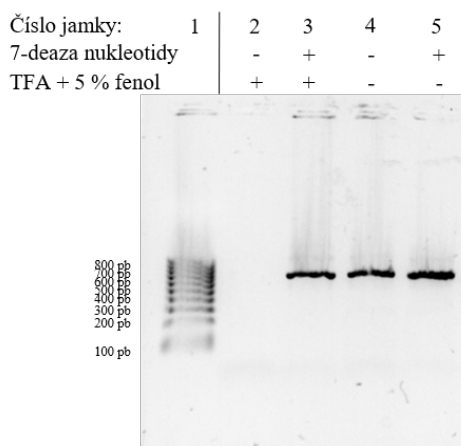
Obrázek 5.3 – Struktura 7-deaza purinových deoxynukleotidtrifosfátů. Tyto deriváty purinových nukleotidů mohou být využity při přípravě DNA kódovaných peptidů pro zajištění stability DNA v kyselých podmínkách odchránění peptidů.



Obrázek 5.4 – Vizualizace agarosového gelu – porovnání barvitelnosti PCR produktů se 7-deaza purinovými nukleotidy a standardními nukleotidy. Naneseny 4 μ l vzorku, délkový standard 3 μ l. Dráhy **1**, **6** – délkový standard; dráha **2** reakční směs (PCR 1) se 7-deaza purinovými nukleotidy; dráha **3** amplifikace (PCR 2) vzorku reakční směsi PCR 1 se 7-deaza purinovými nukleotidy; dráha **4** PCR 1 reakční směs se standardními nukleotidy; dráha **5** amplifikace (PCR 2) vzorku reakční směsi PCR 1 se standardními nukleotidy

Jak je patrné na *Obr. 5.4* v dráze **2** produkt PCR 1 reakce se 7-deaza purinovými nukleotidy neobsahuje příslušný pás na rozdíl od dráhy **4** (PCR 1 se standardními nukleotidy). Amplifikace DNA z obou vzorků pomocí PCR 2 se standardními nukleotidy jsou na *Obr. 5.4* v dráhách **3** a **5**. Obě dráhy obsahují příslušné pásy s podobnou intenzitou. Tento experiment prokázal možnost amplifikace DNA se 7-deaza purinovými nukleotidy a taktéž špatnou barvitelnost těchto DNA produktů interkalačními barvivy.

Produkty reakce PCR 1 se standardními nebo 7-deaza purinovými nukleotidy (vizualizovány na agarosovém gelu na *Obr. 5.4*, dráhy **2** a **4**) byly použity pro testování stability v silně kyselých podmínkách používaných pro odchránění peptidů při chemické syntéze. DNA byla inkubována se směsí 5% (w/v) fenol v TFA nebo vodou a po odpaření byla DNA amplifikována za podmínek PCR 2 s 24 koly. Vizualizovaný gel po experimentu je uveden na *Obr. 5.5* (str. 45).

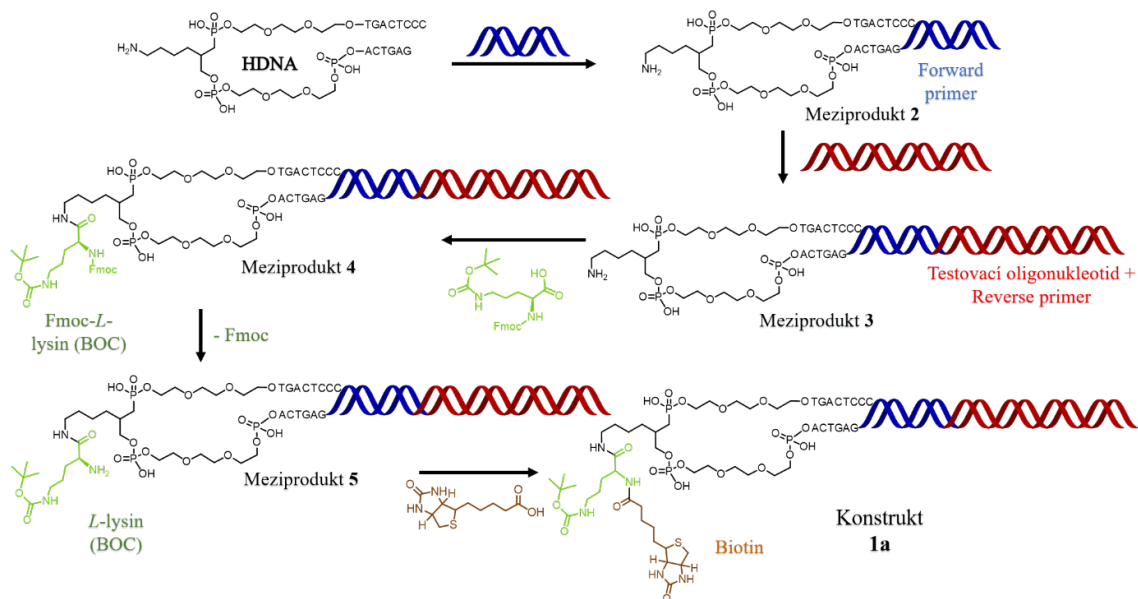


Obrázek 5.5 – Vizualizace agarosového gelu – porovnání stability PCR produktů se 7-deaza nebo se standardními purinovými nukleotidy po inkubaci se směsí 5% (w/v) fenol v TFA nebo se sterilní deionizovanou vodou. V jamkách bylo naneseno 3 μ l vzorku nebo délkového standardu. Dráha **1** – délkový standard; dráha **2** DNA se standardními nukleotidy po inkubaci se směsí 5% (w/v) fenol v TFA; dráha **3** DNA se 7-deaza purinovými nukleotidy po inkubaci se směsí 5% (w/v) fenol v TFA; dráha **4** DNA se standardními nukleotidy po inkubaci se sterilní deionizovanou vodou, dráha **5** DNA se 7-deaza purinovými nukleotidy po inkubaci se sterilní deionizovanou vodou

Jak je patrné z *Obr. 5.5* u DNA se standardními purinovými nukleotidy (dráha **2**) došlo vlivem směsi 5% (w/v) fenol v TFA ke kompletní degradaci. Naopak u DNA se 7-deaza purinovými nukleotidy došlo pouze k minimálnímu poškození vlivem kyselých podmínek. Tento experiment jasně potvrdil možnost využití DNA kódu se začleněnými 7-deaza purinovými nukleotidy při chemické syntéze peptidů a jeho stability při následných klasických podmínkách ochrání.

