

# PŘÍPRAVA DNA S MODIFIKOVANÝMI BÁZEMI ENZYMATICKOU INKORPORACÍ MODIFIKOVANÝCH NUKLEOSID-TRIFOSFÁTŮ

MICHAL HOCEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup> Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2  
hocek@uochb.cas.cz

Došlo 25.11.13, přijato 18.12.13.

Klíčová slova: DNA, nukleotidy, cross-coupling, polymerasy

## Obsah

1. Úvod
2. Syntézy modifikovaných nukleosid trifosfátů
3. Metodiky enzymatické inkorporace
4. Aplikace
5. Závěr

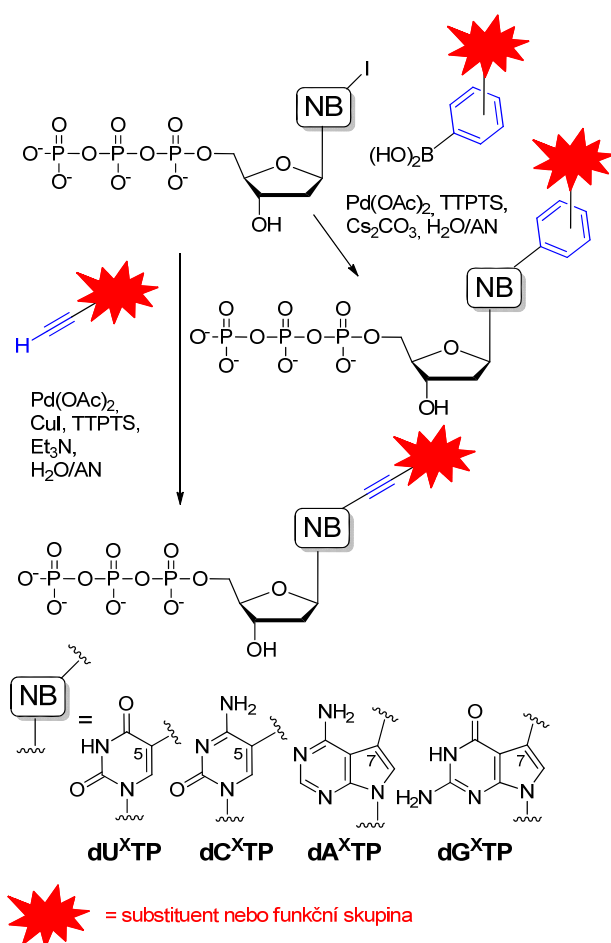
## 1. Úvod

Nukleové kyseliny (DNA i RNA) s modifikovanými bázemi jsou předmětem intenzivního studia a nacházejí uplatnění v diagnostice, medicíně, chemii, chemické biologii<sup>1</sup> i v materiálových aplikacích<sup>2</sup>. Klasickou a velmi efektivní metodikou jejich přípravy je automatická fosforamiditová syntéza oligonukleotidů (ON) na pevné fázi<sup>3</sup>. I tato metoda má ovšem řadu problémů a nevýhod. Syntéza některých modifikovaných nukleosid-fosforamiditů je obtížná a řada funkčních skupin není kompatibilní s jejich syntézou nebo s fosforamiditovým protokolem syntézy ON na pevné fázi (zejména senzitivita k oxidaci nebo k reakci se silnými nukleofily). Velmi problematická je hlavně syntéza dlouhých ON (> 100 nukleotidů), kdy efektivita chemické syntézy na pevné fázi významně klesá. Komerční výrobci většinou nenabízejí ON s modifikovanými bázemi, takže je nutná investice do automatického syntetizátoru. Alternativou k chemické syntéze je enzymatická syntéza s použitím polymerasy a modifikovaných nukleosid-trifosfátů (NTP)<sup>4–6</sup>, která je, spolu s metodikou jejich přípravy, předmětem tohoto přehledného článku.

