

## Souhrn

V první části práce byla navržena a syntetizována řada šesti modifikovaných 2'-deoxyadenosin trifosfátů, nesoucí malé funkční skupiny (chlor, amino, methyl, vinyl, ethynyl a fenyl) na adeninu v poloze 2. Připravené nukleotidy byly testovány jako substráty pro DNA polymerázy v enzymatické syntéze DNA modifikované v malém žlábkku. 2-Fenyl modifikovaný dATP byl jediným trifosfátem, který nebyl inkorporovaný, což znamená, že fenylová skupina je již příliš velká pro inkorporaci do malého žlábkku. Všechny ostatní testované nukleotidy byly dobrými substráty pro testované DNA polymerázy [KOD XL, Vent(exo-) a Bst LF], což poskytlo modifikovanou DNA s malým žlábkem nesoucím jednu nebo čtyři modifikace. Modifikované DNA s vinylovou nebo ethynylovou skupinou byly poté použity pro modifikaci malého žlábkku DNA fluorescenčními značkami za použití click reakcí. Ethynylová skupina reagovala v mědi katalyzované cykloadici alkynu s azidem (CuAAC), zatímco vinylová skupina se účastnila thiol-en-ové reakce. Tento postup umožnil připojení velkých funkčních skupin, které by jinak nemohly být instalovány do malého žlábkku DNA pomocí přímé enzymatické inkorporace.

Druhá část práce byla věnována studiu 2-alkylamino-2'-deoxyadenosin trifosfátů a jejich použití v enzymatické syntéze modifikovaných oligonukleotidů a DNA. N<sup>2</sup>-alkyl diaminopurinové nukleotidy byly připraveny a testovány jako substráty pro DNA polymerázy. Methylamino modifikovaný derivát byl jediným nukleotidem, který KOD XL DNA polymeráza účinně inkorporovala do DNA. Všechny ostatní nukleotidy byly špatnými substráty pro všechny testované DNA polymerázy. Terminator DNA polymeráza však byla schopna prodloužit primer inkorporací jedné modifikované adeninové báze, v případě, že v reakční směsi nebyly přítomny žádné jiné 2'-deoxynukleosid trifosfáty (dNTP). Optimalizace reakčních podmínek pro experiment s templátem kódujícím dvě po sobě jdoucí adeninové báze v připravené DNA umožnila inkorporaci jednoho nebo dvou modifikovaných trifosfátů. Když byl do reakčních směsí přidán nadbytek přírodních dNTP, metoda prodlužování primeru (PEX) s použitím těchto nukleotidů vedla k DNA modifikované v malém žlábkku na konkrétním místě. Allyl- a propargylaminem modifikované DNA byly poté použity pro transformaci malého žlábkku DNA pomocí click reakcí s fluorescenčními značkami. Tento přístup byl nakonec použit pro konstrukci FRET sond, užitečných pro monitorování procesu denaturace a opětovné hybridizace DNA duplexu nebo pro detekci specifických oligonukleotidových sekvencí.

Nakonec jsme také rozšířili portfolio modifikovaných nukleotidů užitečných pro konstrukci DNA s modifikací v malém žlábků na analogy dGTP. Připravili jsme sérii pěti 2-substituovaných 2'-deoxyinosinotrifosfátů, obsahujících malé substituenty (chlor, methyl, vinyl, ethynyl a fenyl), které fungovaly jako náhražky guaninové nukleobáze a párovala se v DNA s cytosinem. Terminator DNA polymeráza byla schopna připravit produkty plné délky s 2-methyl a 2-vinyl modifikovanými nukleotidy, zatímco ostatní deriváty nebyly inkorporovány žádnou z testovaných DNA polymeráz. Připravená vinylem modifikovaná DNA se účastnila thiol-enových reakcí s thioley a také s DNA vazebným peptidem, který se vázal v malém žlábků a obsahoval cystein, což poskytlo produkt reakce mezi DNA a peptidem tvorbou kovalentní vazby díky jevu blízkosti funkčních skupin.

Všechny připravené 2-substituované purinové nukleotidy byly nakonec použity ke studiu vlivu modifikací v malém žlábků na štěpení dvouvláknové DNA restričními endonukleázami typu II. Nebyl pozorován žádný obecný trend účinku těchto modifikací. Identifikovány byly jak enzymy štěpící modifikovanou DNA s modifikací v malém žlábků, tak i enzymy, jejichž aktivita byla těmito modifikacemi inhibována.