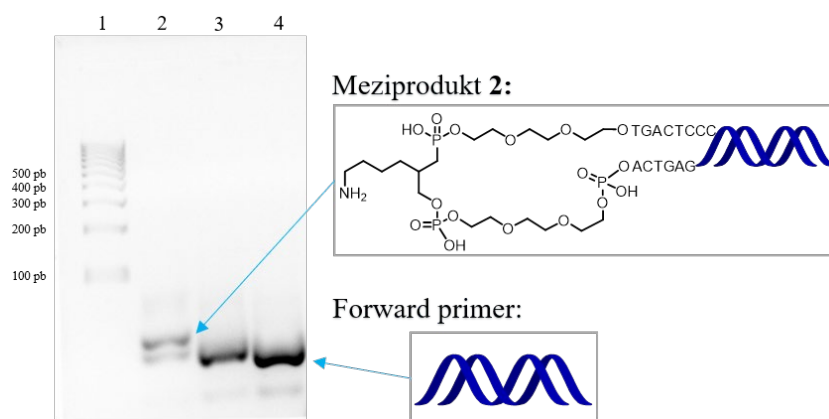
5.3. Syntéza konstruktů **1a**

Konstrukt **1** má sloužit jako modelový zástupce DNA kódované knihovny peptidů, pro optimalizaci její syntézy. Kontrola kompatibility jednotlivých kroků syntézy s DNA byla prováděna amplifikací DNA značky (PCR 2) s následnou agarosovou elektroforézou. K PCR 2 byly používány specifické primery komplementární k sekvenci testovacího oligonukleotidu (Testovací oligonukleotid „forward“; Testovací oligonukleotid „reverse“). Schéma syntézy je na *Obr. 5.6* (str.46).



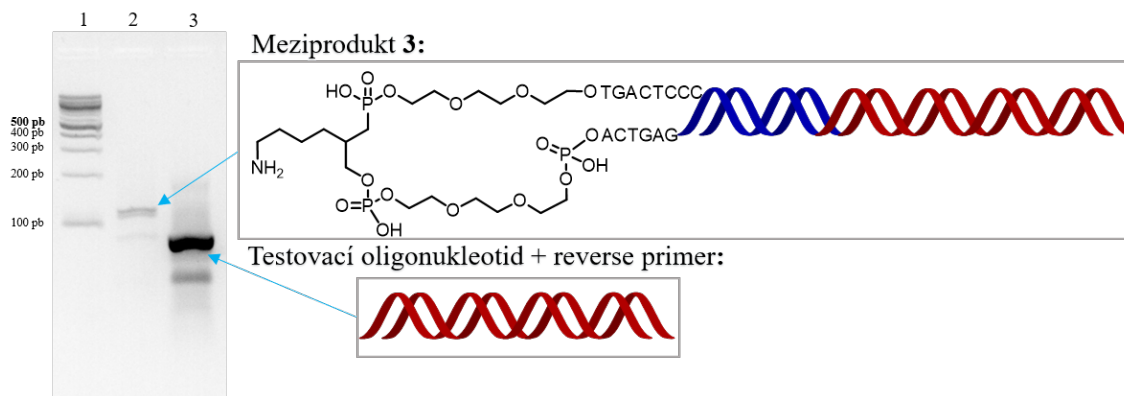
Obrázek 5.6 – Schéma syntézy konstruktů **1a** s pojmenováním všech meziproduktů

Po ligaci forward primeru byla provedena agarosová gelová elektroforéza (*Obr. 5.7*). Je vidět nárůst délky DNA značky, který odpovídá úspěšné ligaci „forward“ primeru. Purifikační krok nedokázal dostatečně oddělit nezreagovaný „forward“ primer od meziproduktu **2**, a proto je pozorován v dráze **2** pozorován druhý signál. Pro srovnání nárůstu délky DNA značky byl v dráze **4** nanesen vzorek forward primeru.



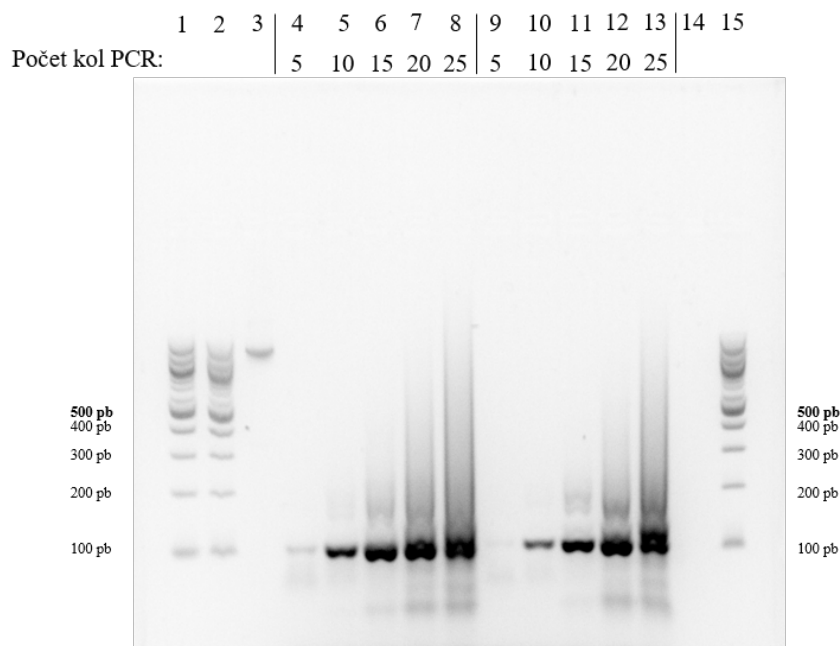
Obrázek 5.7 – Vizualizace agarosového gelu – kontrola ligace forward primeru. V jamkách naneseno 4 μ l délkového standardu, 5 μ l vzorku. Dráha: **1** délkový standard; dráha **2** meziprodukt **2**; dráha **3** meziprodukt **2** ve směsi s forward primer v objemovém poměru 1 : 1; dráha **4** forward primer

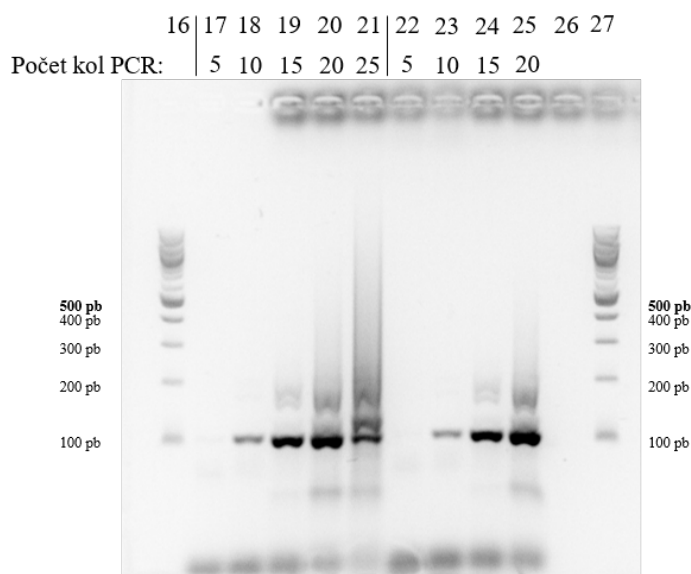
Kontrola následné ligace testovacího oligonukleotidu + reverse primeru probíhala analogicky. Výsledný vizualizace gelu je na *Obr. 5.8* (str. 47). Znatelný nárůst délky DNA v dráze **2** v porovnání s dráhou **3** je důkazem úspěšné ligace.



