

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



**SYNTETICKÁ BIOLOGIE A JEJÍ VÝZNAM**  
**PRO MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKU**

**Bakalářská práce**

Vedoucí bakalářské práce: prof. PharmDr., Martin Beránek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Petra Doležalová

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu bakalářské práce prof. PharmDr., Martinu Beránkovi, Ph.D. za jeho rady a čas, který mi věnoval při psaní bakalářské práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 20.8. 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name 'Děla'.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biochemických věd

Autor: Petra Doležalová

Vedoucí bakalářské práce: prof. PharmDr., Martin Beránek, Ph.D.

Název: Syntetická biologie a její význam pro molekulární diagnostiku

Cíl práce:

Jedním z cílů práce byla charakterizace oligonukleotidových a polynukleotidových vláken. Dalším cílem bylo popsat jednu z úloh syntetické biologie, a to přípravu dlouhých a krátkých polymerních řetězců.

Hlavní poznatky:

Bakalářská práce se zabývá charakteristikou oligonukleotidových a polynukleotidových vláken, z hlediska jejich chemické struktury, významu pro buňku a molekulární diagnostiku. Oligonukleotidy představují jeden z nejdůležitějších nástrojů moderní molekulární diagnostiky. Jedním z cílů syntetické biologie je syntéza sekvencí oligonukleotidů. Proto se tato práce zabývá popisem některých syntézních metod přímo oligonukleotidů, ať už se jedná o krátké oligonukleotidy nebo dlouhá polynukleotidová vlákna délky ultramerů až genů.

Závěr:

Z přehledu metod a technik uváděných po základních poznatcích o oligonukleotidových a polynukleotidových vláken a popisu uplatnění těchto vláken v molekulární diagnostice je zřejmé, že dochází k vývoji biotechnologickým automatizovaným metodám, které vedou k menší spotřebě reagentů, vzorků a také k celkovému snížení času analýz.

**Klíčová slova:** oligonukleotid, nukleová kyselina, fosforamiditová metoda, automatizace, mikročipy, komplementární, enzymatické metoda, klonování, biotechnologie

## **Abstract**

Charles University, Pharmaceutical faculty in Hradec Kralové

Department: Department of biochemical sciences

Author: Petra Doležalová

Supervisor of the bachelor thesis: prof. PharmDr., Martin Beránek, Ph.D.

Headline: Synthetic biology and its importance for molecular diagnostics

Main aim of the work: One of the goals of the thesis was to characterize oligonucleotide and polynucleotide strands. Another goal was to describe one of the tasks of synthetic biology, namely the preparation of long and short polymer chains.

Main findings:

The bachelor thesis deals with the characterization of oligonucleotide and polynucleotide fibers, in terms of their chemical structure, importance for the cell and molecular diagnostics. Oligonucleotides represent one of the most important tools of modern molecular diagnostics. One of the goals of synthetic biology is the synthesis of oligonucleotide sequences. Therefore, this paper deals with the description of some synthesis methods directly for oligonucleotides, whether they are short oligonucleotides or long polynucleotide strands of ultramers to genes in length.

Conclusion:

From the overview of the methods and techniques presented after the basic knowledge of oligonucleotide and polynucleotide fibers and the description of the application of these strands in molecular diagnostics, it is clear that there is a development of automated methods resulting in less consumption of reagents, samples and also an overall reduction in analysis time.

Keywords: oligonucleotide, nucleic acid, phosphoramidite method, automation, microarrays, complementary, enzymatic method, cloning.

# Obsah

Úvod.....	1
1 Oligonukleotidová a polynukleotidová vlákna, jejich struktura a význam v biologii buněk.....	2
1.1 Chemická struktura .....	2
1.1.1 Dusíkatá báze – purin, pyrimidin.....	2
1.1.2 Fosfátová skupina .....	4
1.1.3 $\beta$ -ribofuranosa a $\beta$ -2-deoxyribofuranosa .....	4
1.1.4 Vazby v řetězci nukleotidu .....	5
1.1.5 Oligonukleotidy a polynukleotidy .....	5
1.1.6 Názvosloví .....	6
1.2 Metabolismus nukleotidů v organismu .....	6
1.2.1 Exogenní nukleotidy .....	6
1.2.2 Endogenní nukleotidy – syntéza a odbourávání .....	6
1.3 Význam nukleotidů v organismu .....	8
1.3.1 Přenašeči chemické energie .....	8
1.3.2 Součást koenzymů a signálních molekul .....	8
1.3.3 Stavební kameny nukleových kyselin.....	8
2 Význam oligonukleotidů v molekulární diagnostice.....	11
2.1 Primery.....	11
2.1.1 Aplikace primerů v PCR technologii.....	11
2.1.2 Aplikace primerů v sekvenování .....	13
2.1.3 Aplikace primerů v ligačním testu oligonukleotidů .....	13
2.2 Sondy.....	13
2.2.1 Značení sond .....	13
2.2.2 Hydrolyzace sond v roztoku .....	14
2.2.3 Metody využívající hybridizaci sond na pevném podkladu .....	15
2.3 Oligonukleotidové aptamery .....	17
2.3.1 Aplikace oligonukleotidových aptamerů .....	18
3 Technologie přípravy oligonukleotidů .....	20
3.1 Historie přípravy oligonukleotidů .....	20
3.1.1 Vznik dithymidinu .....	20
3.1.2 Fosfodiesterová metoda .....	21
3.1.3 Fosfotriesterová metoda.....	21

3.1.4	Fosfit-triester oligonukleotidová metoda.....	21
3.2	Syntéza oligonukleotidů na pevné fázi .....	22
3.2.1	Fosforamiditová metoda .....	22
3.2.2	Odštěpení od pevné fáze .....	25
3.2.3	Deprotekce bází a fosfátových skupin oligonukleotidů.....	25
3.2.4	Purifikace .....	27
3.2.5	Odsolování .....	28
3.2.6	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) .....	28
3.2.7	Purifikace chromatografickými postupy .....	28
3.3	Enzymatická syntéza .....	29
3.3.1	Počátky enzymatické syntézy .....	29
3.3.2	Enzymy používané dnes .....	29
3.4	Modifikace oligonukleotidů .....	30
3.4.1	Modifikace páteře .....	30
3.4.2	Modifikace pentózy .....	31
4	Ultramery .....	32
4.1	Syntéza .....	32
4.1.1	Syntéza na mikročipech .....	32
4.1.2	Syntetizátor založený na mikroreaktorovém čipu a inkoustovém tisku ...	33
4.1.3	Technologie založené na elektrochemicky modifikovaných elektrodách – společnost CustomArray .....	34
4.2	Enzymatická syntéza .....	35
4.2.1	Terminální deoxynukleotidyltransferáza (TdT).....	35
4.2.2	Asymetrická polymerázová řetězová reakce .....	35
4.2.3	Reakce výměny primerů .....	35
4.3	Syntéza na bázi bakterií .....	35
5	Syntéza genů .....	37
5.1	Polymerázová cyklická montáž (PCA) .....	37
5.2	Syntéza genů ligací .....	38
5.3	Metoda genové syntézy spojená s klonováním .....	39
5.3.1	Jednokrokové klonování nezávislé na sekvenci a ligaci (SLIC) .....	39
5.3.2	Jednostupňová montáž z překrývajícími se oligonukleotidů .....	40
	Závěr .....	42
	Seznam použitých zkratk .....	43
	Seznam použité literatury .....	45

## ÚVOD

Syntetická biologie se opírá o syntetické vlastní sekvence DNA, včetně oligonukleotidů a delších fragmentů jako jsou syntetické geny nebo celé genomy. Průlomy umožňující rozsáhlou, levnou a účinnou konstrukci požadovaných úseků mohou urychlit pokrok v biologickém výzkumu a aplikacích. Jedním z cílů syntetické biologie je tyto požadované úseky syntetizovat. Jejich analýza přispívá k pochopení vzniku a přenosu různých infekčních nebo genetických chorob.

Zveřejnění struktury DNA odstartovalo zápal dozvědět se o jejím fungování v biologických systémech. Krátce po jejím objevu byly publikovány první pokusy o vytvoření syntetických řetězců DNA a vědci zavedli slovo oligonukleotid. Syntéza oligonukleotidů převážně vychází z fosforamiditové chemie vzniklé v 80. letech minulého století.

Je možné sestavit oligonukleotidů do delších fragmentů kódujících syntetické geny. Syntéza genů umožňuje vytvářet a modifikovat genetické sekvence. Rekonstrukce kompletních virových a bakteriálních genomů svědčí o tom, kam až se syntetické schopnosti dostaly.

Molekulární diagnostika nachází uplatnění díky vývoji automatizovaných přístrojů poskytující výsledky využívané k analýze bakteriálních a virových genomů pro volbu správné léčby. Dále k diagnostice rakoviny zaměřující se na genomové markery v nádorové DNA a analýze lidských genů.

V bakalářské práci jsou popsány některé ze syntetizačních technik přípravy oligonukleotidových a polynukleotidových řetězců.

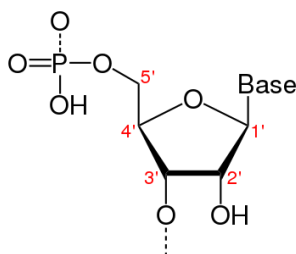


# 1 Oligonukleotidová a polynukleotidová vlákna, jejich struktura a význam v biologii buněk

Základní vlastnosti oligonukleotidových a polynukleotidových vláken jsou popsány v následujících kapitolách.

## 1.1 Chemická struktura

Z chemického hlediska se jedná o fosforečné estery pentóz vázané na devítičlennou purinovou (adenin, guanin) nebo šestičlennou pyrimidinovou (uracil, thymin, cytosin) dusíkatou bázi. Obecný chemický vzorec je uveden na obrázku 1.



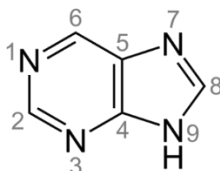
**Obr. 1: Základní struktura nukleotidu**

Zdroj: [https://www.wikiskripta.eu/w/Nukleotid#/media/File:Nukleotid\\_num.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Nukleotid#/media/File:Nukleotid_num.svg).

Atomy uhlíků ve vzorci bázi i sacharidu mají stejná čísla uhlíků (viz obrázek 1). Pro jejich odlišení se užívá apostrofa (např. 1'). Apostrofu píšeme při číslování atomů uhlíku v sacharidové části vzorce.

### 1.1.1 Dusíkatá báze – purin, pyrimidin

Purin, což je jeho systematický název, je tvořen kondenzovaným pyrimidinovým a imidazolovým kruhem. Jeho sumární vzorec je  $C_5H_4N_4$ , a je uveden na obrázku 2.

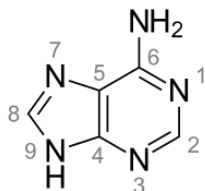


**Obr. 2: Vzorec dusíkaté báze purin**

Zdroj: [https://en.wikipedia.org/wiki/Purine#/media/File:Purin\\_num2.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Purine#/media/File:Purin_num2.svg)

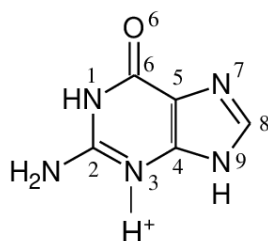
Základní purinové báze jsou adenin (6-aminopurin) (A) a guanin (2-amino-6-hydroxypurin)

(G). Strukturální vzorce bází jsou uvedeny na obrázku 3 a 4.



**Obr. 3: Vzorec adeninu**

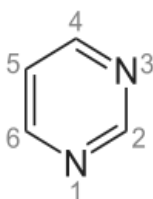
Zdroj: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Adenin#/media/Soubor:Adenine\\_numbered.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Adenin#/media/Soubor:Adenine_numbered.svg)



**Obr. 4: Vzorec guaninu**

Zdroj: [https://www.researchgate.net/figure/Scheme-1-Protonated-structure-of-guanine\\_fig1\\_314229726](https://www.researchgate.net/figure/Scheme-1-Protonated-structure-of-guanine_fig1_314229726)

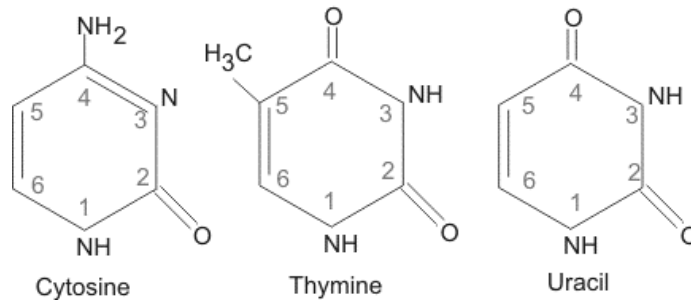
Pyrimidin, jehož systematický název je 1,3-diazin. Jeho sumární vzorec je C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>, strukturální vzorec je uveden na obrázku 5.



**Obr. 5: Vzorec pyrimidinu**

Zdroj: [https://www.wikiskripta.eu/w/Pyrimidiny#/media/File:Pyrimidin\\_num.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Pyrimidiny#/media/File:Pyrimidin_num.svg)

Základní pyrimidinové báze jsou thymin (5-methylpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion) (T), uracil (pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion) (U) a cytosin (4-aminopyrimidin-2(1H)-on) (C). Strukturální vzorce pyrimidinových bází jsou uvedeny na obrázku 6.

