

## Abstrakt

Tato disertační práce je zaměřena na enzymovou syntézu na bázi modifikovaných RNA s různými funkčními skupinami, včetně reaktivních pro síťování proteinů, hydrofobních a fluorescenčních skupin nebo afinitních značek. Konstrukce oligonukleotidů modifikovaných na bázi je zabezpečena buď konvenční *in vitro* transkripcí s T7 RNA polymerázou, nebo inovativním přístupem využívajícím upravené mutantní DNA polymerázy a reakci prodlužování primerů (PEX).

V první části práce byl nasyntetizován nový ribonukleosid trifosfátový stavební blok s reaktivní chloracetamidovou funkční skupinou pomocí Sonogashirovy kaplingové reakce ve vodní fázi katalyzované Pd, přímo aplikované na jodovaný nukleotid. Chloracetamidem modifikovaný trifosfát byl poté testován jako vhodný substrát pro *in vitro* transkripci s T7 RNA polymerázou s cílem zkonstruovat RNA sondy s jednou nebo více reaktivními skupinami. Selektivita chloracetamidem modifikovaných RNA pro thiol, nebo cystein a histidin obsahující (bio)molekuly byla ukázána modelovými biokonjugačními reakcemi a experimenty pro síťování se třemi RNA-vazebnými proteiny s různými strukturami a funkcemi. Účinná tvorba kovalentních RNA-protein aduktů byla potvrzena western blotem, gelovou elektroforézou a hmotnostní analýzou, které byly prováděny za denaturačních podmínek. Identifikace RNA-vazebných míst a cílových aminokyselinových zbytků v modelových proteinech byla provedena pomocí proteomické analýzy produktů štěpení. Účinnost a potenciální použitelnost nové modifikované RNA sondy byla dále předvedena na příkladu síťování s extrahovanými buněčnými proteiny, kde vybraný sekvenčně-specifický protein rozpoznal a kovalentně zachytil pouze RNA sondu obsahující jeho cílovou sekvenci.

Ve druhé části práce byla vyvinuta nová metodika pro konstrukci na bázi modifikovaných RNA oligonukleotidů s různou délkou a počtem nepřírozených nukleotidů s využitím uměle upravených termostabilních DNA polymeráz a PEX reakce. Modifikované nukleotidy obsahující různé funkční skupiny připojené k pozici 5 u pyrimidinů nebo k pozici 7 u 7-deazapurinů byly zkoumány jako vhodné substráty pro dvě upravené polymerázy – TGK a SFM4-3. Obě mutantní polymerázy prokázaly účinnost při začleňování jak jednoho, tak čtyř modifikovaných nukleotidů do jednoho řetězce RNA. Zvýšená aktivita TGK polymerázy byla ukázána na syntéze plně modifikovaných RNA sond, kde byly všechny čtyři kanonické nukleotidy nahrazeny modifikovanými protějšky nesoucími vzájemně odlišné funkční skupiny. Tento výsledek překonal konvenční *in vitro* transkripci s T7 RNA polymerázou. Naopak polymeráza SFM4-3 nedosáhla této úrovně aktivity. Účinné prodloužení bylo provedeno také v případě DNA primeru, pro konstrukci neobvyklých DNA-RNA hybridů. Navíc byla vyvinuta přímočará metodika využívající selektivního vyštěpení 2'-deoxyuridinu, která umožňuje odstranění DNA primeru ze syntetizované části RNA, což usnadňuje tvorbu hypermodifikovaných RNA sond, kde je každá nukleobáze modifikována. Dále byla úspěšně vyvinuta metoda pro poměrně náročné selektivní značení RNA na specifických pozicích využívající kombinaci inkorporace jednoho nukleotidu (SNI) a PEX. Pro strukturální fluorescenční studie byly použity interně značené RNA sondy se dvěma odlišnými fluorofory.

Je třeba zdůraznit, že tento přístup byl také aplikován pro syntézu messengerových RNA modifikovaných v určité oblasti nebo v bodě, přičemž bylo poprvé odhaleno, že jediná modifikace v podobě 5-methylcytidinu v oblasti kódující pro protein významně zvýšila produkci proteinu jak v *in vivo*, tak v buněčných experimentech ve srovnání s jeho přirozenými nebo plně modifikovanými mRNA protějšky.