Obrázek 5.8 – Vizualizace agarosového gelu – kontrola ligace testovacího oligonukleotidu + reverse primeru. V jamkách naneseno 4 μ l délkového standardu, 5 μ l vzorku. Dráha 1 délkový standard; dráha 2 meziprodukt 3; dráha 3 Testovací oligonukleotid + reverse primer

Po kompletní syntéze konstruktů **1a** byla provedena závěrečná amplifikace DNA značky (PCR 2) meziproduktů. Vizualizace vzorků na gelu (*Obr. 5.9*, str. 48) dokazuje kompatibilitu všech kroků, včetně syntézy peptidu, s amplifikovatelností DNA. Schémata a pojmenování veškerých meziproduktů byly uvedeny na *Obr. 5.6* (str. 46)





Obrázek 5.9 – Vizualizace agarosového gelu –amplifikace DNA značky (PCR 2) meziproduktů (Obr. 5.6, str. 46) při syntéze konstruktů **1a**. V jamkách byly naneseny 3 μ l délkových standardů, 4 μ l vzorků. Dráhy **1, 2, 15, 16, 27**: délkový standard; dráha **3**: 1,1 kb standard pro kvantifikaci (naneseno 2,5 μ l = 50 ng); dráhy **4 – 8**: meziprodukt **3**; **9 – 13**: meziprodukt **4**; **17 – 21**: meziprodukt **5**; **22 – 25**: konstrukt **1a**; **14, 26**: prázdné jamky

Strukturální analýza konstruktů **1a** byla provedena Kateřinou Novákovou (Vědecko-servisní skupina Josefa Cvačky, ÚOCHB AV ČR) pomocí MALDI hmotnostní spektrometrie (Bruker Daltonics – UltrafleXtreme™ MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometr). I když byl vzorek konstruktů **1a** po syntéze zakoncentrován na desetinový objem, tak stále byla koncentrace natolik nízká, že ve spektrogramu nebyl pozorován signál dokazující správnou molekulovou hmotnost konstruktů **1a**. Analogické vzorky z laboratoře školitele byly analyzovány úspěšně a byla tak prokázána vazba aminokyselin a biotinu na konstrukt. Zároveň byla kontrola navázání aminokyseliny a biotinu na konstrukt **1** nepřímo provedena funkčním experimentem při separaci na streptavidinových magnetických kuličkách (oddíl 5.5, str. 52).

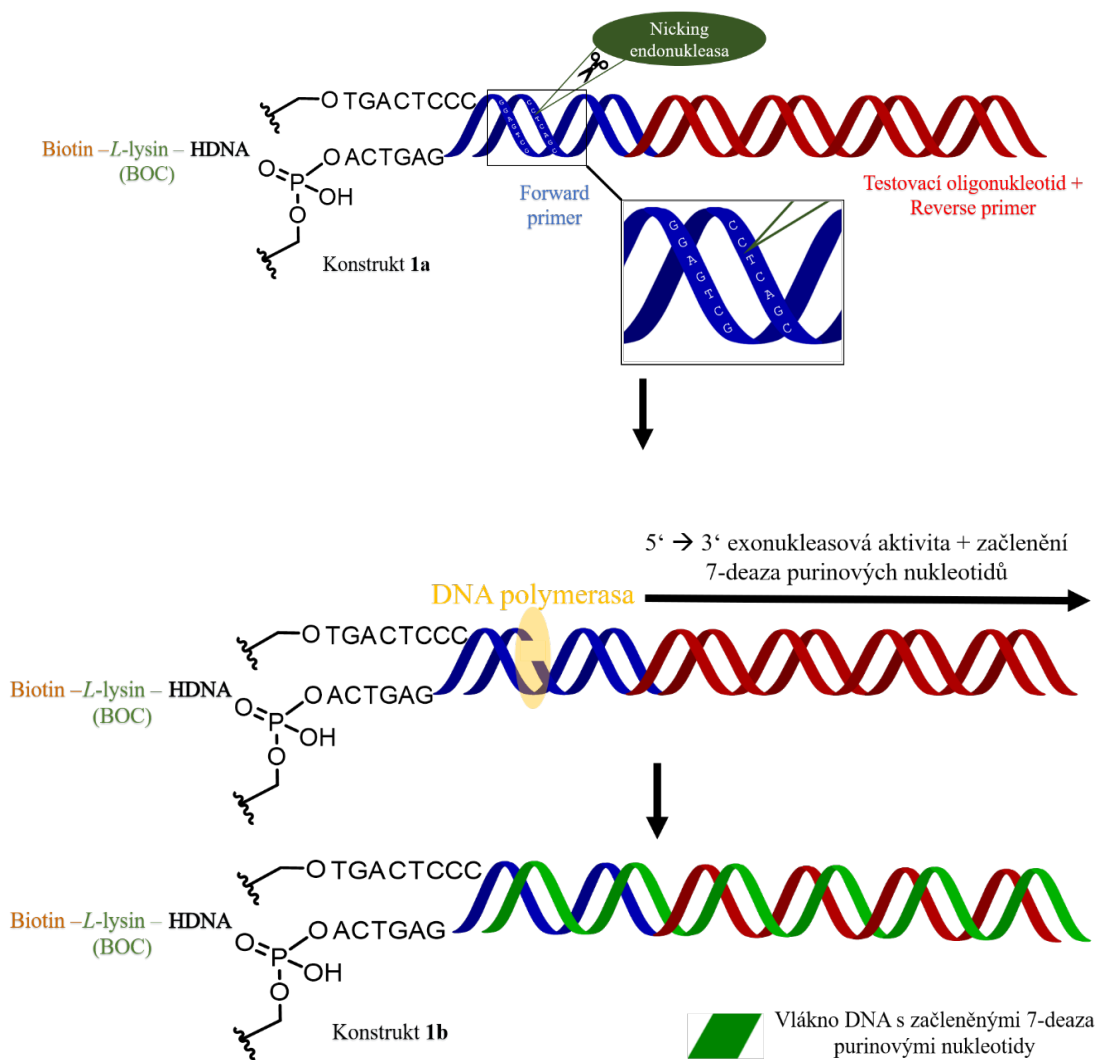
5.4. Začlenění 7-deaza purinových nukleotidů do kódující DNA a ochrání postranního řetězce lysinu

Před vlastním ochráněním postranních řetězců aminokyselin u DNA kódovaných peptidů musí být provedena stabilizace DNA značky proti silně kyselým podmínkám klasického ochránění (5% (w/v) fenol v TFA), což je provedeno začleněním 7-deaza purinových nukleotidů do DNA značky konstruktů **1a**, čímž dojde ke vytvoření konstruktů **1b**. Modifikováno je jedno vlákno DNA konstruktů **1a** tak, že je nejprve vytvořen jednořetězcový zlom (nick). Vytvoření tohoto zlomu katalyzuje enzym řadící se

mezi endonukleasy, „nicking“ endonukleasa⁵⁵. Tyto enzymy rozpoznávají specifickou sekvenci (*Obr. 5.10*) na dvouřetězcovém vlákně DNA, ale štěpí pouze na jednom vlákně. Schématicky je začlenění 7-deaza purinových nukleotidů do kódující DNA znázorněno na *Obr. 5.11*.