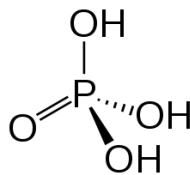


**Obr. 6: Vzorec cytosinu, thyminu a uracilu**

Zdroj: <https://d1yboe6750e2cu.cloudfront.net/i/40152390c22c9ec1891b95b0df91ebc26691ff83>

### 1.1.2 Fosfátová skupina

Fosfátovou skupinu tvoří zbytek kyseliny fosforečné, její strukturní vzorec je uveden na obrázku 7. Nukleotid bez fosfátové skupiny se nazývá nukleosid, ve své molekule má dusíkatou bázi a sacharid. Nukleosidy jsou adenosin, guanosin, uridin, thymidin a cytidin. Nukleosidy esterově vážou jednu, dvě nebo tři molekuly kyseliny fosforečné za vzniku mono, di a trifosfátů. Důležitou funkcí kyseliny fosforečné je schopnost tvořit makroergické vazby v ATP a s monosacharidy. Hydrolýzou makroergických vazeb je získáno velké množství energie, která v organismu slouží pro řadu metabolických reakcí (např. pro tvorbu nukleových kyselin). Dále nukleotidy mohou být donory fosfátové skupiny v biochemických pochodech. Nukleotidy se díky fosfátové skupině chovají jako kyseliny.



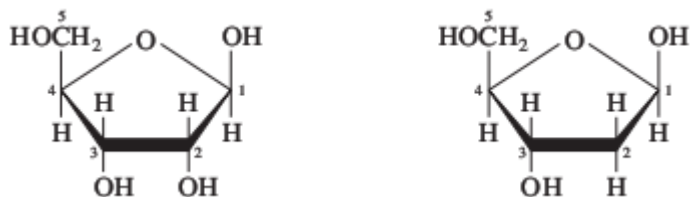
**Obr. 7: Vzorec kyseliny fosforečné**

Zdroj: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/29/Phosphoric\\_acid.svg/220px-Phosphoric\\_acid.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/29/Phosphoric_acid.svg/220px-Phosphoric_acid.svg.png)

### 1.1.3 $\beta$ -ribofuranosa a $\beta$ -2-deoxyribofuranosa

Nukleotidy ve své molekule obsahují monosacharid, který je derivátem furanu, má tedy pětičlenný kruh. Obsahuje-li nukleotid sacharid  $\beta$ -ribofuranosa, nazývá se ribonukleotid. Pokud ve své molekule obsahuje sacharid  $\beta$ -2-deoxyribofuranosa,

jedná se o deoxyribonukleotid. Na obrázku 8 jsou uvedeny vzorce  $\beta$ -ribofuranosy a  $\beta$ -2-deoxyribofuranosy.



**Obr. 8:  $\beta$ -ribofuranosa,  $\beta$ -2-deoxyribofuranosa**

*Zdroj: <http://anatheworldofscience.blogspot.com/2016/06/>*

#### 1.1.4 Vazby v řetězci nukleotidu

Nukleotid je fosforylovaný nukleosid na jedné z cukerných volných hydroxylových funkčních skupin. Při spojení nukleotidů vzniká mezi hydroxylovou funkční skupinou na uhlíku číslo tři (C<sub>3</sub>) pentózy a fosfátem na uhlíku číslo pět (C<sub>5</sub>) pentózy fosfodiesterová vazba. N-glykosidickou vazbou jsou k cukerné části připojeny dusíkaté báze na uhlíku číslo jedna (C<sub>1</sub>) pentózy.

#### 1.1.5 Oligonukleotidy a polynukleotidy

Výše popsaná struktura se týkala mononukleotidů, postupným připojováním dalších nukleotidů vznikají oligonukleotidy a polynukleotidy. Oligonukleotidy ve svém řetězci obsahují desítky jednotek nukleotidů (Beránek 2016). Délka oligonukleotidů se může lišit dle čerpané literatury. Oligonukleotid je tvořený 8-50 jednotkami (Ronak 2019), ale může být také v literatuře uvedeno, že délka oligonukleotidu se nejčastěji pohybuje mezi 8-20 mononukleotidy (Flegr 2018). Polynukleotidy obsahují minimálně sto jednotek nukleotidů. Jednotky nukleotidů jsou vzájemně spojeny od svého 5' konce molekuly k 3' konci molekuly, tedy chemická vazba vzniká mezi hydroxyly na uhlících sousedních pentóz v polohách 3' a 5'. Spojení v polohách 3' a 5' je považováno za přirozené spojení, laboratorně lze vytvořit spojení mezi uhlíky v polohách 2' a 5', které se v přírodě běžně nevyskytuje. Řetězec má svoji polaritu, fosfátová skupina je na pátém (5') konci a sacharid na konci třetím (3').

### **1.1.6 Názvosloví**

Názvosloví nukleotidů užívá třípísmenné zkratky. Název obsahuje názvy vazeb a počet fosfátů. Pokud ve vzorci není uveden název sacharidu, obsahuje ve své molekule vždy ribosu, např. AMP (adenosinmonofosfát). Sacharid deoxyribosa je naznačen písmenkem „d“ ve vzorci, např. dAMP (deoxyadenosinmonofosfát).

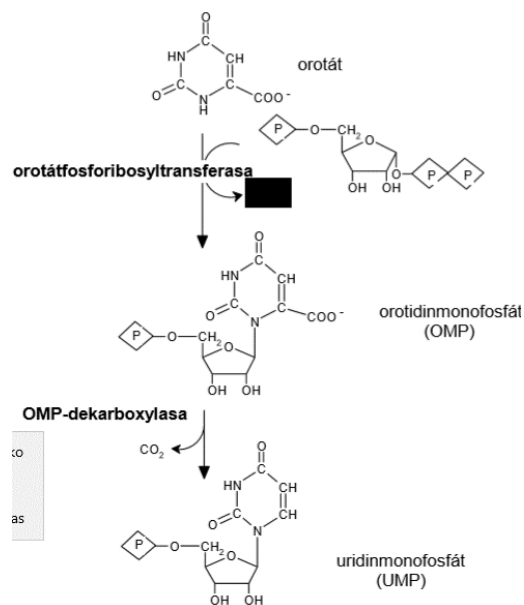
## **1.2 Metabolismus nukleotidů v organismu**

### **1.2.1 Exogenní nukleotidy**

Exogenní nukleotidy přijímáme v potravě hlavně ve formě nukleových kyselin, štěpí se nukleázami v gastrointestinálním traktu. Vstřebávání v gastrointestinálním traktu je omezené, nukleotidy bývají degradovány a poté eliminovány.

### **1.2.2 Endogenní nukleotidy – syntéza a odbourávání**

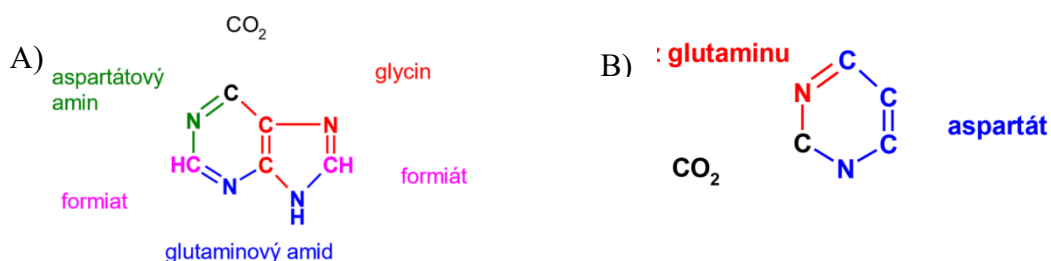
Endogenní nukleotidy jsou v organismu syntetizovány „de novo“ (z nízkomolekulárních prekurzorů) nebo jsou opětovně využity částečně odbourané pro syntézu nových. Syntéza probíhá ve všech buňkách, konkrétně v cytosolu. Syntéza je důsledně regulována, pro buňku je energeticky náročná. Nejprve dochází ke vzniku dusíkaté báze, poté se připojuje pentóza s navázanou fosfátovou skupinou. (připojování je naznačeno na obrázku 9).



**Obr. 9: Připojování pentózy s navázanou fosfátovou skupinou k prekurzoru mononukleotidu**

Zdroj: SKÁLOVÁ. Základní biochemické dráhy v buňce. Praha: Karolinum. ISBN 9788024626628

Na obrázku 10 jsou uvedeny prekurzory pro syntézu purinu a pyrimidinu. Purin je syntetizován z aspartátového aminu, formiátu, glutaminového amidu a glycinu. Pyrimidin je syntetizován z glutaminu a aspartátu.



**Obr. 10: A) látky, z nichž se syntetizuje purinová báze, B) látky, z nichž se syntetizuje pyrimidinová báze**

Zdroj: SKÁLOVÁ. Základní biochemické dráhy v buňce. Praha: Karolinum. ISBN 9788024626628

Odbourávání nukleotidů je zahájeno odštěpením fosfátu, následuje odštěpení pentózy a poté dochází k degradaci dusíkaté báze. Konečným produktem purinových bází je kyselina močová, purinové báze se degradují oxidačně v játrech. Konečným produktem pyrimidinových bází je malonyl-CoA a methylmalonyl-CoA, jsou degradovány redukčně v játrech.

## **1.3 Význam nukleotidů v organismu**

Nukleotidy představují pro buňky nezanedbatelné součásti organismu. Plní zde v organismu řadu biochemických a fyziologických funkcí. Z nutričního hlediska jsou nukleotidy pro tělo nezbytné látky. Dietární nukleotidy jsou obsažené v potravě, hlavně v mase a luštěninách. Pro podporu růstu se přidávají do výrobků kojenecké a dětské výživy.

### **1.3.1 Přenašeči chemické energie**

Nukleotidy jsou přenašeči chemické energie, zachytí energii ve své molekule z exergonických dějů, jedná se o vysokoenergetické fosfáty. Rozpadem molekuly se dodává energie do endergonických dějů. Ve většině procesů je univerzálním nosičem volné energie adenosintrifosfát (ATP), který slouží jako pohon řady metabolických drah. Mezi další vysokoenergetické fosfáty se řadí guanosintrifosfát (GTP), cytidintrifosfát (CTP), uridintrifosfát (UTP). GTP se účastní např. proteosyntézy, signalizace a citrátového cyklu. UTP se podílí např. na syntéze sacharidů a CTP na syntéze glycerofosfolipidů a sfingolipidů.

### **1.3.2 Součást koenzymů a signálních molekul**

Nukleotidy se vážou na další skupiny látek za tvorby koenzymů, které mají důležitou roli při přenosu atomů, elektronů nebo skupin atomů při enzymatických reakcích. Koenzymy jsou např. NADP (Nikotinamidadenindinukleotidfosfát), NAD (Nikotinamidadenindinukleotid), FAD (flavinadenindinukleotid), koenzym A.

Jsou také součástí specifických signálních molekul v buňce, příkladem je cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), který je druhým poslem a zajišťuje mezibuněčnou komunikaci.

### **1.3.3 Stavební kameny nukleových kyselin**

Jednou z jejich hlavních funkcí je součást nukleových kyselin jako jejich stavební kameny. Podle zastoupení nukleotidů v řetězci nukleových kyselin rozeznáváme dvě třídy nukleových kyselin – deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) a ribonukleovou kyselinu (RNA). 600 miliónů nukleotidů je uloženo do molekul RNA a přes šest miliard párů bází je uloženo v DNA (Beránek 2016).

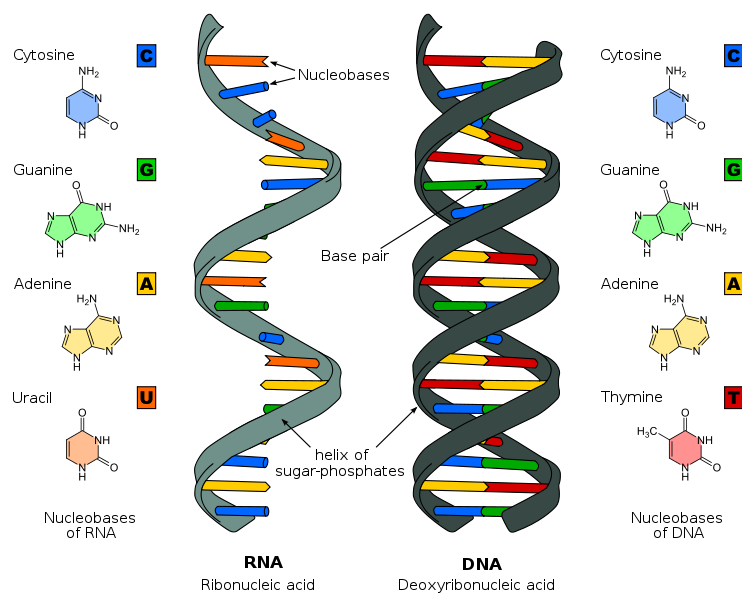
Molekula DNA obsahuje genetickou informaci, která je nezbytná pro vznik a existenci organismu. Souhrn genetické informace v organismu se nazývá genom, který je určen pořadím a sekvencí nukleotidů. DNA je uloženo v jádře každé buňky a mitochondriích.

Molekuly RNA jsou považovány za funkční molekuly, rozeznáváme mRNA (=mediátorová, přenáší informace o aminokyselinové sekvenci z jaderné DNA do místa proteosyntézy), tRNA (=transferová, přenos aminokyselin) a rRNA (=ribosomální, strukturální součásti ribozomu, katalytická funkce).

Nukleové kyseliny se řadí mezi makromolekulární sloučeniny, vznikají spojením nukleotidů do řetězců. Spojení je katalyzováno polymerázou a vzniká pomocí fosfodiesterových vazeb.