## 2. Syntézy modifikovaných nukleosid-trifosfátů

Nukleosid-trifosfáty se připravují trifosforylací nukleosidů sledem reakcí s  $\text{POCl}_3$ , následovanou pyrofosfátem a triethylamonium-hydrogenkarbonátem<sup>7</sup>. Reaktivita primárního hydroxylu v poloze 5' je obvykle dostatečně vyšší než reaktivita sekundárních hydroxylů v poloze 3' (popř. i v poloze 2' u ribonukleosidů), takže není třeba použití chránících skupin. Výsledné NTP se obvykle izolují chromatografií na Sephadexu a dočišťují preparativní HPLC. Některé funkční skupiny ovšem opět nejsou kompatibilní s trifosforylačním protokolem a při přípravě NTP je nutno je chránit a nakonec chránicí skupiny odstranit.

Cross-coupling reakce katalyzované komplexy Pd jsou nejpoužívanější C-C spojovací reakce v organické syntéze a často se používají k připojení uhlíkatého substituentu na nukleobáze. V poslední dekádě byly vyvinuty Suzukiho a Sonogashirovy reakce ve vodných roztocích s využitím trifenylfosfan-3,3',3''-trisulfonátu (TPPTS) jako vodorozpuštěného ligandu pro Pd-katalyzátor a tyto byly aplikovány pro přímou substituci halogenovaných nukleosidů bez nutnosti chránění na cukerné části<sup>8</sup>. V naší laboratoři byly Suzukiho reakce poprvé aplikovány i na reakce volných nukleotidů a později i nukleosid-trifosfátů<sup>9</sup>. U cross-coupling reakcí NTP je největším problémem hydrolýza trifosfátu, což je anhydrid kyseliny fosforečné, který se ve vodných roztocích za vyšších teplot hydrolyzuje velmi snadno. Proto bylo nutno vodné cross-coupling reakce optimalizovat na co nejkratší reakční časy (30–40 minut) a vyvinout rychlé a účinné izolace produktů semi-preparativní HPLC na reverzní fázi (odstranění příslušných nukleosid-difosfátů a monofosfátů, jakož i pyrofosfátu jako produktů parciální hydrolýzy). Systematickým studiem a optimalizacemi se podařilo vyvinout spolehlivý a efektivní protokol pro Suzukiho a Sonogashirovy reakce halogenovaných NTP s funkcionalizovanými arylboronovými kyselinami nebo terminálními alkyny<sup>10</sup> (Schéma 1). Tyto reakce jsou mimořádně tolerantní vůči většině organických funkčních skupin (např.  $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOR}$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{OH}$  apod., ale s výjimkou některých sirných skupin jako  $\text{SH}$ ), což umožňuje přímé zavedení vysoce funkcionalizovaných i reaktivních substituentů bez nutnosti použití chránících skupin. Výtěžky modifikovaných NTP se po izolaci a odstranění produktů hydrolýzy pohybují mezi 20 až 60 %, ale produkty jsou připraveny v pouhém jednom kroku, což bohatě vyvažuje nižší výtěžky. Pro enzymatické inkorporace jsou obvykle dostatečná miligramová množství NTP, která jsou touto metodikou snadno dostupná. V naší laboratoři jsme se dosud soustředili hlavně na přípravu 2'-deoxyribonukleosid-trifosfátů (dNTP) a jejich využití v syntéze DNA, ale metodiku jsme s úspěchem aplikovali i na ribonukleotid-trifosfáty potřebné k enzymatické syntéze RNA. Substituenty zavádíme do polohy 5



### Schéma 1. Modifikace dNTP cross-couplingovými reakcemi

u pyrimidinových a do polohy 7 u 7-deazapurinových dNTP, které je nutno použít místo modifikovaných derivátů purinu (viz dále). V letošním roce se podařilo poprvé úspěšně aplikovat i Heckovu reakci dNTP s akrylátem, ale tato reakce zatím není obecná<sup>11</sup>.