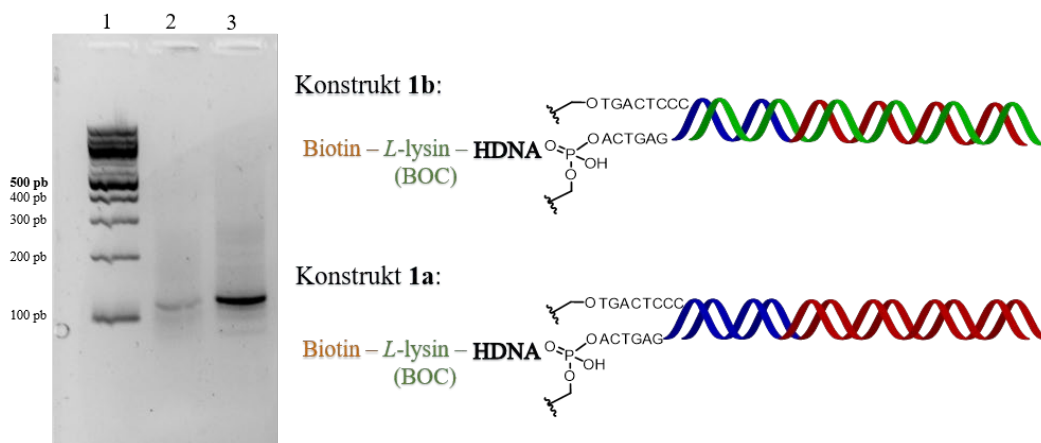
Obrázek 5.10 – Sekvence DNA, kterou rozpoznává „nicking“ endonukleasa Nt.BbvCI, která štěpí fosfodiesterovou vazbu mezi nukleotidy jednoho z vláken⁵⁵.



Obrázek 5.11 – Schéma syntézy konstruktů **1b**. Nejprve je štěpena fosfodiesterová vazba mezi nukleotidy ve specifické sekvenci rozpoznané „nicking“ endonukleasou (Nt.BbvCI). V místě štěpené vazby na 5' → 3' vlákně DNA značky nasedá Taq DNA polymerasa a díky 5' → 3' exonukleasové aktivitě ho odbourává a podle 3' → 5' templátového vlákna syntetizuje nové vlákno se 7-deaza purinovými nukleotidy.

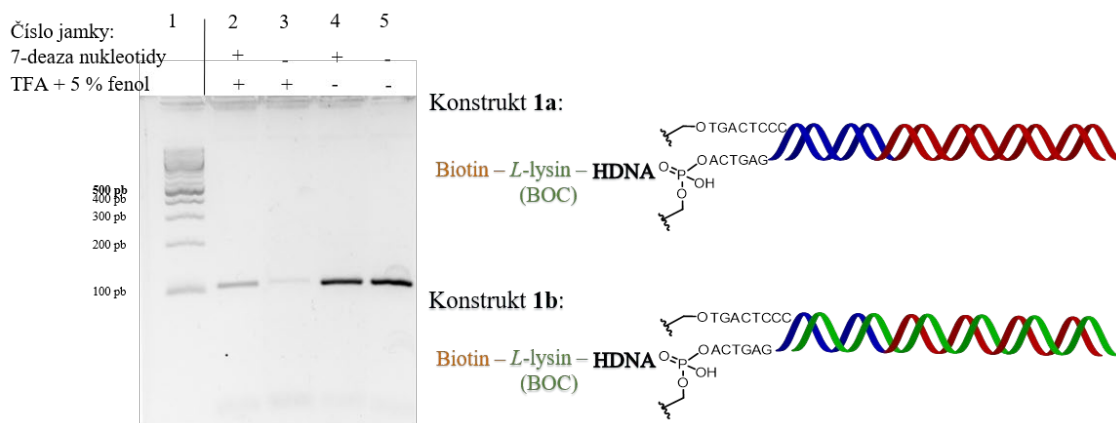
Podmínkou pro použití 7-deaza purinových nukleotidů je jejich zaměnitelnost se standardními purinovými nukleotidy. Při následné amplifikaci pomocí PCR je nutné, aby 7-deaza nukleotidy byly substrátem použité polymerasy^{56,57}.

Po vytvoření jednořetězcového zlomu a jednokolové PCR se 7-deaza purinovými nukleotidy („primer extension“) byla se vzorky konstruktů **1a** a konstruktů **1b** provedena agarosová gelová elektroforéza (Obr. 5.12). Snížená intenzita signálu v dráze **2** může značit začlenění 7-deaza purinových nukleotidů do DNA značky a tím zhoršenou schopnost interkalace barviv.



Obrázek 5.12 - Vizualizace agarosového gelu – vzorky konstruktů **1a** a **1b**. V jamkách bylo nanášeno 3 μ l délkového standardu, 4 μ l vzorků. Dráha **1** délkový standard; dráha **2** konstrukt **1b**, dráha **3** konstrukt **1a**

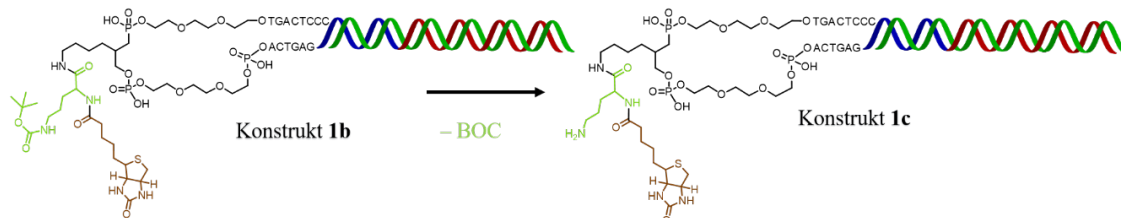
Konstrukt **1b** obsahuje lysin s chráněným postranním řetězcem, který má ϵ -aminoskupinu chráněnou vazbou BOC skupiny. Pro odstranění této chránící skupiny se používají klasické podmínky (5% (w/v) fenol v TFA). Konstrukt **1b** byl inkubován v těchto podmínkách pro ověření stability kódující DNA se začleněnými 7-deaza purinovými nukleotidy. Po inkubaci s odchraňovací směsí bylo do zkumavky pipetováno 5 μ l sterilní filtrované vody. Obsah byl opakovaně pipetován, se snahou veškerý obsah rozpustit. Dále byla s takto připraveným templátem provedena amplifikace (PCR 2, 20 cyklů) a provedena agarosová gelová elektroforéza. Nedošlo však k vymytí obsahu ze zkumavky, a proto následně na gelu nebyl pozorován signál. Experiment byl následně opakován s tím rozdílem, že po odpaření odchraňovací směsi nebyl obsah vymýván, nýbrž byla provedena amplifikace (PCR 2) v téže zkumavce (Obr. 5.13, str. 51), která již vedla k získání PCR produktu.