Pořadí nukleotidů v řetězci určuje primární strukturu nukleových kyselin. Sekundární struktura vzniká interakcí nesousedících nukleotidů, které vytvářejí vodíkové vazby podle pravidel Watson-Crickova párování – tři vodíkové vazby mezi cytosinem a guaninem a dvě vodíkové vazby mezi adeninem a thyminem (uracilem, dle druhu nukleové kyseliny), skládají se antiparalelně, tedy polynukleotidové řetězce jsou orientovány protisměrně (sekundární struktura je uvedena na obrázku 11). Podmínkou sekundární struktury je tautomerie thyminu a guaninu v ketoformě a aminoforma cytosinu, adeninu a uracilu. Základním typem sekundární struktury DNA je stočení dvou polynukleotidových řetězců do dvoušroubovice. RNA bývá většinou tvořena jedním řetězcem, ale např. u reovirů je řetězec tvořen dvěma.





**Obr. 11: Sekundární struktura, naznačené párované báze**

Zdroj:

[https://www.wikiskripta.eu/w/Sekund%C3%A1rn%C3%AD\\_struktura\\_DNA#/media/File:Difference\\_DNA\\_RNA-EN.svg.png](https://www.wikiskripta.eu/w/Sekund%C3%A1rn%C3%AD_struktura_DNA#/media/File:Difference_DNA_RNA-EN.svg.png)

V řetězci DNA je dvoušroubovice tvořena komplementárními vazbami v *cis* konformaci dle Watson-Crickova párování, kdy vzdálenost mezi dvěma sousedními nukleotidy je 0,34 nanometry (nm), šířka je 2 nm a jedna otáčka obsahuje 10 párů bází o délce 3,4 nm (Beránek 2016). Ve struktuře DNA je tedy dodržováno Chargaffovo pravidlo, kdy poměr purinů a pyrimidinů je roven 1:1. Strukturou nukleových kyselin může být i vlásenka, která vzniká v případě vodíkových vazeb v jediném řetězci, vyskytuje se např. v tRNA. V některých případech se mohou nukleotidy skládat do řetězců i proti pravidlům Watson-Crickova párování, které nastává z důvodu změny pH. Vazby v řetězci jsou pak v konfiguraci *trans* a spojují se paralelně. U dvoušroubovice DNA rozlišujeme pravotočivě orientované A a B konformace, levotočivě orientovanou Z konformaci. B-DNA je označována „Watson a Crickova“ a vyskytuje se za fyziologických podmínek. A-DNA se vyskytuje při vysokých koncentracích solí. Z-DNA se uplatňuje při regulaci genové exprese.

Při párování purinových a pyrimidinových bází procházejí vodíkové vazby mimo osu symetrie, což způsobí vznik malého a velkého žlábků. Šířky žlábků jsou charakteristické pro danou konformaci DNA.

## 2 Význam oligonukleotidů v molekulární diagnostice

Oligonukleotidy jsou jedním z nejdůležitějších nástrojů moderní molekulární diagnostiky. Bez oligonukleotidů by dnešní diagnostický a farmaceutický průmysl nemohl existovat.

### 2.1 Primery

Synteticky připravované oligonukleotidy o obvyklé délce 18-30 nukleotidů (Vychodilová 2019). Poměr nukleotidových bází ve struktuře primeru je zhruba vyrovnaný, sekvence v primeru by neměly být vzájemně komplementární. Primery se připojují ke komplementárním koncům sledovaného úseku DNA. Používají se v různých aplikacích molekulární diagnostiky pro zahajování hybridizace (propojování komplementárních úseků v DNA) s jednořetězovým vláknem DNA (ssDNA).

#### 2.1.1 Aplikace primerů v PCR technologii

Metoda probíhající in vitro, která umožňuje namnožit a poté identifikovat cílovou sekvenci DNA, a to infekčního agens, mutace nebo polymorfismu. Obecným principem metody je amplifikace cílové sekvence za použití primerů se známou sekvencí, které jsou komplementární k začátku a konci templátové DNA (jako templátové vlákno lze uplatnit i RNA).

Vzniklý PCR produkt (neboli amplicon) slouží pro další molekulární metody jako např. sekvenování DNA, restriční analýza nebo také pro další biologické využití např. pro diagnostiku onemocnění a identifikaci osob.

Primer je specifický pro každou PCR.

PCR lze použít k detekci mutací v alele genu. Užívají se primery komplementární k sekvenci mutantní a ke standardní zdravé sekvenci genu. Lze prokázat i několik mutací najednou užitím několika párů primerů komplementárních k několika rozdílným sekvencím. Primery k detekci mutací vyžadují vyšší stabilitu, proto jsou používány kratší, např. o délce 13-18 nukleotidů (Mazura 2001) nebo o délce 20-30 nukleotidů (Mazura 2001).

Primery lze uplatnit i ke zvýšení specifity amplifikace PCR reakce při předpokladu malého množství DNA nebo RNA ve vzorku. Využijí se dva páry primerů, externí a interní lišící se navzájem bodem tání ( $T_m$ ). Pomocí externího primeru dochází ke vzniku většího fragmentu požadovaného úseku ve vzorku, následně externí primer slouží jako templátové vlákno v další reakci využívající interní primery pro amplifikaci fragmentu kratšího. Interní primery jsou komplementární k vnitřní části PCR produktu první reakce.

Produkt reakce PCR může být kvantifikován. PCR produkt je měřen po každém jednotlivém cyklu na základě změn intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Pro kvantitativní detekci se používají detekční primery značené fluoroforem emitující záření určité vlnové délky po předchozí absorpci zářením o jiné vlnové délce. Kromě fluoroforu obsahují navíc i zhášec, který přijímá emitovanou energii záření, aby nebylo zachycováno detektorem. V následující podkapitole uvádím příklady detekčních primerů.

### **Systém univerzálních primerů AmpliFluor™**

5' konce jednoho ze specifických primerů je prodloužen o univerzální přívěšek. Univerzální přívěšek primeru má shodnou sekvenci jako vlásenkový primer (Uniprimer) nesoucí fluorofor a zhášec. Po zabudování vlásenkového primeru do produktu PCR je oddělen fluorofor od zhášeče a dochází ke generování fluorescenčního signálu odpovídající množství amplikované DNA.

### **Scorpions**

5' konec z jednoho primerů je prodloužen o vlásenku s fluoroforem a zhášecem, v průběhu PCR dochází k rozpletení vlásenky a její 5' se váže uvnitř cílové sekvence, a tím dochází k oddělení fluoroforu od zhášeče.

### **Systém LUX**

Systém využívající vlásenkového primeru nesoucí fluorofor, jako zhášec se uplatňuje sekundární struktura vlásenky, v průběhu amplifikace dochází k jejímu rozpletení a fluorofor se dostává z vlivu zhášeče.

### **2.1.2 Aplikace primerů v sekvenování**

Metoda umožňující stanovit primární strukturu DNA, tedy pořadí jednotlivých nukleotidů v jednom z řetězců DNA. Technologie sekvenování DNA přispěla k detekci neznámých mutací a polymorfismů v sekvenci DNA. Dále nachází využití ve fylogenetických studiích, antropologii, zemědělství a také ve forezních vědách k testování paternity nebo k objasnění viny či nevin z trestní činnosti. Primer se v metodě aplikuje připojením se k oblasti molekuly DNA, od které chceme stanovovat sekvenci.

Sekvenování se uplatňuje i v oblasti mikrobiologie identifikací bakteriálních druhů porovnáním výsledných sekvencí se známými sekvencemi v databázích. Sekvenovanou oblastí je 16S rRNA, což je úsek genu kódující podjednotku rRNA. Oblast obsahuje geny společné většině mikroorganismů a také oblasti charakteristické pro každý bakteriální druh. Sekvence genů 16S rRNA představuje výhodu pro identifikaci obtížně kultivovatelných, nekultivovatelných a pomalu rostoucích bakterií.

### **2.1.3 Aplikace primerů v ligačním testu oligonukleotidů**

Ligační test je enzymatická metoda pro detekci mutací. Technika zahrnuje propojení komplementárních úseků dvou oligonukleotidů na komplementární cílové DNA úseky v místech možných mutací působením DNA ligázy. Oligonukleotidové primery jsou navrženy tak, aby 3' konec prvního primeru sousedil s 5' koncem druhého primeru.

## **2.2 Sondy**

Synteticky připravované nebo získané z přirozeného zdroje oligonukleotidy se známou sekvencí o obvyklé délce desítek až tisíců nukleotidů (Beránek 2016), jednořetězcové a značené. Stejně jako primer se připojuje na základě komplementarity k úseku zkoumané nukleové kyseliny.

### **2.2.1 Značení sond**

Sondy jsou značeny na jednom z konců nebo uvnitř, po hybridizaci se zkoumanou nukleovou kyselinou značení umožňuje její následnou detekci.

## **Radioaktivní značení**

Sondy jsou značeny radioizotopy, většina používaných má krátkou dobu rozpadu a sondy mají proto krátkou dobu použitelnosti.

## **Neradioaktivní značení**

Nejčastěji je používaná chemická inkorporace biotinu nebo digoxigeninu do sondy s následnou reakcí využívající protilátku namířenou proti inkorporované molekule. Protilátky bývají konjugovány příslušným substrátem, po jeho přidání do reakce dochází ke katalytické reakci, produkt reakce je stanoven kolorimetricky nebo chemiluminescenčně. Dále sondy mohou být neradioaktivně značeny chemiluminoforem nebo fluoroforem.

### **2.2.2 Hydrolyzace sond v roztoku**

#### **Hydrolyzační sondy – Taq Man sondy**

Hydrolyzační sonda nese na svém 5' konci fluorofor a na 3' zhášec a je komplementární s jedním z vláken DNA. Využívá aktivitu Taq polymerázy, která odštěpí svojí 5'-3' exonukleázovou aktivitou ve ze sondy 5' konec. Uvolněný fluorofor může být excitován zářením a poté vysílá emitované záření o specifické vlnové délce, které je zachyceno detektorem. Zdrojem primárního záření je LED dioda.

Sondy TaqMan jsou využívány v genotypizačních studiích v různých odvětvích vědy.

#### **Hybridizační sondy – FRET sondy**

V reakční směsi jsou přítomny dvě sondy, první detekční a druhá kotvící sonda, hybridizují na stejné vlákno templátové DNA v těsné blízkosti. Detekční sonda je značena na 3' konci fluoresceinem, který funguje jako donor záření. Kotvící sonda nese na svém 5' konci fluorofor akceptující záření, na 3' konci je fluorofor rozložen, aby nedocházelo k jeho amplifikaci. Emise fluorescenčního záření se dosahuje pomocí FRET působící na velmi krátkou vzdálenost. LED dioda poskytuje primární záření působící na donor záření, vysílané sekundární (emitující) záření je zachyceno akceptorem, což vyvolá jeho excitaci, následuje emise záření a detektorem je zachyceno záření o specifické vlnové délce.

## **Hybridizační sondy – Sondy SimpleProbes**

Zářič a fluorofor jsou umístěny za sebou tak, že tvoří vlásenku. Po hybridizaci se vlásenka rozruší a fluorofor se dostává z vlivu zhášedce.

## **Hybridizační sondy – Sondy Molecular Beacons**

Sondy mají tvar podkovy, jejich konce jsou navzájem komplementární. Jeden z konců nese fluorofor a druhý zhášed. Vnitřní část vzniklé vlásenky hybridizuje s templátem DNA. Při hybridizaci dochází k oddálení konců, fluorofor se dostává z vlivu zhášedce.

## **Sondy Scorpions**

Tvar těchto sond připomíná škorpióna. Sonda plní svoji funkci a zároveň i funkci jednoho z amplifikačních primerů. 5' konec je sondou strukturou podobná sondě Molecular Beacons, 3' konec funguje jako amplifikační primer komplementární s templátovou DNA. Vlivem hybridizaci 3' konce a prodlužování řetězce dochází k uvolnění vnitřní část 5' konce sondy tvořené smyčkou, která je komplementární k nově tvořenému řetězci. Část této smyčky tvoří s nově vznikajícím vláknem dvouřetězec, a tím se dostává fluorofor z vlivu zhášedce a může dojít k emisi záření o specifické vlnové délce.

## **Sondy Eclipse**

Vlášenková sonda, tvořená fluoroforem a zhášedcem umístěné těsně za sebou, se připojí ke komplementárnímu vlákně. Vazba k cílové sekvenci je podpořena ligandem, což umožňuje zkrácení sondy při zachování specifčnosti. Po hybridizaci se vlásenka rozruší a fluorofor se dostává z vlivu zhášedce.

### **2.2.3 Metody využívající hybridizaci sond na pevném podkladu**

Sondy jsou komplementární se sekvencí DNA nebo RNA imobilizovanou na membráně. Délka sond metodou např. v metodě Southern blotting je okolo 500 nukleotidů (Beránek 2016). Některé membrány mohou být použity opakovaně, v tomto případě je sonda odstraněna opakovanými denaturacemi, aby nové fragmenty mohly být opět hybridizovány.

Pomocí sond lze prokázat mutaci v genu, počet detekovaných mutací se liší počtem zakotvených sond v membráně. Jedna zakotvená sonda odpovídá jedné detekované mutaci, pokud je v genu předpokládaná mutace přítomna.

Příkladem hybridizace sond na pevném podkladu je reverzní dot-blot pro detekci známých mutací, neznámé mutace detekovat nelze. Podstatou metody je aplikace oligonukleotidů vázaných na membránu jako hybridizační cíle pro amplifikovanou DNA. Lze použít jeden membránový proužek k detekci různých známých mutací.

### **Microarray – čipové technologie**

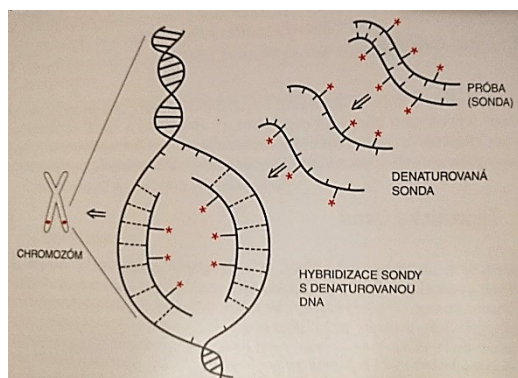
Na skleněný nebo plastový povrch čipu je fixováno velké množství sond, známe tedy jejich polohu a sekvenci. Technika je vhodná pro kvantitativní genovou expresi i pro kvalitativní analýzu genů.