### 3. Metodiky enzymatické inkorporace

Pro enzymatickou inkorporaci dNTP se využívají DNA polymerasy, zatímco RNA polymerasy syntetizují modifikovanou RNA z NTP stavebních bloků. Řada předchozích studií ukazovala, že zejména DNA polymerasy tolerují substituenty v oblasti velkého žlábků DNA, tedy hlavně v poloze 5 u pyrimidinových nukleotidů<sup>12</sup>. Ovšem naše úvodní studie s purinovými NTP substituovanými v poloze 8 ukázala, že tyto jsou velmi špatnými substráty pro polymerasy v důsledku sterického bránění a jím vynucenou syn-konformaci nukleobáze vůči cukerné části<sup>13</sup>. Proto jsou puriny nahrazovány 7-deazapuriny se substitucí v poloze 7, kde příslušné dNTP jsou velmi dobrými substráty pro polymerasy. Využíváme celou škálu DNA poly-

meras s i bez exonukleázové aktivity, ale neúspěšnější a nejobecnější je využití termostabilních polymeras, např. KOD XL, Vent(exo-) nebo Pwo, se kterými se pracuje za teplot 50–70 °C.

Nejjednodušší a základní metodikou je tzv. primer extension (PEX), kdy je použit radioaktivně či fluorescenčně značený primer (očko) a delší komplementární templát. Polymerasa inkorporuje dNTP, a tím prodlužuje primer se sekvencí komplementární k sekvenci templátu. Pokud jeden (nebo i více) ze čtyř přirozených dNTP (dATP, dGTP, dCTP a TTP) je nahrazen příslušným dNTP s modifikovanouází, tak v nově syntetizované části řetězce bude každá tato nukleobáze "N" nést danou modifikaci. PEX reakce je poté analyzována gelovou elektroforézou, která při použití pozitivních (přirozené dNTP) a negativních kontrolních experimentů (absence jednoho či více přirozených dNTP) prokáže, zda polymerasa správně rozpoznala a inkorporovala modifikovaný nukleotid. Při použití výše uvedených typů dNTP modifikovaných v poloze 5' či 7' se ve velké většině případů podařilo nalézt alespoň jednu polymerasu, která je efektivně inkorporuje. Studie laboratoře prof. Marx z Konstanz ukázaly<sup>14</sup>, že ve struktuře aktivního místa polymerasy s templátem, primerem a dNTP je ve velkém žlábkú dostatek prostoru i pro velmi objemné substituenty (včetně polymerů<sup>15</sup> či dalších oligonukleotidů<sup>16</sup>). Pokud použijeme pro PEX biotinylovaný templát, můžeme po reakci přidat magnetické kuličky modifikované streptavidinem, které váží biotinylovanou DNA a, po vychytání kuliček magnetem a omytí všech ostatních složek, lze uvolnit jednovláknový modifikovaný ON za denaturačních podmínek (horká voda)<sup>17</sup>.

Některé aplikace vyžadují pozičně-specifickou inkorporaci jednoho modifikovaného nukleotidu doprostřed řetězce, což ovšem PEX neumožňuje (v celé nově syntetizované části řetězce je vždy jeden nebo více druhů bází modifikován). Proto byla nedávno vyvinuta strategie<sup>18</sup> spočívající v reakci primeru a templátu pouze s jedním ekvivalentem modifikovaného dNTP s následnou reakcí PEX po přidání všech čtyř přirozených dNTP. Ještě komplikovanější je situace, kdy jedna modifikovaná báze je následovaná tou samou přirozenou bází, kde je nutný dvoustupňový proces PEX s kratším a delším templátem a magnetoseparací.