Obrázek 5.13 – Vizualizace agarosového gelu – amplifikace DNA značky konstruktů **1a** nebo konstruktů **1b** po inkubaci (laboratorní teplota, 10 min) v 5% (w/v) fenol v TFA nebo ve sterilní deionizované vodě. V jamkách byly naneseny 3 μ l délkového standardu, 5 μ l vzorků. Dráha **1** délkový standard; dráha **2** konstrukt **1b**, dráha **3** konstrukt **1a**; dráha **4** - konstrukt **1b** po inkubaci ve vodě, dráha **5** konstrukt **1a** po inkubaci ve vodě

Na *Obr. 5.13* je vidět, že u kódující DNA konstruktů **1b** (dráha 2) byla zachována amplifikovatelnost. Nižší intenzita signálu v dráze **2** (*Obr. 5.13*) oproti kontrolní dráze **4** může být způsobena tím, že mohlo i přes přítomnost 7-deaza purinových nukleotidů v konstruktě **1b** k částečné degradaci DNA značky. Kódující DNA konstruktů **1a** byla v kyselých podmínkách z většiny rozložena a tak v dráze **3** je pozorován jen velmi slabý signál. Je tudíž patrné, že kódující DNA byla začleněním 7-deaza purinových nukleotidů stabilizována vůči agresivním podmínkám klasického odchránění. Bylo prokázáno, že můžou být využívány klasické podmínky odchránění postranních řetězců aminokyselin, aniž by byla znemožněna amplifikace DNA značky.

Inkubace konstruktů **1b** ve výše zmíněných klasických podmínkách odchránění byla prováděna pro získání konstruktů **1c**, jehož struktura je uvedena na *Obr. 5.14*. Tento konstrukt byl po odpaření směsi 5% (w/v) fenol v TFA z plastové mikrozkušavky vymyt pomocí DMSO. Po purifikaci byl získán konstrukt **1c** používaný pro další experimenty.

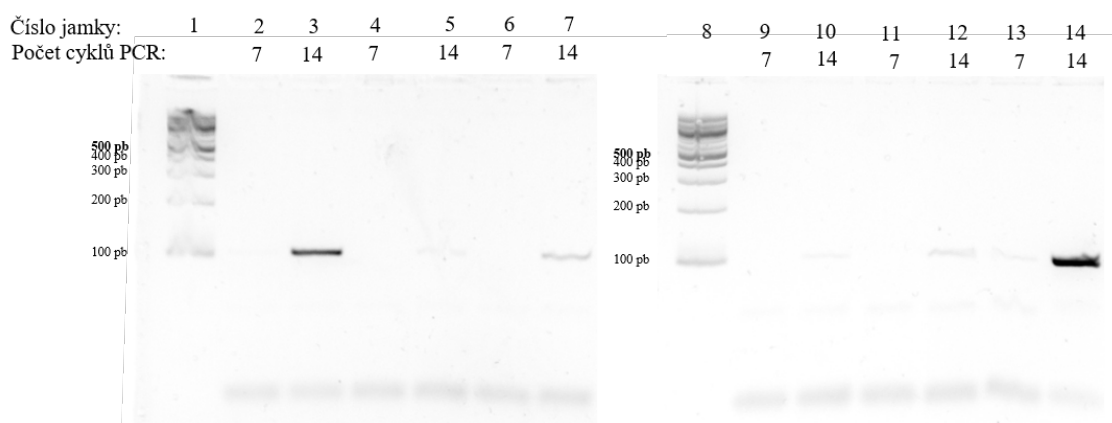


Obrázek 5.14 – Schéma odchránění postranního řetězce lysinu v konstruktě **1b**, čímž byl vytvořen konstrukt **1c**

5.5. Separace konstruktů 1c na streptavidinových magnetických kuličkách

Na molekule konstruktů 1c je vázán biotin, díky kterému může dojít k separaci na pevné fázi vlivem velmi silné, nekovalentní interakce streptavidin-biotin⁵⁸. Po působení magnetického pole se separuje pevná fáze a kapalná fáze (supernatant). Díky DNA značce je možné kvantifikovat, jaká část konstruktů 1c se vázala na streptavidinové magnetické kuličky a jaká část zůstala v roztoku.

Se vzorkem konstruktů 1c byla provedena inkubace se streptavidinovými magnetickými kuličkami a po magnetické separaci byla provedena amplifikace (PCR 2, 7 nebo 14 kol) s kapalnou fází (supernatant 1) nebo se suspenzí streptavidinových magnetických kuliček. Pro zjištění míry nespecifických interakcí bylo prováděno několik kol promývání s magnetickou separací (supernatanty 2 až 4), následně byly kuličky promyty větším množstvím pufru (500 µl) a poté opět menším (50 µl; supernatant 5). Po magnetické separaci byla u každého supernatantu provedena purifikace (Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit – návod „oligonucleotide cleanup“) supernatantů, aby byly zbaveny zbytků EDTA, které by mohly interferovat s PCR. Se všemi supernatanty byla provedena také amplifikace (PCR 2, 7 nebo 14 kol). Vzorky byly po agarosové elektroforéze vizualizovány na gelu (Obr. 5.15).



Obrázek 5.15 - Vizualizace agarosového gelu – amplifikace (PCR 2 se 7 nebo 14 koly) DNA značky konstruktů 1c po separaci na streptavidinových magnetických kuličkách. V jamkách byly naneseny 3 µl délkových standardů, 5 µl vzorků. Dráhy 1, 8 délkový standard; dráhy 2, 3 supernatant 1; dráhy 4, 5 supernatant 2; dráhy 6, 7 supernatant 3; dráhy 9, 10 supernatant 4; dráhy 11, 12 supernatant 5; dráhy 13, 14 suspenze streptavidinových magnetických kuliček

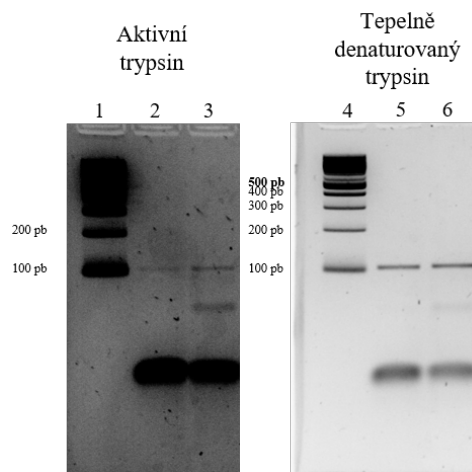
Z Obr. 5.15 (porovnání drah 3 a 14) je zřejmé, že většina konstruktů 1c byla efektivně imobilizována na streptavidinových magnetických kuličkách. Tento fakt také nepřímou potvrzuje efektivitu navázání aminokyseliny a zavedení biotinu do konstruktů

1a. Přítomnost signálu v supernatantu (dráha **3**) může souviset s degradací při kyselých podmínkách nebo neúplným zavedením biotinu do konstruktu **1a**. Dráhy **5,10,12** nesou jen mírný signál, což odpovídá nízké míře nescifické interakce mezi streptavidinovými magnetickými kuličkami a konstruktem **1c**.