Vyšetřovaná nukleová kyselina je upravena na vhodnou velikost fragmentu, značena fluoroforem a hybridizována se sondou na povrchu mikročipu. Po odmytí nespotřebovaných reagensů a nenávaných cílových nukleových kyselin je povrch čipu skenován detektorem fluorescence. Sonda může být také značena prodlužováním 3' konce, k prodlužování dochází po její hybridizaci. Pokud dojde k prodloužení řetězce, byla prokázána bodová mutace daného typu.

Microarray technologie se uplatňuje i při průkazu mikrobiálního onemocnění, jedná se o kombinaci amplifikace PCR a technologie microarray. Příkladem je identifikace bakterie *Bacillus anthracis* na základě rRNA.

### **Uplatnění sond v metodě fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a dalších příbuzných metodách**

Molekulárně cytogenetická metody využívající k detekci genetických změn v interfázních jádrech, v části nebo celých chromozomech. Fluorescenčně značená sonda je denaturována a přidána do vzorku s denaturovanou DNA, po změně podmínek reakce dochází k hybridizaci mezi sondou a vyšetřovaným úsekem DNA, tento princip je ukázán i na obrázku 12.



**Obr. 12: Princip metody FISH**

*Zdroj: DRÁBEK a kol. Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické laboratoři. Olomouc: Paleckého univerzita, 2012. ISBN 978-80-244-3002-7*

FISH využívá 3 základní typy sond dle cílového místa:

- a) Sondy hybridizující se specifickými chromozomovými strukturami – specifické pro centromerické oblasti a telomerické oblasti. Centromerické sondy umožňují stanovení počtu kopií daného chromozomu, telomerické sondy umožňují stanovení počtu chromozomů nebo aberací u telomerických sekvencí;
- b) Sondy určené pro jedinečné sekvence – sondy délek od 50 tisíc po milión nukleotidů (Beránek 2016). Specifičnost těchto sond umožňuje studovat morfologii chromozomů, určit přítomnost specifických lokusů, studium translokací, delecí a inverzí. Ve výzkumu se používají pro mapování genů;
- c) Celochromosomové neboli malovací sondy – obvykle připravovány z DNA knihoven nebo mikrodisekcí určité části chromozomu. Lze s nimi označit celý chromozom nebo vybrané fragmenty. Identifikují se s nimi strukturální přestavby chromozomů.

FISH se stala i cenným nástrojem pro specifickou a rychlou detekci patogenních bakterií ve vzorcích bez kultivace. Identifikace patogenů probíhá díky 16S rRNA sekvenci a FISH sondy jsou komplementární ke specifickým sekvencím 16S rRNA. Hybridizace sondy se stala zvláště účinnou pro pomalu rostoucí organismy.

### 2.3 Oligonukleotidové aptamery

Oligonukleotidové aptamery jsou třídou ligandů nukleových kyselin složené z ssDNA nebo RNA působící jako afinitní sondy nebo molekulární rozpoznávací prvky pro malé



molekuly a biomolekuly jako jsou cukerné skupiny, lipidy, peptidy, proteiny, celé buňky a patogenní organismy jako jsou viry a bakterie. Jsou schopné rozeznat i tkáň. Délka oligonukleotidových aptamerů je 20-70 bází (Yu 2016).

Oligonukleotidové aptamery se skládají do jedinečných stabilních sekundárních struktur, což jim umožňuje vytvářet terciální struktury. Nekovalentně se váží na různé biologické cíle s vysokou afinitou.

### **2.3.1 Aplikace oligonukleotidových aptamerů**

Aptamery byly vyvinuty za účelem rychlé diagnostiky nově vznikajících onemocnění pomocí molekulárního rozpoznávání specifických prvků pro patogeny a ostatních biomarkerů. Jsou využívány jako antagonisté, agonisté, cílicí ligandy.

Aptamery jsou také nazývány chemickými protilátkami, a to z důvodu, že jsou protilátkám funkčně podobné schopností vázat se na cílené substance. Aptamery oproti protilátkám mají řadu výhod, poskytují vyšší specifitu k cílům, připravují se v procesu *in vitro*, nevyžadují stimulaci imunitním systémem a jsou stabilní při laboratorní teplotě. Dále vykazují nízkou toxicitu a neposkytují zkříženou reaktivitu. Nebyl dosud hlášen aptamer s vysokou imunogenicitou. Díky malé molekule aptamerů jsou schopné pronikat do tkáňových bariér a působit na buňky. Aptamery mají neomezenou trvanlivost na rozdíl od protilátek.

Aptamery jsou široce používány jako zachytávači a detekční činidla pro proteinové biomarkery. K zajištění vysoce selektivní reakce by měly aptamery rozeznávat povrch proteinu. Aptamery mají schopnost rozlišit povrch cílových proteinů, dokážou odlišit jednotlivé izoformy a sestřihové varianty proteinu. Identifikace biomarkerů je důležitá pro včasné odhalení nemocí. Detekce biomarkerů je jádrem molekulární diagnostiky, je možné stanovit současně i více biomarkerů, jak kvalitativně, tak i kvantitativně. Biomarkery se následně identifikují metodami hmotnostní spektrometrie.

Novější strategií je kombinované použití protilátky a aptameru, v některých případech vykazuje kombinované použití vyšší účinnost než samotné použití aptameru nebo protilátky. Příkladem je konjugace protilátky a antitrombinového aptameru vážící se na epitopy trombinu. Konjugace zlepšila afinitu a specifitu k trombinu.

K terapeutickým účelům byly vyvinuty aptamery proti širokému spektru onemocnění. Příkladem je aptamer, který specificky rozpoznává mezenchyální kmenové buňky

kostní dřevě a tvoří komplex s mikroRNA, cílený komplex je podroben klinickým studiím a mohl by být použit k terapii onemocnění skeletu.

Aptamery rozeznávají i předem definované bakteriální povrchové antigeny buněk nebo faktory virulence. Studie antibakteriálních aptamerů se zaměřila hlavně na rozpoznávání antigenů *Mycobacterium Tuberculosis*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Escheria Coli*. Specifické aptamery cílí na virové proteiny, např. viru HIV, viru hepatitidy C nebo viru chřipky.

Aptamery mohou být imobilizovány na povrchu senzoru. Rozpoznávacím prvkem je aptamer DNA i RNA. Aptamer je spojený s převodníkem pro převod biologické interakce na čitelné signály. Aptasenzory jsou navrhovány k diagnostickým aplikacím.

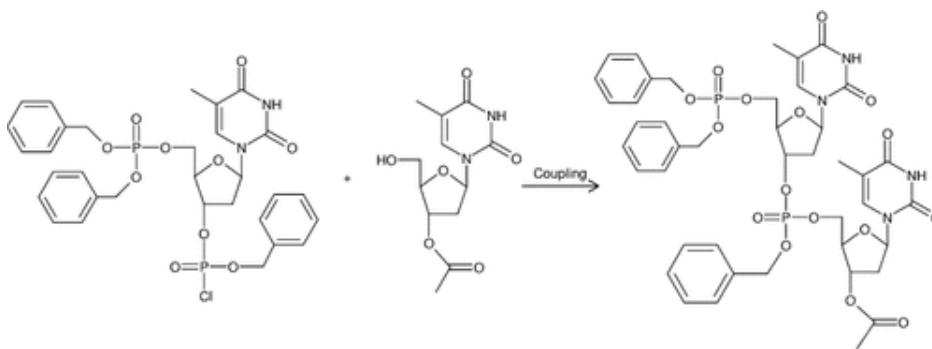
### 3 Technologie přípravy oligonukleotidů

Oligonukleotidy jsou většinou připravovány v řádech nmol (nanomol), takhle malé množství postačí pro většinu biochemických a biologických experimentů. Pro biofyzikální účely jsou připravovány v řádech  $\mu\text{mol}$  (mikromol).

#### 3.1 Historie přípravy oligonukleotidů

##### 3.1.1 Vznik dithymidinu

První chemická syntéza oligonukleotidu byla provedena vědci Michelsonem a Toddem. Připravili 3' benzylofosforylchlorid připojený k thymidinu nesoucí na 5' ochranu. Ten reaguje s 3' chráněným thymidinem za vzniku dinukleotidu. Reakce je zobrazena na obrázku 13.

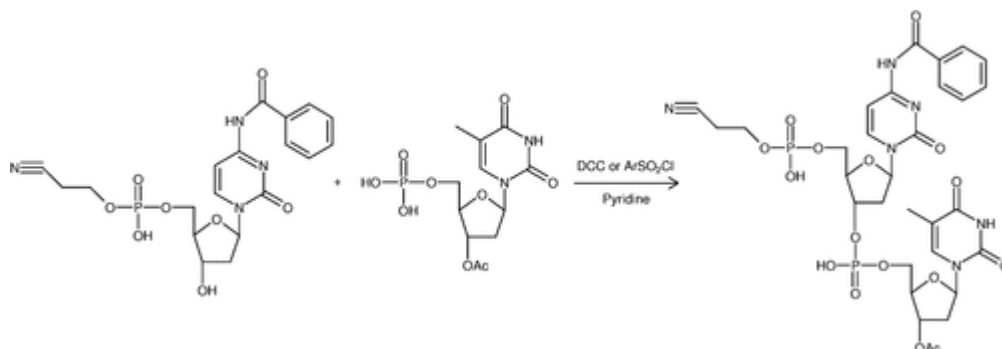


**Obr. 13: Vznik dithymidinu**

Zdroj: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijch.201300032?saml\\_referrer](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijch.201300032?saml_referrer)

### 3.1.2 Fosfodiesterová metoda

Metoda, kterou vyvinul vědec Khoran a jeho tým, je zobrazena na obrázku 14.



**Obr. 14: Syntéza fosfodiesteru**

*Zdroj: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijch.201300032>*

5' chráněný oligonukleotid reaguje s 3' chráněným oligonukleotid-5' fosfomonoesterem za přítomnosti reakčního činidla.

Khoran a jeho tým také vyvinuli protekční činidlo, které se používá dodnes zvané DMT (4,4' dimethoxytrityl), slouží pro ochranu 5' konce.

### 3.1.3 Fosfotriesterová metoda

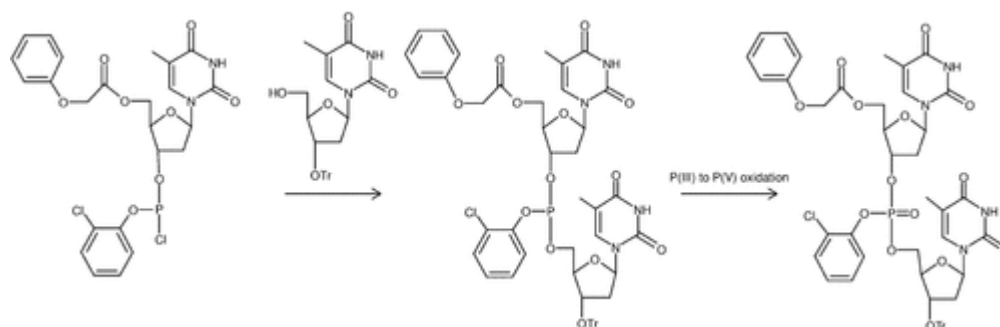
Další významný krok učinili vědci Letsinger a Kornet, kteří zavedli syntézu na pevné fázi využívající cyklické postupné přidávání jednotek, tento postup poté aplikovali na oligonukleotidy. Fosfotriesterová metoda je založená na reakci 5' substituovaného fosfátu s hydroxylovou skupinou druhého oligonukleotidu za přítomnosti reakčního činidla. Jako chránící molekula fosfátového zbytku oligonukleotidů se nejčastěji používala  $\beta$ -kyanoethyllová skupina.

První metoda používaná pro automatizaci. I tak má své nevýhody. Nelze syntetizovat dlouhé oligonukleotidy delší než 20 bází (HOGREFE a kol) a dlouhý čas syntézy.

### 3.1.4 Fosfit-triester oligonukleotidová metoda

Metodu popsal vědec Letsinger a je zobrazena na obrázku 15 a jedná se o vylepšenou triesterovou metodu. Reakce využívá vazebného činidla tvořeného fosforem v oxidačním čísle III, ne V jako je to běžné. Jako v předchozí metodě reaguje 5' substituovaného fosfát oligonukleotidu s hydroxylovou skupinou druhého

oligonukleotidu za přítomnosti reakčního činidla. Metoda oproti předchozí dosáhla zkrácení doby cyklu syntézy, ale z důvodu citlivého meziprojektu přestala být používána.



