

Souhrn

V první části této práce byla vyvinuta série specifických umělých metalonukleáz (AMN), které konjugují sevřené fenanthrolinové měděné komplexy (Clip-Phen) s oligonukleotidy vytvářejícími triplex (TFO). Pro syntézu hybridů TFO-AMN bylo zkoumáno několik syntetických cest, přičemž všechny sdílely mědí katalyzovanou alkyn-azidovou cykloadici (CuAAC) jako klíčový krok. V důsledku toho byly připraveny stavební bloky pro enzymatickou nebo chemickou syntézu oligonukleotidů (ON) obsahujících klikací skupiny nebo již konjugované s ligandem Clip-Phen přes CuAAC. Byly navrženy a vyvinuty dva nové alkynyl modifikované nukleosid-5'-*O*-trifosfáty (dNTP), aby bylo dosaženo účinné polymerázové inkorporace klikacích alkynyl řetězců do ON a zároveň zvýšení účinnosti CuAAC reakcí na modifikované DNA. Byly také připraveny odpovídající 3'-*O*-fosforamidity, aby se pomocí chemické syntézy na pevné fázi vložily stejné alkynylové linkery do ON. AMN byla připojena na 5'- nebo 3'- koncích nebo uprostřed TFO úseku pomocí různých linkerů. Byla studována hybridizace všech syntetizovaných TFO s duplexem DNA obsahujícím cílovou sekvencí. Nakonec byla provedena rozsáhlá studie účinnosti štěpení a specifity konjugátů TFO-AMN vůči cílové DNA, přičemž se zkoumal vliv vlastností hybridů a reakčních parametrů.

Ve druhé části této práce bylo provedeno systematické studium kompetitivní polymerázové inkorporace 5-substituovaných pyrimidinových a 7-substituovaných 7-deazapurinových dNTP v přítomnosti jejich přirozených protějšků (přírodních dNTP). dN^RTP s modifikovanými nukleobázemi byly inkorporovány do ON kompetitivní extenzi primeru (PEX) nebo polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), v různých poměrech s přírodními dNTP. Byla studována enzymatická kinetika inkorporace jednoho nukleotidu, aby se prozkoumala afinita substrátu k Bst DNA polymeráze a rychlost inkorporace všech dN^RTP s modifikovanými nukleobázemi. Všechny studované dNTP byly úspěšně začleněny do DNA v přítomnosti přírodních dNTP. Bylo zjištěno, že 7-deazapurinové dNTP nesoucí substituenty bohaté na π -elektrony a 5-fenylpyrimidinové dNTP jsou ještě lepšími substráty pro Bst polymerázu, než jejich přirozené protějšky.