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je běžná metoda na amplifikaci DNA. Při použití jednoho či více modifikovaných dNTP ji lze využít k přípravě DNA s vysokou frekvencí modifikací v obou vláknech<sup>19</sup>. Již při použití jednoho modifikovaného dNTP (a tří přirozených) nese zhruba 1/4 bázi substituent ve velkém žlábků, který je tak z velké části vyplněn. PCR inkorporace modifikovaných dNTP je náročnější na substrát, neboť nejenže musí být polymerasa schopná inkorporovat modifikovaný nukleotid do jakékoli sekvence (včetně několika modifikací za sebou) a pokračovat v syntéze (nesmí se „zadrhnout“), ale musí být schopna i číst modifikovaný templát. Proto některé dNTP nesoucí objemné substituenty lze aplikovat v PCR jen omezeně. Rovněž stoupají problémy s prodlužující se délkou templátu, kdy zejména DNA s více než 1000 nukleotidy fungují

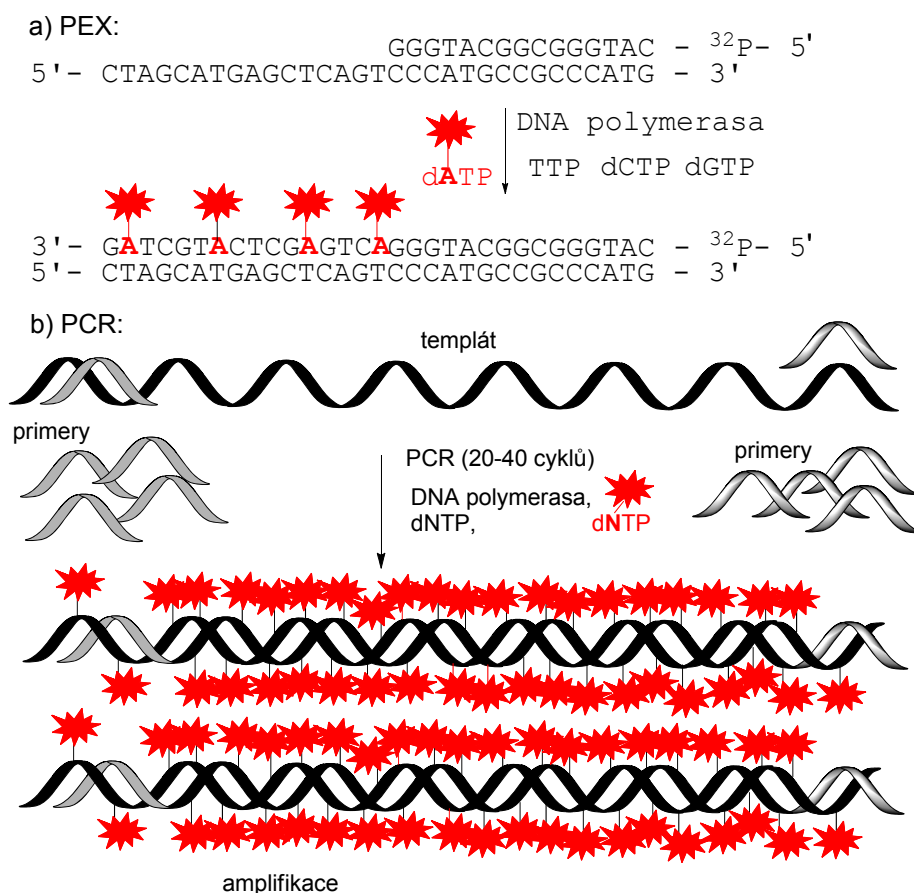


Schéma 2. PEX a PCR inkorporace modifikovaných dNTP

s některými modifikovanými dNTP jen s obtížemi. PCR je tedy vhodná metoda na přípravu delších dvouvláknových DNA s vysokou hustotou modifikací ve velkém žlábků.