**Obr. 15: Fosfotriestrová metoda vyvinutá Letsingerem**

*Zdroj: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijch.201300032>*

## 3.2 Syntéza oligonukleotidů na pevné fázi

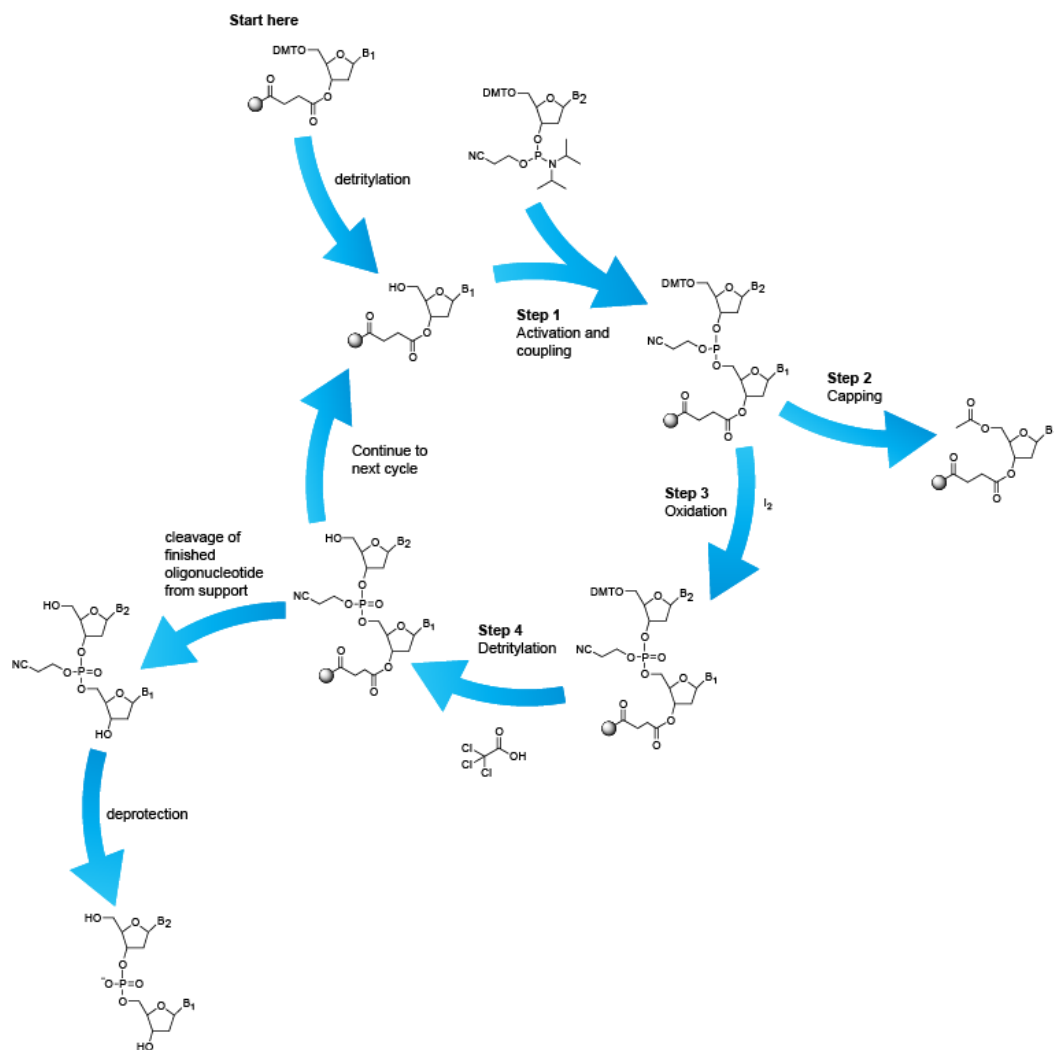
V dnešní době jsou oligonukleotidy připravovány automatizovanými metodami na pevné fázi. Pevná fáze je tvořena nerozpustnými částicemi o předem definovaném průměru. Během syntézy se na ně váže oligonukleotid. Příkladem pevné fáze je sklo se řízenými póry nebo polystyren. Syntéza oligonukleotidů na pevné fázi je také nazývána chemickou syntézou. Tvorba oligoribonukleotidů je méně účinná oproti syntéze oligodeoxyribonukleotidů pomocí chemické syntézy. Mezi výhody metody patří snadná ovladatelnost, účinnost a reprodukovatelnost. I přes tyto výhody je obtížné dosáhnout syntézy dlouhých oligonukleotidů, pro jejich syntézu je vhodnější použití enzymatické metody, popřípadě kombinovat chemickou syntézu s enzymatickou pro vznik oligonukleotidu požadované délky.

### 3.2.1 Fosforamiditová metoda

V dnešní době nejpoužívanější automatizovaná metoda na pevné fázi. Syntetizované oligonukleotidy jsou připojeny na pevný podklad pomocí linkru, což je chemicky čistá látka, která musí odolávat všem činidlům použitých při syntéze oligonukleotidů a zároveň být snadno odstěpitelná na konci syntézy. Linker připojuje 3' konec počátečního oligonukleotidu k pevnému podkladu.

Na počátku 80 let minulého století fosforamiditovou metodu propagovali vědci Marvin a Caruthers.

Syntéza vlákna probíhá ve směru 3'-5' a skládá se z cyklu kroků uvedených na obrázku 16, jednotlivé cykly jsou vysvětleny níže.



**Obr. 16: Syntéza oligonukleotidů fosforamiditovou metodou**

Zdroj: <https://www.atdbio.com/img/articles/phosphoramidite-oligonucleotide-synthesis-cycle-large.png>

### Detritylace (odblokování)

Předem připojený nukleosid na pevný nosič má na 5' konci ochranu, která zabraňuje polymeraci. Jako chránící skupina se používá DMT (4,4'-dimethoxytrityl), molekula chránící skupiny musí být odstraněna, aby mohla začít syntéza oligonukleotidů. Pro odblokování je nutné kyselé prostředí, například se používá kyselina trichloroctová, lze použít i kyselinu dichloroctovou.

## **Aktivace a propojení (krok 1)**

Nukleosid vázaný na nosič je připraven reagovat s další bází. Ta se přidává jako přebytek nukleosidového fosforamiditového monomeru spolu s aktivátorem v rozpouštědle, které zajistí dobré reakční prostředí pro vytěsnění odstupující skupiny fosforamidotu. Dochází k vytvoření vazby mezi kyslíkem 5' konce hydroxylové skupiny navázaného nukleosidu a fosforem fosforamidotu, nově vzniklá molekula se nazývá fosfitriester.

Nukleosidové fosforamidity jsou stabilní a lze je skladovat jako suché pevné látky, aktivními se stávají protonací aktivátorem.

Krok aktivaci a propojení lze také nazývat jako kondenzační reakce.

## **Odstranění nezreagovaných skupin (krok 2)**

Neočekává se, že zreaguje veškeré množství hydroxylových skupin na 5' konci. Pokud by byly hydroxylové skupiny k dispozici pro další reakce a reagovaly by s příchozím fosforamiditem, výsledné nukleotidy by postrádaly jednu bázi a vzniklé oligonukleotidy by nesly nesprávnou genetickou informaci.

Po kondenzační reakci se před dodáním do kolony, kde probíhá syntetizační reakce, smísí dvě činidla, první z nich je acetylační a druhé slouží pro udržení pH. Jedná se o reakční elektrofilní směs, která rychle acetyluje alkoholy a činidlo pro udržení pH, zajišťuje zásadité pH, aby se zabránilo odstranění chránící skupiny (neboli detritylaci nukleosidového fosforamidotu). Acetylace 5'-hydroxylových skupin je učiní inertní vůči následným reakcím.

## **Oxidace (krok 3)**

Fosfitriester vytvořený v kroku 1 s nábojem v oxidačním čísle III je nestabilní vůči kyselému i bazickému pH a musí být oxidován před dalším krokem na stabilnější formu, kterou je fosfor v oxidačním číslem V. Oxidace se může například dosáhnout jódem v přítomnosti pyridinu. Výsledný fosfotriester je tak chráněn před nežádoucími reakcemi fosforu během dalších cyklů syntézy.

Po oxidaci může nastat ještě další krok pro odstranění zbytkové vody z oxidační směsi, aby nedocházelo k inhibici dalších kopulačních reakcí. Přebytková voda reaguje s acetylačním činidlem za vzniku kyseliny octové, která je odplavena.

### **Detritylace (krok 4)**

Z 5' konce řetězce syntetizovaných oligonukleotidů musí být odstraněna chránící skupina, aby primární hydroxylová skupina mohla reagovat s dalším nukleotidovým fosforamiditem. Detritylace se může provést stejným činidlem jako počáteční detritylace, tedy kyselinou trichloroctovou. Produkt vzniklý po odstranění DMT (chránící skupiny) je schopen absorbovat určitou intenzitu záření ve viditelné oblasti. Intenzita absorbance se používá k zjištění účinnosti vazby. Většinou je účinnost vazby zjišťována pro každý cyklus.

### **Opakování cyklu**

Cyklus kroků 1-4 se opakuje pro každou bázi do vzniku požadovaných oligonukleotidů.

### **3.2.2 Odštěpení od pevné fáze**

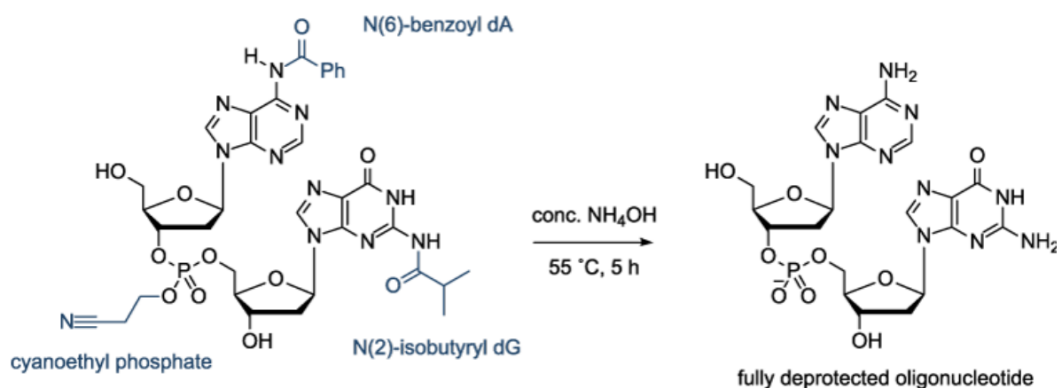
Na konci syntézy se oligonukleotidy odštěpí od pevné fáze a linkru vázící oligonukleotid pomocí koncentrovaného hydroxidu amonného. Štěpná reakce se nejčastěji provádí automaticky na syntetizátorech, lze provést i ručně a to tak, že se sloupec oligonukleotidů vyjme ze syntetizátoru a promyje roztokem obsahující hydroxid amonný.

### **3.2.3 Deprotekce bází a fosfátových skupin oligonukleotidů**

Po odštěpení se roztok oligonukleotidu v koncentrovaném roztoku hydroxidu amonném zahřívá pro odstranění chránících skupin z bází a fosfátů.

Báze thyminu nevyžadují ochrannou skupinu, heterocyklické báze jako adenin, cytosin a guanin potřebují, neboť obsahují exocyklické báze. Reakce je zobrazena na obrázku 17, kde adenin je chráněn N(6) – benzoylem a guanin je chráněn N(2) – isobutyrylem. Vodný roztok se poté odpaří, produktem reakce je oligonukleotid bez chránících skupin.



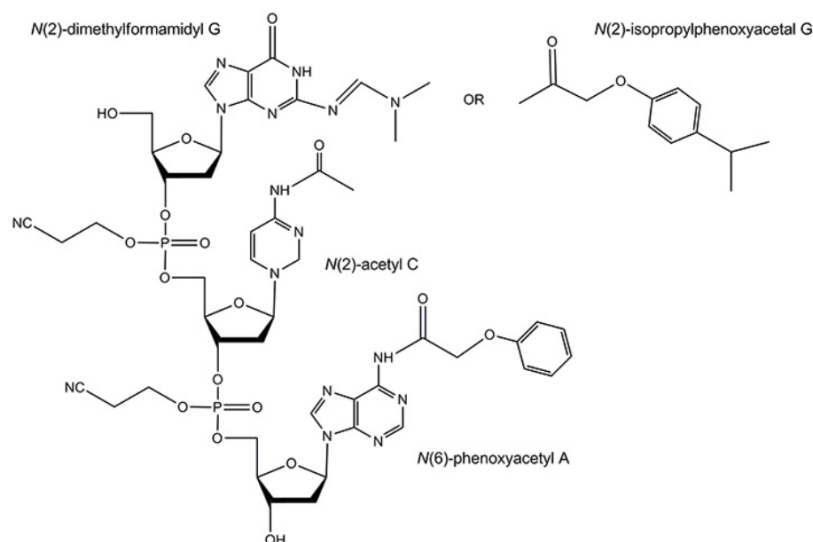


**Obr. 17: Deprotekce oligonukleotidů**

Zdroj: <https://www.atdbio.com/img/articles/oligonucleotide-deprotection-large.png>

<https://www.atdbio.com/nucleic-acids-book>

Exocyklické aminoskupiny adeninu a cytosinu jsou chráněny benzoylovými skupinami. Chránící skupina guaninu je isobutyryl, která je oproti benzoylové skupině odolnější vůči hydrolyze. U modifikovaných oligonukleotidů, citlivější než nemodifikované, zahřívání může vést k jejich degradaci. Proto se u modifikovaných oligonukleotidů používá labilnější chránící skupiny, ty jsou odštěpitelné za mírnějších podmínek, než isobutyryl. Příkladem labilnější chránící skupiny guaninu je dimethylformamidyl (chemický vzorec je uveden na obrázku 18). Některé modifikované oligonukleotidy jsou citlivé i na amoniak a musí se u nich používat ochranná sada „ultramild“, lze je odstranit methanolvým roztokem uhličitany draselného, vodným amoniakem anebo vodným methylaminem při laboratorní teplotě. Příklady ultramild chránících skupin jsou uvedeny na obrázku 18, N(2) – isopropylfenoxyacetát chránící guanin, N(2) acetyl chránící cytosin a N(6) – fenoxyacetyl chránící adenin.