5.6. Štěpení konstruktu **1c** trypsinem

Důležitou aplikací DNA kódovaných knihoven peptidů je jejich kombinace s proteolytickým štěpením, jak bylo naznačeno v teoretickém úvodu. Lysin byl do konstruktu **1c** včleněn proto, aby mohl být tento konstrukt v závěrečném experimentu štěpen pomocí trypsinu.

V experimentu byly připraveny dvě reakční směsi. První obsahovala konstrukt **1c** s nedenaturovaným (aktivním) trypsinem. Druhá obsahovala konstrukt **1c** s tepelně denaturovaným trypsinem. Po inkubaci byla provedena ireverzibilní inhibice trypsinu pomocí PMSF, aby nedocházelo ke nescifickému štěpení streptavidinu trypsinem, které by mohlo ovlivnit výsledek separace. Po inhibici trypsinu byly vzorky supernatantu 1 purifikovány a proběhla amplifikace (PCR 2) se 14 cykly. Vzorky byly po agarosové elektroforéze vizualizovány na gelu (*Obr. 5.16*).



Obrázek 5. 16 Vizualizace agarosového gelu – amplifikace DNA značky konstruktu **1c** pomocí PCR po inkubaci s trypsinem a separaci na streptavidinových magnetických kuličkách. V jamkách byly nanášeny 3 μ l délkového standardu, 5 μ l vzorků. Dráhy **1, 4** délkový standard; dráha **2** suspenze streptavidinových magnetických kuliček, dráha **3** supernatant 1; dráha **5** suspenze streptavidinových magnetických kuliček; dráha **6** supernatant 1

Pro vyhodnocení experimentu byla proto provedena kvantifikace signálů na agarosovém gelu (*Obr. 5.16*) pomocí software (ImageJ), (*Tab. 5.2*, str. 54). Je zřejmé, že došlo k zesílení signálu ve frakci „supernatant 1“ v reakční směsi, která obsahovala

aktivní trypsin oproti reakční směsi, která obsahovala tepelně denaturovaný trypsin. Tento experiment naznačuje, že konstrukt **1c** je skutečně štěpen trypsinem. Pro jednoznačné potvrzení tohoto závěru bude v budoucnu nutné tento experiment několikrát zopakovat a vhodné by bylo využití multiplikátů. Taktéž by bylo vhodné snížit úroveň nenavázaného konstruktu **1c** a to zvýšením výtěžku navázání biotinu a zefektivněním purifikace. Zároveň může být překážkou pro štěpení sterické bránění biotinu navázaného bezprostředně za lysinem. Pro další fáze projektu by bylo vhodné vyzkoušet experimenty, v nichž by byl biotin vázán k lysinu pomocí delší spojky.

Tabulka 5.2 – Poměr signálů po PCR amplifikaci mezi frakcí „supernatant 1“ a „streptavidinové magnetické kuličky“ po inkubaci konstruktu **1c** s aktivním nebo tepelně denaturovaným trypsinem

	Streptavidinové magnetické kuličky	Supernatant 1
	Procentuální zastoupení v součtu intenzity signálů	
Aktivní trypsin	27 %	73 %
Tepelně denaturovaný trypsin	50 %	50 %

6. Diskuze

Diplomová práce se zabývala možnostmi přípravy syntetických DNA kódovaných knihoven (DEL) peptidů. Motivací pro vyvinutí takovéto knihovny je možnost jejího využití pro objevování specifických posttranslačních modifikací (*Obr. 2.13*, str. 26). Tento zamýšlený esej využívá štěpení peptidů nesespecifickými proteasami. Z tohoto důvodu by bylo velmi složité využít některou ze známých „display“ metod (např. „phage display“), jelikož kromě dané knihovny peptidů v těchto konstruktech jsou ostatní složky (spojky, kotvící část atd.) též peptidové povahy. Pro přípravu modelového konstruktu byl využit známý koncept syntetických DNA kódovaných knihoven malých molekul⁸. Problematickou částí u tohoto konceptu je nekompatibilita knihoven se silně kyselými reakčními podmínkami, které jsou nezbytné pro závěrečné odchránění syntetických peptidů. Důvodem této nekompatibility je to, že vlivem kyselých podmínek dochází k depurinaci a tím degradaci DNA. Prvním cílem této práce bylo překonání této limitace, k čemuž byly testovány dva přístupy.

První z přístupů bylo odchránění postranních řetězců aminokyselin pomocí mírných metod. Nejprve byl syntetizován chráněný modelový tetrapeptid. Bylo testováno odštěpení chránících skupin z postranních řetězců pomocí mírných podmínek, které by mohly být kompatibilní s kódující DNA. Byly objeveny podmínky, při kterých docházelo k odštěpení chránících skupin *t*-Bu a BOC. Ostatní skupiny (Pbf, Trt) však byly vůči mírným podmínkám odchránění rezistentní. Zároveň se tyto podmínky prokázaly stále jako moc agresivní vůči DNA, protože byla pozorována její degradace. Z těchto důvodů bylo od strategie vývoje mírných metod odchránění postranních řetězců aminokyselin upuštěno a bylo přistoupeno ke druhému z přístupů.

Druhý přístup se prokázal jako produktivnější pro přípravu chemických DEL peptidů. Jednalo se o postsyntetickou stabilizaci DNA značky začleněním 7-deaza purinových nukleotidů, které jak známo mohou být substráty DNA polymerasy⁵⁷. Nejprve byla ověřena možnost amplifikace DNA se začleněním 7-deaza purinových nukleotidů do nově syntetizované DNA a u takto upravené DNA byla prokázána stabilita v klasických, kyselých podmínkách odchránění postranních řetězců aminokyselin. Takto byla splněna hlavní podmínka DNA kódování a tou je zachování možnosti amplifikace DNA v průběhu syntézy.

