

## Abstrakt

V první části dizertační práce jsem vyvinula reaktivní DNA sondu pro selektivní cross-linkování s lysinovými zbytky DNA vazebních proteinů. Připravila jsem 2'-deoxycytidin 5'-*O*-monofosfát a trifosfát nesoucí v poloze 5 squaramátovou skupinu navázanou přes propargylaminovou spojku. Monofosfát byl použit jako modelová sloučenina na testování reaktivity tohoto smíšeného squaramátu v cross-linkových reakcích s lysinem a krátkými peptidy obsahujícími lysin. Squaramátem modifikovaný 2'-deoxycytidin 5'-*O*-trifosfát byl dobrým substrátem pro KOD XL polymerázu pro enzymovou syntézu DNA metodou extenze primeru (PEX) a taky metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Squaramátem modifikovaná DNA tvoří stabilní diamidové vazby s primárními aminy. Reaktivitu modifikované DNA jsem testovala v biokonjugačních reakcích se sulfo-Cy5-aminem a s peptidy obsahujícími lysin. Poté byla squaramátem modifikovaná DNA úspěšně kovalentně připojena k histonovým proteinům bohatým na lysin. Reaktivní, squaramátem modifikovaný nukleotid vykazoval potenciál pro další biokonjugační reakce nukleových kyselin s aminy nebo lysin obsahujícími peptidy a proteiny bez potřeby externího činidla.

Na základě pozitivních výsledků experimentů se squaramátem modifikovanou DNA, jsem v druhé části práce vyvinula a připravila squaramátem modifikovaný ribonukleotid pro studium cross-linků s RNA vazebnými proteiny. Po optimalizaci reakčních podmínek byl squaramátem modifikovaný cytidin 5'-*O*-trifosfát inkorporován do RNA pomocí T7 RNA polymerázy v *in vitro* transkripční reakci. Dále byla modifikovaná RNA použita pro post syntetické značení sulfo-Cy5-aminem. Nakonec jsem testovala squaramátem modifikovanou RNA sondu v reakci s různými modelovými proteiny (tj. JEV a YFV NS5, SARS-CoV-2 RdRp, SARS-CoV-2 nukleoprotein a HIV-rt). Modifikovaný ribonukleotid byl také použit v RNA extenzních reakcích katalyzovaných RNA dependentními RNA polymerázami (JEV NS5 a SARS-CoV-2 RdRp). Modifikovaná RNA se kovalentně vážala na protein během polymerázové reakce s JEV NS5 polymerázou, což bylo potvrzeno gelovou separací (PAGE) a imunodetekcí. Proteomická analýza polymerázových reakčních směsí identifikovala tři lysinové zbytky proteinu (K269, K462, K463) kovalentně připojených ke squaramátem modifikované RNA.