**Obr. 18: Chránící skupiny modifikovaných oligonukleotidů**

Zdroj: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/dna-oligonucleotide-synthesis.html>

Fosfátové skupiny jsou během syntézy chráněny kyanoethylovými skupinami, jsou zobrazeny na obrázku 17. Vedlejším produktem při deprotekcí fosfátových skupin je akrylonitril, který může vytvářet adukty s bázemi. Pokud by byly kyanoethylové adukty potíží, tak se nejprve chránící skupina odstraní roztokem slabé báze v organickém rozpouštědle. Výsledkem je oligonukleotid vázaný na pevnou fázi bez chránících kyanoethylových skupin.

### 3.2.4 Purifikace

Po odstranění chránících skupin jsou oligonukleotidy připraveny k čištění (purifikaci). Vzniklý řetězec oligonukleotidů po syntéze obsahuje požadované nukleotidy, ale také akumulované nečistoty z jednotlivých reakcí. Mezi nečistoty patří sekvence, které obsahují nesprávně modifikované báze, syntéza takových sekvencí mohla při syntéze selhat. Tyto neúspěšné sekvence by pak mohly způsobovat nežádoucí reakce v metodách, kde budou syntetizované oligonukleotidy použity. Dále mezi nečistoty patří oligonukleotidy, které se během syntézy nerozšířily, tedy syntéza vedla ke vzniku zkrácených oligonukleotidů. Nezanedbatelnými nečistotami jsou také malé molekuly vzniklé jako vedlejší produkty kroků syntézy oligonukleotidů odštěpení od pevné fáze a deprotekcí chránících skupin.

Výše uvedené důvody jsou odpovědí, proč vzniklé oligonukleotidy potřebují purifikovat, v následujících podkapitolách jsou uvedeny metody purifikace.

### **3.2.5 Odsolování**

Proces odstraňování nepotřebných organických molekul se běžně označuje jako odsolování. Metoda lze provést gelovou filtrací, odstraňuje také soli z oligonukleotidů po čištění metodou HPLC. Gelová filtrace neodstraňuje zkrácené oligonukleotidy. Odsolené oligonukleotidy nezaručují vysokou čistotu i přesto je lze použít v některých aplikacích.

### **3.2.6 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)**

Základním principem PAGE je separace molekul na základě velikosti. PAGE je doporučována, když je požadována vysoká čistota a pro delší sekvence oligonukleotidů. Nedostatky PAGE spočívají v časové a pracné náročnosti. Po PAGE následují další procesy k extrakci vzorku z gelu a odsolování, což vede ke snížení výtěžku syntézy oligonukleotidů.

### **3.2.7 Purifikace chromatografickými postupy**

Základním principem chromatografie je separace látek mezi navzájem dvěma nemísitelnými fázemi (stacionární a mobilní fáze). K analýze a čištění oligonukleotidů mohou být použity metody kapalinové chromatografie, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) na reverzní fázích, ionexová HPLC nebo iontové párová HPLC.

#### **HPLC na reverzích fázích**

Oligonukleotidy a kontaminující látky jsou separovány na základě rozdílů v hydrofobicitě. HPLC na reverzních fázích je vhodná k purifikaci krátkých oligonukleotidů (délka pod 40 bází na délku (Brown a Brown, 2005). Čím delší oligonukleotid je, tím je těžší oddělit sekvence selhání podobné délky.

## **Ionexová HPLC**

Ionexová (iontoměničová) HPLC se užívá pro separaci nabitých molekul. Oligonukleotidy jsou polyaniony, nesou tedy záporný náboj. Delší, silněji nabitě oligonukleotidy se eluují později než ty kratší.

## **Iontově párová HPLC na reverzní fázi (IP-RP-HPLC)**

Separace záleží jak na hydrofobicitě, tak i na náboji, neboť se do mobilní fáze přidává látka, která interaguje se záporně nabitými molekulami za účelem dosažení lepšího rozlišení. Výhodou je spojení s metodou hmotnostní spektrometrie, která umožňuje identifikovat každý jednotlivý pík (odpovídá jednotlivé složce ve směsi oligonukleotidů). IP-RP-HPLC v posledních letech je nejvhodnější k separaci a čištění oligonukleotidů.

## **3.3 Enzymatická syntéza**

Vhodná metoda pro ligaci krátkých oligonukleotidů pro syntézu dlouhých deoxynukleových a ribonukleových nukleotidů. Enzymatická syntéza byla vyvinuta souběžně s chemickou fosforamiditovou syntézou.

### **3.3.1 Počátky enzymatické syntézy**

Prvním krokem k enzymatické syntéze bylo zjištění, že pankreatická RNáza je schopná generovat internukleotidovou vazbu mezi 2',3' cyklickým fosfátem a nechráněným nukleosidem. Tato syntéza byla využita pro tvorbu krátkých oligoribonukleotidů pro studie molekulární biologie.

Významný průlom nastal po izolaci a charakterizaci fosforylázy (PNP). Tento enzym katalyzuje tvorbu oligoribonukleotidů i polyribonukleotidů z nukleosidových difosfátů. PNP umožňuje použít 2-deoxyribonukleosid-5'-difosfáty jako substrát, tím je PNP schopna syntetizovat oligodeoxyribonukleotidy.

### **3.3.2 Enzymy používané dnes**

Reakce jsou uskutečněny DNA nebo RNA ligázami, které katalyzují intermolekulární ligaci 5' a 3' konců oligonukleotidů tvorbou fosfodiesterové vazby.

Substráty DNA ligázy jsou dva oligodeoxynukleotidy, jeden nesoucí 5' fosforylovou donorovou skupinu a druhý nesoucí volný 3' hydroxylový akceptor.

RNA ligáza katalyzuje syntézu fosfodiesterové vazby mezi 5' fosforylovým donorem a volnou 3' hydroxylovou akceptorovou skupinou dvou jednovláknových oligoribonukleotidů. RNA ligáza umožňuje ligaci různých oligonukleotidových substrátů. Tento enzym poskytuje zavedení modifikací v oligoribonukleotidech delších, než je možné provést fosforamiditovou chemickou metodou.

### **3.4 Modifikace oligonukleotidů**

Syntéza různých analogů oligonukleotidů, cílem je dosažení požadovaných funkcí. I malé úpravy mohou vést k velkým rozdílům ve výtěžku a čistotě hotového oligonukleotidu. Při modifikacích je kladen důraz na to, aby modifikované oligonukleotidy vzájemně neinteragovaly. Syntetické oligonukleotidy mohou obsahovat modifikace fosfátové páteře, purinových a pyrimidinových bází, pentóz a zakončení oligonukleotidu na 3' nebo 5' konci.

Příprava modifikovaného oligonukleotidu je časově náročná a zahrnuje syntézu modifikovaného stavebního bloku a syntézu modifikovaného oligonukleotidu, proto je výhodnější použít postsyntetickou modifikaci oligonukleotidů.

Bylo uskutečněno řada modifikací, v následujících podkapitolách uvádím příklady některých z nich.

#### **3.4.1 Modifikace páteře**

Modifikací uvnitř páteře se může modulovat aktivace molekuly a rezistence na nukleázy.

Uvedeným příkladem je vznik fosforothioátů (PS). PS vazba vzniká výměnou jednoho nebo dvou atomů kyslíku v oligonukleotidovém fosfátovém řetězci s atomem síry. Oligonukleotidové PS jsou připravovány chemickou syntézou s použitím sirného činidla v oxidačním kroku anebo dithioaptamery DNA i RNA lze syntetizovat chemickou metodou s použitím thiofosforamiditu. PS jsou připravovány i enzymatickou inkorporací a amplifikovány pomocí PCR.

PS modifikace umožňuje identifikaci vazebných míst kov-ion v biologických systémech.

Výhodou PS modifikace je vyšší stabilita vůči nukleázám, čehož se využívá při práci s buněčnými kulturami.

PS modifikace zvyšuje biologickou dostupnost a absorpci buněk, předpokládaným důvodem je nižší ochota atomu síry interagovat s vodou než atom kyslíku. Vlivem nižší hydrofobicity PS modifikované oligonukleotidy lépe interagují s bílkovinami v séru.

Negativní náboj fosfátové skupiny je zachován. Centrum fosforu u monothiofosfátových oligonukleotidů se zabudováním síry stává chirální. Chiralita centra fosforu umožňuje určit stereospecifitu a stereochemický průběh reakcí probíhajících na fosforu. Chiralita centra přináší komplikace s diastromerními směsí, dithioátové oligonukleotidy jsou již achirální kolem dithiofosfátového centra.

Modifikaci PS lze vidět v siRNA („interferující RNA“) ovlivňující expresi určitého genu. Modifikovány jsou obvykle konce řetězce siRNA, modifikací je dosaženo vyšší odolnosti vůči nukleázám, aniž by docházelo ke snížení aktivity siRNA.

### 3.4.2 Modifikace pentózy

Nejběžnější je modifikace polohy 2' ribózy. Modifikace polohy 2' zvyšují rezistenci a stabilitu funkčních oligonukleotidů.

#### LNA

Název označuje přemostěnou nukleovou kyselinu, také uzamčenou nukleovou kyselinu. Pentóza je modifikována můstkem spojující kyslík 2' a 4'.

Předpokládá se, že konformační omezení kruhu a objemnost můstkové skupiny zlepší hybridizační schopnost oligonukleotidů s nukleovými kyselinami a zvýší rezistenci na nukleázy.

Příkladem LNA oligonukleotidu je 2'-močovina-LNA derivát. Byl syntetizován thymidin fosforamidit s modifikací 2'-N.pentafluorfenoxycarbonyl-2'-amino-LNA jako vhodný stavební kámen pro syntézu oligonukleotidů a zároveň dobrý prekurzor pro konstrukci 2'-amino- LNA analogů. Prekurzor je působením různých aminů převeden požadovaný produkt, v tomto příkladě působením methylaminu na methylmočovinu (Yamashita 2020). Komplexy 2'-močoviny LNA mohou stabilizovat komplexy nukleové kyseliny.

## 4 Ultramery

Ultramery jsou jednovláknové syntetické oligonukleotidy o délce až 200 bází (LeProust a kol 2010). Metody, používané k syntéze, jsou natolik přesné, že jsou ultramerové oligonukleotidy vhodné pro náročné aplikace jako je klonování nebo konstrukce genů.

### 4.1 Syntéza

Syntéza ultramerů se provádí především různými druhy metod fosforamiditové chemie, pomocí sloupcových syntetizátorů nebo syntetizátorů na bázi mikročipů. Fosforamiditová chemie je popsána ve čtvrté kapitole.

#### 4.1.1 Syntéza na mikročipech

Původně fosforamiditová metoda probíhající na pevných površích byla upravena pro in situ syntézu na mikročipech. Syntézy na mikročipech bylo dosaženo prostorovým řízením jednoho z kroků syntézního cyklu. Mezi hlavní metody používané k dosažení prostorové kontroly patří kontrola propojovací kroku pomocí inkoustového tisku vyvinutou společností Agilent Technologies. Pro syntézu dlouhých oligonukleotidů je nutné minimalizovat nejčastější vedlejší reakci, depurinaci. Depurinace brání prodlužování řetězce. Úspěšná syntéza dlouhých sekvencí vyžaduje téměř 100% výtěžek postupné vazby.

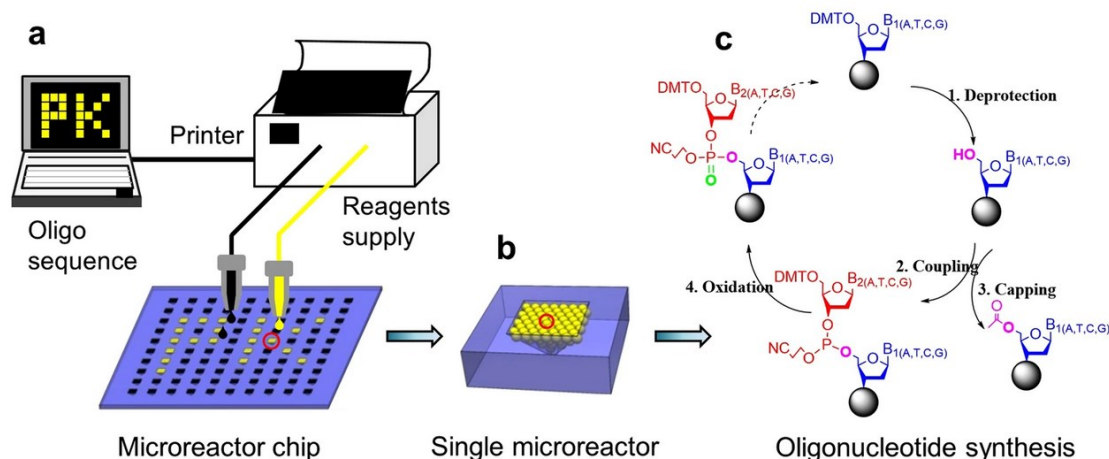
#### Metoda injekt microarray

Syntéza je založena na dvou základních technologiích. Inkoustový tisk je prováděn v bezvodé tiskové komoře umožňující prostorové řízení kroku vazby fosforamiditů. Bezvodá komora zajišťuje udržení vlhkosti na minimu, čímž je dosaženo efektivnějšího průběhu vazebné reakce. První reakce fosforamiditové chemie je prováděna v tiskové komoře pro zajištění správného množství aktivátoru a fosforamiditového monomeru do příslušného místa na nosiči. Pro detritylační a oxidační reakce je používán průtokový reaktor. Činidla do průtokového reaktoru jsou přiváděny dvěma porty. Během typického syntézního cyklu se činidla do průtokové buňky přivádějí spodním portem, dokud není buňka naplněna. Činidla jsou ponechána po určitou dobu v průtokové komoře, poté se vypustí a následuje promytí. Jejich přívod a odtok řídí elektromagnetické ventily.