Následně byl syntetizován model syntetických DEL peptidů (konstrukt **1a**), přičemž veškeré kroky syntézy byly prokázaly jako kompatibilní s kódující DNA. Na základě prokázané stability DNA se 7-deaza purinovými nukleotidy v silně kyselém prostředí bylo provedeno začlenění 7-deaza purinových nukleotidů do struktury DNA značky (konstrukt **1b**), aby mohl být ochráněn postranní řetězec aminokyseliny vázané v konstrukt. Bylo dokázáno, že takto upravená DNA značka je stabilizována vůči klasickým podmínkám ochrání a zároveň může být amplifikována. Výsledný konstrukt **1c** byl využit k separaci na streptavidinových magnetických kuličkách. Přes poměrně výrazné pozadí, bylo v závěrečné esaji s trypsinem pozorováno zvýšení žádaného signálu, které naznačuje možnou funkčnost celého přístupu. Pro další vývoj chemických DEL peptidů bude nutné zvýšit výtěžky reakcí a zlepšit purifikační kroky. Výrazné pozadí interferovalo i s vyhodnocením experimentu inkubace konstrukt **1c** s trypsinem.

Optimalizace přípravy chemických DEL peptidů by mohla vést k vývoji platformy pro screening a objevování posttranslačních modifikací. Mohla by být vytvořena kombinatoriální knihovna DNA kódovaných peptidů, která by byla následně inkubována s různými fenotypy (sérum, buněčný lyzát). V těchto fenotypech je přítomna řada enzymů zodpovědných za tvorbu PTM, mnohdy spojených s patologickými stavy organismu. Chemická DEL peptidů by představovala zajímavou alternativu ke klasickým metodám pozorování PTM (hmotnostní spektrometrie, blotovací techniky), protože by umožňovala přímočaré srovnání spektra fyziologických a patologických PTM. Další možná aplikace chemických DEL peptidů plyne z jejich plně syntetické přípravy, zajišťující mimo jiné i kompatibilitu chemických DEL peptidů s nespecifickými proteasami. Chemicky mohou být zanášeny modifikace postranních řetězců DNA kódovaných peptidů s odpovídající informací o konkrétní modifikaci v kódující DNA. Následně může být pozorováno, jak konkrétní změna postranního řetězce ovlivnila schopnost proteasy štěpit daný peptid.

7. Závěr

V této práci byly ověřeny možnosti chemické přípravy konjugátů DNA s peptidy. Byla vyvinuta metoda pro překonání limitace silně kyselého prostředí odchránění při syntéze peptidu, která je obecně nekompatibilní s DNA. Do molekuly DNA byly zavedeny 7-deaza purinové nukleotidy, které stabilizovaly DNA v těchto silně kyselých podmínkách. Tento přístup byl využit pro syntézu modelového konstruktů **1c**, který obsahuje kódující DNA konjugovanou s dipeptidem lysin–biotin. Následný experiment naznačil, že štěpení peptidové části konstruktů může být detekováno pomocí PCR amplifikace kódující DNA. Tato práce by v budoucnu mohla být využita pro syntézu DNA kódovaných knihoven peptidů a jejich následnému použití při studiu posttranslačních modifikací.

Seznam použité literatury

- (1) Neri, D.; Lerner, R. A. DNA-Encoded Chemical Libraries: A Selection System Based on Endowing Organic Compounds with Amplifiable Information. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 479–502.
- (2) Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **1985**, *228* (4705), 1315–1317.
- (3) Azzazy, H. M. E.; Highsmith, W. E. Phage Display Technology: Clinical Applications and Recent Innovations. *Clin. Biochem.* **2002**, *35* (6), 425–445.
- (4) Hanes, J.; Plückthun, A. In Vitro Selection and Evolution of Functional Proteins by Using Ribosome Display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (10), 4937–4942.
- (5) Boder, E. T.; Wittrup, K. D. Yeast Surface Display for Screening Combinatorial Polypeptide Libraries. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15* (6), 553–557.
- (6) Charbit, A.; Boulain, J. C.; Ryter, A.; Hofnung, M. Probing the Topology of a Bacterial Membrane Protein by Genetic Insertion of a Foreign Epitope; Expression at the Cell Surface. *EMBO J.* **1986**, *5* (11), 3029–3037.
- (7) Nemoto, N.; Miyamoto-Sato, E.; Husimi, Y.; Yanagawa, H. In Vitro Virus: Bonding of mRNA Bearing Puromycin at the 3'-Terminal End to the C-Terminal End of Its Encoded Protein on the Ribosome in Vitro. *FEBS Lett.* **1997**, *414* (2), 405–408.
- (8) Clark, M. A.; Acharya, R. A.; Arico-Muendel, C. C.; Belyanskaya, S. L.; Benjamin, D. R.; Carlson, N. R.; Centrella, P. A.; Chiu, C. H.; Creaser, S. P.; Cuzzo, J. W.; Davie, C. P.; Ding, Y.; Franklin, G. J.; Franzen, K. D.; Gefter, M. L.; Hale, S. P.; Hansen, N. J. V.; Israel, D. I.; Jiang, J.; Kavarana, M. J.; Kelley, M. S.; Kollmann, C. S.; Li, F.; Lind, K.; Mataruse, S.; Medeiros, P. F.; Messer, J. A.; Myers, P.; O'Keefe, H.; Oliff, M. C.; Rise, C. E.; Satz, A. L.; Skinner, S. R.; Svendsen, J. L.; Tang, L.; van Vloten, K.; Wagner, R. W.; Yao, G.; Zhao, B.; Morgan, B. A. Design, Synthesis and Selection of DNA-Encoded Small-Molecule Libraries. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (9), 647–654.
- (9) Song, M.; Hwang, G. T. DNA-Encoded Library Screening as Core Platform Technology in Drug Discovery: Its Synthetic Method Development and Applications in DEL Synthesis. *J. Med. Chem.* **2020**.
- (10) Malone, M. L.; Paegel, B. M. What Is a “DNA-Compatible” Reaction? *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18* (4), 182–187.
- (11) Luk, K.-C.; Satz, A. L. DNA-Compatible Chemistry. In *A Handbook for DNA-Encoded Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp 67–98.
- (12) Smith, G. P.; Petrenko, V. A. Phage Display. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (2), 391–410.
- (13) Huse, W. D.; Sastry, L.; Iverson, S. A.; Kang, A. S.; Alting-Mees, M.; Burton, D. R.; Benkovic, S. J.; Lerner, R. A. Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda. *Science* **1989**, *246* (4935), 1275–1281.
- (14) Weinblatt, M. E.; Keystone, E. C.; Furst, D. E.; Moreland, L. W.; Weisman, M. H.; Birbara, C. A.; Teoh, L. A.; Fischkoff, S. A.; Chartash, E. K. Adalimumab, a Fully Human Anti-Tumor Necrosis Factor α Monoclonal Antibody, for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in Patients Taking Concomitant Methotrexate: The ARMADA Trial. *Arthritis Rheum.* **2003**, *48* (1), 35–45.
- (15) Roberts, R. W.; Szostak, J. W. RNA-Peptide Fusions for the in Vitro Selection of Peptides and Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (23), 12297–12302.

