

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Autor: **Mgr. Filip Kostelanský**

Školiteľ: **prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Dizertačná práca: **Výzkum látek ovlivňujících teplotu tání oligonukleotidových sond**

Real-time PCR je široko využívanou metódou v rôznych oblastiach výskumu ako sú napr. biomedicína, mikrobiológia, veterinárna medicína, atď. Kvantifikácia génovej expresie, alelická diskriminácia či detekcia sekvenčných variantov sú novými a zaujímavými možnosťami pre PCR. Diskriminácia bodových zmien pri použití dlhších sond nie je optimálna. Rozdiel teploty topenia medzi plne komplementárnym duplexom a duplexom obsahujúcim bodovú zmenu je v prípade použitia dlhších sond zanedbateľný.

Na druhej strane, krátke oligonukleotidové (ON) sondy sú vhodné na dobrú diskrimináciu bodových zmien. Krátke ON sondy majú nízke teploty topenia. Tento problém je možné vyriešiť pripojením látok viažucich sa do malého žliabku DNA (minor groove binder, MGB), či iných látok, ktoré majú silnú interakciu s DNA ako napríklad interkalačné farbivá či polyamíny. Táto konjugácia môže zvýšiť teplotu topenia duplexov krátkych ON sond.

Táto práca bola venovaná syntéze akridín-4-karboxamidových interkalátorov, ktoré boli pripravené v niekoľkých sériách. Na účely porovnania účinnosti boli modifikované látky Hoechst 33258 a spermín. Bola skúmaná stabilizácia akridínovými stabilizátormi a ich štruktúra bola optimalizovaná, za účelom zlepšenia schopnosti termálnej stabilizácie DNA duplexov. Štúdium niekoľkých sérií akridínov odhalilo, že optimálna stabilizácia akridínmi bola dosiahnutá pri použití sekundárnej karboxamidovej skupiny nesúcej menšiu bázickú skupinu viazanú prostredníctvom dvojuhlíkatého reťazca. Niekoľko vysoko-aktívnych akridínov bolo následne konjugovaných s krátkymi sondami (13 alebo 18 báz; navrhnutými ako časť HFE génu) pomocou copper-free click chémie v pozíciách 7 a/alebo 13. Bolo preukázané, že teplota topenia (T_m) ich duplexov bola v prípade najlepšej kombinácie zvýšená až o takmer 9 °C. Štúdium interakcie akridínov s jednovláknovou a dvojláknovou DNA poukázali na schopnosť interagovať s oboma typmi DNA a súčasne bola potvrdená vyššia afinita akridínov k GC- bohatej sekvencii v porovnaní s AT- bohatou sekvenciou. Bola skúmaná schopnosť sond konjugovaných s akridínmi diskriminovať sekvenčné varianty HFE génu na reálnom modeli s nezmenenou formou, tzv. wild type, H63D C>G a S65C A>T sekvenčnými variantmi. Bolo potvrdené, že akridín samotný môže slúžiť ako fluorescenčný reportér a súčasne stabilizátor DNA duplexu umožňujúci diskrimináciu plne komplementárných duplexov od duplexov obsahujúcich bodové zmeny.