V procesu řízené depurinace je detritylační roztok přiváděný horním otvorem po ustálení vytěsněn pomocí oxidačního roztoku přiváděného spodním otvorem, kterým je i vypuštěn.

#### 4.1.2 Syntetizátor založený na mikroreaktorovém čipu a inkoustovém tisku

Popisovaný syntetizátor (obrázek 19) byl odvozen od mikroreaktorového čipu a inkoustové tiskárny. Čip navzájem spojuje řadu mikroreaktorů používaných k syntéze.



**Obr. 19: Schéma syntetizátoru odvozeného od mikroreaktorového čipu a inkoustového. tisku**

Zdroj: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41519-0/figures/1>

Mikroreaktorový čip využívaný pro syntézu je vyroben na křemíkovém plátku. Křemíkové kuličky jsou sestaveny tak, aby se zvětšila plocha povrchu, na kterém dochází k syntéze oligonukleotidů. Syntéza na křemíkových kuličkách probíhá podle fosforamiditového cyklu syntézy. Vazba kuliček se stěnou reaktoru jsou natolik silné, že design jejich uspořádání je schopen odolávat proplachovacím procesům mezi reakcemi při syntéze. Mezi křemíkovými kuličkami jsou sítě mikrokanálek, kterými je odváděn vzniklý odpad po každé reakci syntézy oligonukleotidů.

K dodávání chemických činidel používaných při syntéze se používá mechanismus inkoustové tiskárny. Systém inkoustové tiskárny automaticky a přesně dodává činidla do mikroreaktorů. Skládá se z kazet obsahující chemická činidla, která jsou dodávána do čipu mikroreaktoru uloženém pod tryskami tiskárny. Další součástí je systém sbírající odpad. Syntetizátor obsahuje atmosféru vysušenou dusíkem pro odstranění



kyslíku. Polohu tisku činidel na substrát lze upravit a na stejnou pozici lze vytisknout různá činidla. Substrát je imobilizován na teflonovém rámu.

Syntéza zahrnuje povrchovou úpravu křemíkových kuliček pro imobilizaci na povrch mikroreaktoru, fosforamiditovou syntézu oligonukleotidů, sběr produktů a detekci produktů. Používané chemikálie jsou následující, deblokovací činidlo je kyselina trichloroctová v dichlormethanu, uzavírací činidlo je směs dvou činidel, první je směs kyseliny octové, pyridinu a tetrahydrofolátu a druhé uzavírací činidlo je N-methylimidazol v acetonitrilu. Oxidační činidlem je jód. Promývací činidlo je acetonitril. Pro odštěpení produktu z povrchu křemíkových kuliček je použita směs vodného hydroxidu amonného a vodného methylaminu (Li a kol. 2019).

Do mikroreaktoru je předem natištěn cílový monomer fosforamiditu vázající se na aktivní hydroxylové vazby.

#### **4.1.3 Technologie založené na elektrochemicky modifikovaných elektrodách – společnost CustomArray**

Systém syntézy vychází opět z fosforamiditové chemie, postup je vylepšen o postup deprotektce. K deblokaci ochranné skupiny DMT se používá fotochemická generovaná kyselina.

Pevným nosičem pro syntézu je soustava elektrochemicky modifikovaných elektrod. Soustava se skládá z polovodičového čipu z křemíku s platinovými elektrodami s překryvnou porézní vrstvou s dostupnými hydroxylovými skupinami tvořící přípojná místa pro syntetickou práci.

Čip je umístěn do syntetizátoru naprogramovaného na standardní syntézu. Kyselá deblokační činidlo bylo nahrazeno elektrochemickou deblokační směsí. Činidlo generované elektrodou difunduje do porézní vrstvy, nadměrná difúze brání přítomnost pufru v okolním roztoku. V blízkosti elektrody je pufr přetížen, což umožňuje reakci činidla se substrátem vázající se na porézní vrstvu. Od elektrody je koncentrace difundujícího činidla nedostatečná k překonání koncentrace pufru a k reakci nedochází. Ostatní činidla jsou stejná jako při běžné fosforamiditové chemii.

## 4.2 Enzymatická syntéza

### 4.2.1 Terminální deoxynukleotidyltransferáza (TdT)

Enzym přidávající neselektivně dNTP na 3' jednořetězcové ssDNA. TdT se vyznačuje nízkou substrátovou specifitou pro nukleotidy. TdT je kompatibilní s různě modifikovanými nukleotidy, platí pro ni snadná následná purifikace produktu. Enzym působí jako katalyzátor pro přidávání více bází za cyklus. Je komplikované najít vhodný povrch pro syntézu, a proto TdT je prozatím slibným enzymem budoucí syntézy.

### 4.2.2 Asymetrická polymerázová řetězová reakce

V reakčním systému jsou dva amplifikační primery v nestejných koncentracích. K vytvoření produktu se používají dvě fáze amplifikace. První fáze je exponenciální amplifikace používaná k produkci templátu dsDNA. Druhá fáze je lineární amplifikace používaná k produkci produktu ssDNA.

Asymetrická polymerázová řetězová reakce je náchylná k nespecifické amplifikaci. Vysoce čistý produkt lze získat kombinací reakce s gelovou purifikací nebo enzymatickou degradací zbytkových řetězců.

### 4.2.3 Reakce výměny primerů

Vytváření ssDNA s vlastními sekvencemi DNA za pomoci enzymu polymerázy nahrazující vlákna. Reakce začíná rozpoznáním a navázáním primeru s nezávislou a přizpůsobenou sekvencí na jeho komplementární sekvenci na 3' konci katalytické vlásečkové struktury. Vlasečka obsahuje stop sekvenci zastavující enzymem polymerázou prodlužovací reakci. Nově prodloužený primer poté spouští další prodlužování v kaskádě reakcí. Aby syntéza mohla proběhnout, musí být předem navržené sady vláseček a odpovídající primer. Reakce výměny primerů je omezena na délku 60 bází (Hao a kol. 2020):

## 4.3 Syntéza na bázi bakterií

Bakteriální výroba využívá bakteriofágy (vir infikující bakterie) s rychle rostoucími buňkami bakterie jako hostiteli.

Příkladem syntézy je výroba jednovláknové fágové DNA. Proces syntézy využívá bakteriofágy s *Escheria Coli* jako hostitele. Bakteriofág se skládá z kruhového ssDNA genomu sestaveného do proteinového pláště. Potomci fágových částic jsou sestavovány během sekrece intracelulárně amplifikované virové ssDNA, aniž by došlo k lýze hostitelské buňky. Syntéza probíhá v bioreaktoru s míchanou nádrží, kde je kontrolován přísun živin, množství rozpuštěného kyslíku a pH. Rychlost růstu buněk je ovlivňována prostřednictvím řízeného krmení. Bakterie je infikována bakteriofágem během fáze krmení živinami, k reprodukovatelným výsledkům je nutné udržovat konstantní dobu a násobnost infekce bakteriofágem. Po oddělení hostitelských buněk a extracelulárních bakteriofágů na konci každého procesu krmení se fágy vysráží pomocí polyethylenglykolu (Kick a kol. 2015). SsDNA je čištěno etanolem (Kick a kol. 2015) a proteinový plášť je chemicky lyzován.

## 5 Syntéza genů

Označuje syntézu dlouhých úseků přirozených i nepřirozených sekvencí nukleových kyselin. Malé sady oligonukleotidů slouží jako substrát pro konstrukci větších syntetických fragmentů. Geny mohou mít délku od stovek až několik tisíc párů bází.

Základními kroky syntézy genů je optimalizace sekvence, návrh oligonukleotidů a jejich následná syntéza. Poté sestavení genu, ověření sekvence a oprava chyb.

### 5.1 Polymerázová cyklická montáž (PCA)

Technika umožňuje vytvořit gen o délce několik set párů bází až po mnoha kilobázových párů (TerMaat a kol. 2009).

Tradiční PCA se skládá ze dvou reakcí. V první reakci je sestavován polymerázový řetězec a poté následuje druhá reakce, kdy je polymerázový řetězec amplifikován pomocí PCR. Požadovaná genová sekvence je sestavována spojováním komplementárních úseků krátkých úseků oligonukleotidů.

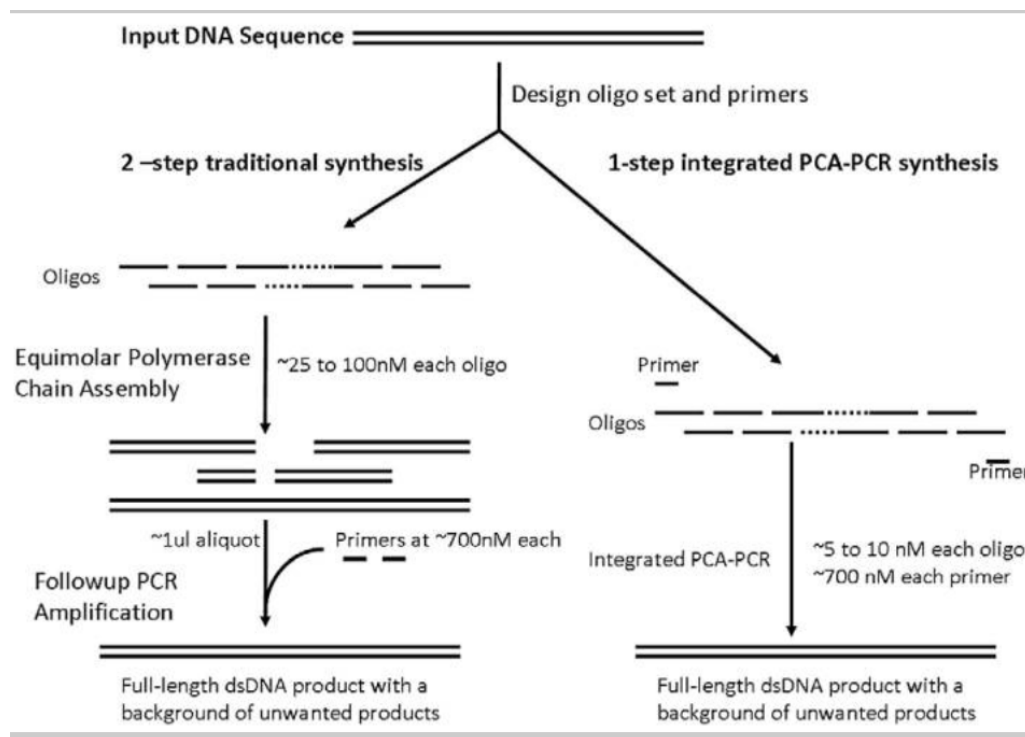
Během PCA je směs oligonukleotidů podrobena teplotním cyklům jako při amplifikaci PCR. Sousední oligonukleotidy, vzájemně komplementární, se během reakce annealing hybridizují. Oligonukleotidy jsou poté za účasti enzymu polymerázy prodlouženy. Nově vytvořené dvouvláknové vlákno je denaturováno pro vznik jednovláknového. Cykly se opakují pro vytvoření vlákna plné délky. Po PCA následuje PCR amplifikace genu. Při PCR reakci se použije část produktu PCA jako primer PCR. Proces není bez chyb, polymeráza je účinná při prodlužování od 3' konce. Několik hybridizací, ke kterým dochází, jsou neproduktivní.

Za použití vysokorychlostního termocykleru se řetězce oligonukleotidů vzájemně hybridizují, poté se podrobí extenzi řetězce za účasti polymerázy při jediné reakci. Po opakovaném termocyklování je získána požadovaná sekvence plné délky. Současná PCA a primerová amplifikace snižuje množství reagensů a čas, také snižuje počet chyb díky menšímu počtu tepelných cyklů.

Požadovaný úsek genu je nejprve navržen, obvykle počítačovým programem. Příklad termocykleru je termocykler (PCRJet) s vysokou rychlostí přenosu tepla, a to tak, ohřátý nebo stlačený vzduch je tlačěn přes skleněné kapiláry. Celková doba procesu je 10-20 minut (El-Sagheer a Brown 2017) pro současnou PCA a PCR. Užívaný enzym

je termostabilní polymeráza KOD (TerMaat a kol. 2009), která je schopná rychlé extenze a opravy chyb v párech bází. Doba annealingu je přibližně 10 sekund a počet cyklů je 40 (TerMaat a kol. 2009).

Na obrázku 20 je zobrazeno schéma syntézy. Vlevo je dvoukroková reakce, PCA a PCR. Vpravo je zobrazena jednokroková reakce PCA a PCR.



**Obr. 20: Schéma syntézy**

Zdroj: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0167701209002991-gr1.jpg>

## 5.2 Syntéza genů ligací

Syntéza je omezena na menší geny oproti PCA, neboť fragmentované oligonukleotidy musí pokrývat sekvenci sense a antisense vlákna. Oproti předchozí metodě odstraňuje potřebu polymerázy vnášející chyby při prodlužování vlákna.

Syntéza probíhá na pevné fázi, vzniklé fragmenty jsou poté přečištěny a ligovány. Oligonukleotidy pokrývají celý gen na obou vláknech. Sousední oligonukleotidy nejsou spojeny fosfodiesterovou vazbou, jsou drženy pohromadě pomocí komplementární šablony („splint“) a poté enzymaticky ligovány.

Gen může být syntetizován hromadně smícháním složených oligonukleotidů a přidáním enzymu spojující sousední oligonukleotidy, ligázy. Metoda se nazývá „shotgun“ ligace.