- (16) Kawakami, T.; Murakami, H.; Suga, H. Messenger RNA-Programmed Incorporation of Multiple N-Methyl-Amino Acids into Linear and Cyclic Peptides. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (1), 32–42.
- (17) Dedkova, L. M.; Fahmi, N. E.; Golovine, S. Y.; Hecht, S. M. Enhanced D-Amino Acid Incorporation into Protein by Modified Ribosomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (22), 6616–6617.
- (18) Lee, S. Y.; Choi, J. H.; Xu, Z. Microbial Cell-Surface Display. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (1), 45–52.
- (19) Kenrick, S. A.; Daugherty, P. S. Bacterial Display Enables Efficient and Quantitative Peptide Affinity Maturation. *Protein Eng. Des. Sel.* **2010**, *23* (1), 9–17.
- (20) Brenner, S.; Lerner, R. A. Encoded Combinatorial Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (12), 5381–5383.
- (21) Needels, M. C.; Jones, D. G.; Tate, E. H.; Heinkel, G. L.; Kochersperger, L. M.; Dower, W. J.; Barrett, R. W.; Gallop, M. A. Generation and Screening of an Oligonucleotide-Encoded Synthetic Peptide Library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (22), 10700–10704.
- (22) Y, K.; K, N. Enzymatic Synthesis of Code Regions for Encoded Combinatorial Chemistry (ECC). *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1995**, No. 34, 201–202.
- (23) Liu, R.; Li, X.; Lam, K. S. Combinatorial Chemistry in Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 117–126.
- (24) Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery. *Nature* **1991**, *354* (6348), 84–86.
- (25) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-Binding Activity. *Nature* **1991**, *354* (6348), 82–84.
- (26) Mannocci, L.; Zhang, Y.; Scheuermann, J.; Leimbacher, M.; De Bellis, G.; Rizzi, E.; Dumelin, C.; Melkko, S.; Neri, D. High-Throughput Sequencing Allows the Identification of Binding Molecules Isolated from DNA-Encoded Chemical Libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (46), 17670–17675.
- (27) Kochetkov, N. K.; Budovskii, E. I. Hydrolysis of N-Glycosidic Bonds in Nucleosides, Nucleotides, and Their Derivatives. In *Organic Chemistry of Nucleic Acids: Part B*; Kochetkov, N. K., Budovskii, E. I., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1972; pp 425–448.
- (28) An, R.; Jia, Y.; Wan, B.; Zhang, Y.; Dong, P.; Li, J.; Liang, X. Non-Enzymatic Depurination of Nucleic Acids: Factors and Mechanisms. *PLOS ONE* **2014**, *9* (12), e115950.
- (29) Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids* **2018**, *50* (1), 39–68.
- (30) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- (31) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W., White, P., Eds.; Practical Approach Series; Oxford University Press: Oxford, New York, 1999.
- (32) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.
- (33) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504.

- (34) Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (45), 7342–7372.
- (35) Prabakaran, S.; Lippens, G.; Steen, H.; Gunawardena, J. Post-Translational Modification: Nature's Escape from Genetic Imprisonment and the Basis for Dynamic Information Encoding. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2012**, *4* (6), 565–583.
- (36) Knorre, D. G.; Kudryashova, N. V.; Godovikova, T. S. Chemical and Functional Aspects of Posttranslational Modification of Proteins. *Acta Naturae* **2009**, *1* (3), 29–51.
- (37) Khoury, G. A.; Baliban, R. C.; Floudas, C. A. Proteome-Wide Post-Translational Modification Statistics: Frequency Analysis and Curation of the Swiss-Prot Database. *Sci. Rep.* **2011**, *1* (1), 1–5.
- (38) Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K. The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **2009**, *459* (7245), 356–363.
- (39) Böhm, I.; Schild, H. Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death. *Mol. Imaging Biol.* **2003**, *5* (1), 2–14.
- (40) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry, 4th Edition*; W. Ross MacDonald School Resource Services Library, 2010.
- (41) Rodwell, V. W.; Weil, P. A.; Botham, K. M.; Bender, D.; Kennelly, P. J. *Harpers Illustrated Biochemistry 30th Edition*; McGraw-Hill Education, 2015.
- (42) Hebbes, T. R.; Thorne, A. W.; Crane-Robinson, C. A Direct Link between Core Histone Acetylation and Transcriptionally Active Chromatin. *EMBO J.* **1988**, *7* (5), 1395–1402.
- (43) Resh, M. D. Fatty Acylation of Proteins: New Insights into Membrane Targeting of Myristoylated and Palmitoylated Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451* (1), 1–16.
- (44) Pickart, C. M.; Fushman, D. Polyubiquitin Chains: Polymeric Protein Signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (6), 610–616.
- (45) Smith, B. C.; Denu, J. M. Chemical Mechanisms of Histone Lysine and Arginine Modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1789* (1), 45–57.
- (46) Roskoski, R. Protein Prenylation: A Pivotal Posttranslational Process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303* (1), 1–7.
- (47) Bird, A. Perceptions of Epigenetics. *Nature* **2007**, *447* (7143), 396–398.
- (48) Xu, H.; Wang, Y.; Lin, S.; Deng, W.; Peng, D.; Cui, Q.; Xue, Y. PTMD: A Database of Human Disease-Associated Post-Translational Modifications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2018**, *16* (4), 244–251.
- (49) Mann, M.; Jensen, O. N. Proteomic Analysis of Post-Translational Modifications. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (3), 255–261.
- (50) Nørregaard Jensen, O. Modification-Specific Proteomics: Characterization of Post-Translational Modifications by Mass Spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (1), 33–41.
- (51) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (15), 1927–1930.
- (52) Sigma Aldrich: Fmoc Resin Cleavage and Deprotection. Dostupné z URL: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/chemistry/fmoc-cleavage-deprotection.html> (citováno 30. 5. 2020).
- (53) Wang, J.; Liang, Y.-L.; Qu, J. Boiling Water-Catalyzed Neutral and Selective N-Boc Deprotection. *Chem. Commun.* **2009**, No. 34, 5144–5146.

- (54) New England Biolabs: Quick Protocol for Oligonucleotide Cleanup Using the Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit Dostupné z URL: <https://international.neb.com/protocols/2017/04/25/quick-protocol-for-oligonucleotide-cleanup-using-the-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-g-neb-t1030> (citováno 31. 5. 2020).
- (55) Heiter, D. F.; Lunnen, K. D.; Wilson, G. G. Site-Specific DNA-Nicking Mutants of the Heterodimeric Restriction Endonuclease R.BbvCI. *J. Mol. Biol.* **2005**, *348* (3), 631–640.
- (56) Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Academic Press, 2012.
- (57) Jung, A.; Ruckert, S.; Frank, P.; Brabletz, T.; Kirchner, T. 7-Deaza-2'-Deoxyguanosine Allows PCR and Sequencing Reactions from CpG Islands. *Mol. Pathol.* **2002**, *55* (1), 55–57.
- (58) Green, N. M. Avidin. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Edsall, J. T., Richards, F. M., Eds.; Academic Press, 1975; Vol. 29, pp 85–133.