Účinnější je ligázová řetězová reakce (LCR), má schopnost syntetizovat delší geny. Metoda LCR je založená na aktivitě enzymu DNA ligázy sloužící ke spojení překrývajících se konců syntetizovaných oligonukleotidů. Počáteční oligonukleotid je imobilizován na pevném nosiči. LCR využívá čtyři oligonukleotidy jako primery. Na jednom templátovém vlákně se párují dva oligonukleotidy v těsné blízkosti svými komplementárními sekvencemi. Další dva primery na druhém templátovém vlákně se propojují podobným způsobem. DNA ligáza poté uzavře zářez mezi sousedními primery za předpokladu, že primerové báze v místě spoje odpovídají navrženému cíli. Pro každé templátové vlákno vzniká jeden úsek. Ligované produkty slouží jako templát pro opakující se cykly annealingu a ligace, dokud se nesestaví požadovaný gen. Ligáza vyžaduje 5' fosforylované oligonukleotidy.

Ligaci lze provádět i chemicky. Chemická ligace umožňuje syntetizovat geny s modifikovanými cukry a neomezuje se jen na fosfodiesterovou páteř. Lze ji provádět za podmínek, za kterých by byly ligázové enzymy nefunkční. Fosforamiditová ligace pro syntézu genů byla poprvé prokázána u syntézy genu pro zelený fluorescenční protein o délce 762 párů bazí (El-Sagheer a Brown 2017). Reagují 3'-amino modifikované oligonukleotidy s 5'-fosforylovanými partnerskými řetězci. Nejprve je syntetizováno vlákno s fosforamiditovou vazbou, sousední vlákna jsou spojena se splintem. Ligační reakce pro získání delšího vlákna probíhá v pufru chloridu sodného v přítomnosti spojovacího činidla.

### **5.3 Metoda genové syntézy spojená s klonováním**

Klonování je tvorba identických úseků připravených mnohonásobným množením požadovaných úseků s klonovacím vektorem. Klonovací vektory jsou tvořené sekvencemi nukleových kyselin. Nejčastěji jsou kruhové, pro aplikace genové syntézy je nutné je linearizovat. Jsou schopné replikace a tvorby více kopií požadovaného úseku. V metodách popsaných níže jsou použity plazmidové vektory jako nositele zájmového fragmentu, který se vkládá do bakterie nebo kvasinky.

#### **5.3.1 Jednokrokové klonování nezávislé na sekvenci a ligaci (SLIC)**

Klonování se dosahuje přímou bakteriální transformací po smíchání jakéhokoli linearizovaného vektoru, insertu připraveného pomocí PCR a DNA polymerázy.

Metoda je založena na exonukleázové aktivitě enzymu DNA polymerázy prodlužovat vlákno ve směru 3'-5'. Je možné sestavit více překrývajících se fragmentů současně.

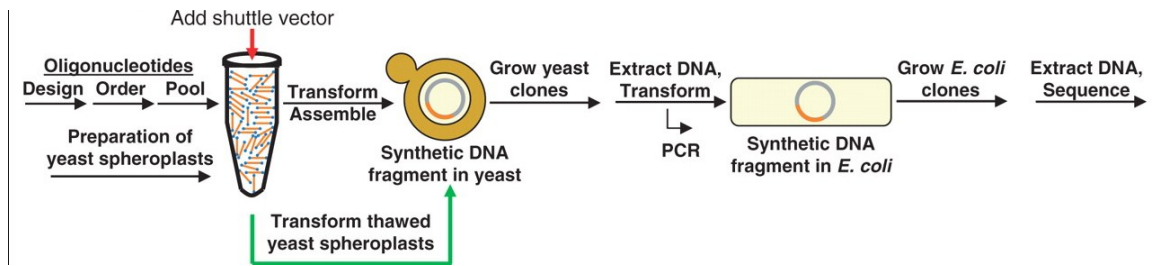
Nejprve se připraví vektor, který je potřeba linearizovat, a to štěpením restrikcími enzymy nebo inverzní PCR. Dále se připraví insert (inserty) pomocí PCR společně s primery nebo delší extenzí homologickou s každým koncem linearizovaného vektoru.

Vektor a insert (inserty) se smíchají a inkubují s DNA polymerázou pro vytvoření převisů na 5'. Poté se reakční směs umístí na led k zastavení reakce zprostředkované polymerázou a také k annealigu jednořetězcového vlákna. Následuje transformace (přenos plazmidového vektoru) buňky *Escheria Coli* přímo vzniklým jednořetězcovým vláknem. Zesílené vlákno se změní na rekombinantní DNA (sekvence nukleových kyselin vytvořených spojením požadovaného úseku s klonovacím vektorem) prostřednictvím homologní rekombinace (začlenění DNA do bakteriálního genomu díky podobné nukleotidové sekvenci). V *Escherii Coli* je rekombinantní DNA amplifikována.

### 5.3.2 Jednostupňová montáž z překrývajících se oligonukleotidů

Nejprve jsou navrženy oligonukleotidy pro sestavení, ty jsou zabudovány do „shuttle“ vektoru v jádře kvasinkové buňky. Pro sestavení dlouhých fragmentů DNA je výhodné použít „shuttle“ vektor z kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* a bakterie *Escheria Coli*. Vektor je výhodný pro kombinaci schopnosti *Sacharomyces cerevisiae* jako organismu schopného přijímat a rekombinovat fragmenty DNA. Tyto fragmenty DNA se během transformace kvasinek začleňují do kvasinkových chromozomů v jádře prostřednictvím homologní rekombinace a konce transformované DNA reagují s homologními chromozomálními sekvencemi. *Escheria Coli* je využita pro schopnost amplifikace produktu. „Shuttle“ vektor tedy zprostředkovává homologní rekombinační reakci, replikaci (zdvojení) a amplifikaci požadovaného fragmentu.

Kolonie kvasinek se nechají růst, fragment se z nich poté extrahuje a prodlouží pomocí PCR, přenese do *Escheria Coli*, kolonie bakterie se nechá opět růst a poté se fragment extrahuje. Stručný popis postupu charakterizuje obrázek 21.



**Obr. 21: Schéma postupu metody**

Zdroj: <https://academic.oup.com/view-large/figure/82572385/gkp687f1.jpeg>

V jednostupňové montáži z překrývajících se oligonukleotidů je kvasinka schopná sestavit ds fragment z překrývajících jednořetězcových oligonukleotidů.



## **ZÁVĚR**

Bakalářská práce byla vypracována na téma syntetická biologie a její význam pro molekulární diagnostiku. První část práce obsahuje charakteristiku chemické struktury oligonukleotidů, stručně byl popsán metabolismus oligonukleotidů v organismu. Význam v buňce byl věnován zejména jejich funkci jako stavební kameny nukleových kyselin. Oligonukleotidy mají široký okruh využití v molekulární diagnostice, a tom pojednává další část práce. Zaměřila jsem se zejména na využití jako komplementární sekvence k cílovým molekulám. V další části byl popsán postup syntézy oligonukleotidů nejčastější syntetizační metodou. V této části jsou také zahrnuty počátky jejich syntézy. Poslední část je věnována ukázkám metod, kterými mohou být syntetizovány ultramery a geny. Z přehledu metod a technik je zřejmé, že dochází k vývoji biotechnologickým automatizovaným metodám, které vedou k menší spotřebě reagensů, vzorků a také k celkovému snížení času analýz.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
AMP	adenosinmonofosfát
AS-PCR	alelově specifická polymerázová řetězová reakce
ATP	adenosintrifosfát
C	cytosin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CTP	cytidintrifosfát
dAMP	deoxyadenosinmonofosfát
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
ddNTP	dideoxynukleotidy
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DMT	4,4'-dimethoxytrityl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfáty
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfáty
dNTPs	směs deoxyribonukleotidtrifosfáty
dsDNA	dvouřetězová deoxyribonukleová kyselina
dTTP	deoxythymintrifosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
G	guanin
GTP	guanosintrifosfát
HPCL	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP-RP-HPLC	Iontově párovaná HPLC na reverzní fázi
LCR	Ligázová řetězová reakce
LCR	ligázová řetězová reakce
LNA	přemost'ující nukleová kyselina
mBAND	metoda mnohobarevného provedení
mFISH	mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace
miRNA	microRNA
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina

NAD	nikotinadenindinukleotid
NADP	nikotinadenindinukleotidfosfát
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCA	Polymerázová cyklická montáž
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNP	fosforylázy
PS	Fosforothioáty
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SiRNA	interferující ribonukleová kyselina
SLIC	Jednokrokové klonování nezávislé na sekvenci a ligaci
SMRT	single molecule real-time
ssDNA	jednořetězová deoxyribonukleová kyselina
T	thymin
TdT	terminální deoxynukleotidtransferáza
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
U	uracil
UTP	uridintrifosfát

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADEL a GIBRIEL. Advances in ligase chain reaction and ligation-based amplifications for genotyping assays: Detection and applications, Mutation Research/Reviews in Mutation Research. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2017, **773**, 66-90 [cit. 2021-7-10]. ISSN 1383-5742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.001>

BERÁNEK. *Molekulární genetiky pro bioanalytiky*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.

BROWN a BROWN. *Nucleic Acids Book: Solid-phase oligonucleotide synthesis* [online]. 2005 [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://www.atdbio.com/nucleic-acids-book>

BROWN a EL-SAGHEER a. Single tube gene synthesis by phosphoramidate chemical ligation. *Chem. Commun.* [online]. 2017, **53**, 10700-10702 [cit. 2021-6-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C7CC00858A>

DRÁBEK a kol. *Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické laboratoři*. Olomouc: Paleckého univerzita, 2012. ISBN 978-80-244-3002-7.

DWIVEDI a kol. *Diseases and Molecular Diagnostics: A Step Closer to Precision Medicine* [online]. 2017, **32**, 374-398 [cit. 2021-4-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0688-8>

FLEGR. *Evoluční biologie 3 opravené a rozšířené vydání*. 2018. Praha: Academie. ISBN 978-80-200-2796-2.

GIBSON. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**, 6984–6990 [cit. 2021-7-29]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/37/20/6984/1105736?login=true>

GIBSON a kol. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. National Academy of Sciences, 2008, **105**(51), 20404--20409 [cit. 2021-7-15]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://www.pnas.org/content/105/51/20404>

GORENSTEIN a THIVIYANATHAN. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *Proteomics Clinical Application* [online]. (11-12), 563-573 [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prca.201200042>

HAO a kol. Current and Emerging Methods for the Synthesis of Single-Stranded DNA. *Genes* [online]. 2020, **11**(2) [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes11020116>

HOGREFE a kol. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, 326-349 [cit. 2021-4-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187934/>

HOGREFE a kol. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. *Israel Journal of Chemistry* [online]. 2013, 326-349 [cit. 2021-3-24]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijch.201300032>

HOU a kol. Assembly of long DNA sequences using a new synthetic Escherichia coli-yeast shuttle vector. *Virologica Sinica* [online]. 2016, **31**, 160–167 [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3730-8>

ITO a kol. Post-synthetic modification of oligonucleotides containing 5-mono- and 5-difluoromethyluridines. *Tetrahedron* [online]. 2021, **77** [cit. 2021-5-14]. ISSN 0040-4020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131769>

JEONG a kol. One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2012, **78**(15), 5440-5443 [cit. 2021-7-12]. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.00844-12>

KICK a kol. Efficient Production of Single-Stranded Phage DNA as Scaffolds for DNA Origami. *Nano Letters* [online]. 2015 [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.nanolett.5b01461>

KOSURI a kol. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nat Methods* [online]. 2014, **11**, 499–507 [cit. 2021-7-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2918>

LAUSTED a kol. POSaM: a fast, flexible, open-source, inkjet oligonucleotide synthesizer and microarrayer. *Genome Biology* [online]. 2004, **5** [cit. 2021-7-15]. Dostupné z: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2004-5-8-r58>

LEPROUST a kol. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. *Nucleic Acids Research* [online]. 2010, **38**, 2522–2540 [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq163>

LEVRIE a kol. Direct on-chip DNA synthesis using electrochemically modified gold electrodes as solid support. *Japanese Journal of Applied Physics* [4S]. 2018, **57** [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.7567/JJAP.57.04FM01>

LI a kol. An oligonucleotide synthesizer based on a microreactor chip and an inkjet printer. *Sci Rep* [online]. 2019, **9**(5058) [cit. 2021-7-5]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41519-0>

MAURER a kol. Electrochemically Generated Acid and Its Containment to 100 Micron Reaction Areas for the Production of DNA Microarrays. *Plos one* [online]. 2006, **1**(1) [cit. 2021-6-29]. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000034#pone.0000034-Gao2>

MAZURA a kol. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha: Karolinum, 2001. ISBN 80-246-0258-X.

PAN a kol. Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *Journal of Infection* [online]. 2018, 89-98 [cit. 2021-4-10]. ISSN 0163-4453. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445318301105#!>

RONAK a kol. Manipulation of renal gene expression using oligonucleotides. *Academic Press* [online]. 2019, 109-120 [cit. 2021-3-24]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X19300755>

SKÁLOVÁ. *Základní biochemické dráhy v buňce*. Praha: Karolinum. ISBN 9788024626628.

TERMAAT a kol. Gene synthesis by integrated polymerase chain assembly and PCR amplification using a high-speed thermocycler. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2009, **79**, 295-300 [cit. 2021-7-1]. ISSN 0167-7012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.015>

VYCHODILOVÁ a kol. *Klinická genetika*. Brno: VFU, 2019. ISBN ISBN978-80-7305-825-8.

YAMASHITA a kol. Synthesis of Oligonucleotides Containing 2'-N-alkylaminocarbonyl-2'-amino-LNA (2'-urea-LNA) Moieties Using Post-Synthetic Modification Strategy. *Molecules* [online]. 2020, **25**(2), 346 [cit. 2021-4-20].

YU a kol. Molecular Selection, Modification and Development of Therapeutic Oligonucleotide Aptamers. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**, 358 [cit. 2021-4-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms17030358>

ZHANG a kol. Recent Methods for Purification and Structure Determination of Oligonucleotides. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016 [cit. 2021-4-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187934/>