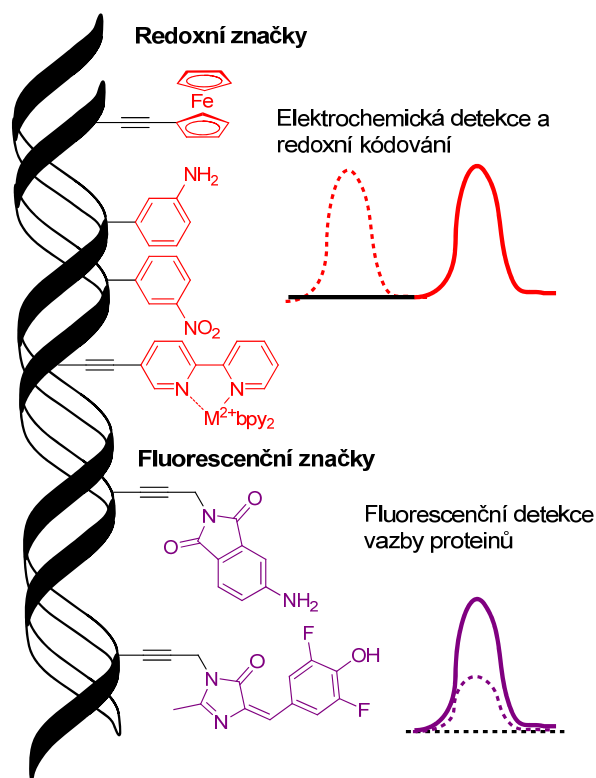
Výše uvedené metody, které vyžadují stabilitu dvoušroubovice templát-primer za zvýšené reakční teploty, nejsou použitelné pro syntézu kratších úseků ON s méně než 20 nukleotidy. Proto byla v naší laboratoři vyvinuta tandemová metodika využívající katalytický cyklus s dvěma enzymy, z nichž první (DNA polymerasa) syntetizuje modifikovanou část řetězce primeru, zatímco druhý enzym (nicking endonukleasa) dosyntetizovaný řetězec odštěpí, obnoví původní délku primeru a tím nastartuje další kolo PEX<sup>20</sup>. V každém cyklu je tedy syntetizován a uvolňuje se jeden krátký jednovláknový ON, který se tedy lineárně amplifikuje. Tato metoda se ukázala jako vhodná pro syntézu krátkých ON s 8 až 22 nukleotidy a modifikací na C, A nebo T (modifikované dGTP nefungovaly). Tyto modifikované ON lze s výhodou využít jako primery pro PEX nebo PCR s nemodifikovanými dNTP a připravit tím ON nebo DNA značené na 5'-konci<sup>21</sup>.

Další významnou enzymatickou metodou, která ovšem nevyžaduje templát, je použití terminální deoxynukleotidyl-transferasy, což je enzym nespecificky inkor-

porující nukleotidy na 3'-konec ON. Při použití modifikovaného dNTP lze optimalizovat podmínky a koncentraci substrátu tak, aby vznikala relativně úzká disperze oligomerních produktů obsahujících několik modifikovaných nukleotidů na 3'-konci<sup>22</sup>.

#### 4. Aplikace

Modifikované ON a DNA lze aplikovat v mnoha oblastech, zejména v diagnostice a chemické biologii. Z bioanalytických aplikací je nutno zmínit zejména využití pro spinové značení DNA pro EPR<sup>23</sup> a fluorescenční značení<sup>24</sup>. Ve spolupráci se skupinou doc. M. Fojty z BFÚ AV ČR dlouhodobě pracujeme na vývoji redoxních značek pro elektrochemickou detekci (obr. 1). Byly připraveny dNTP modifikované ferrocenem<sup>25</sup>, amino- a nitrofenylem<sup>26</sup>, komplexy Ru nebo Os<sup>27</sup>, tetrathiafulvalenem<sup>28</sup>, sulfidy<sup>29</sup>, hydrazony<sup>30</sup> a chinony<sup>31</sup>, které po inkorporaci poskytly ON nebo DNA s redoxně-aktivní značkou, kterou lze identifikovat na základě charakteristického redoxního potenciálu při voltametii. Použití několika orthogonálních redoxních značek pro modifikaci různých nukleobází lze v principu



Obr. 1. Aplikace modifikovaných DNA v bioanalýze

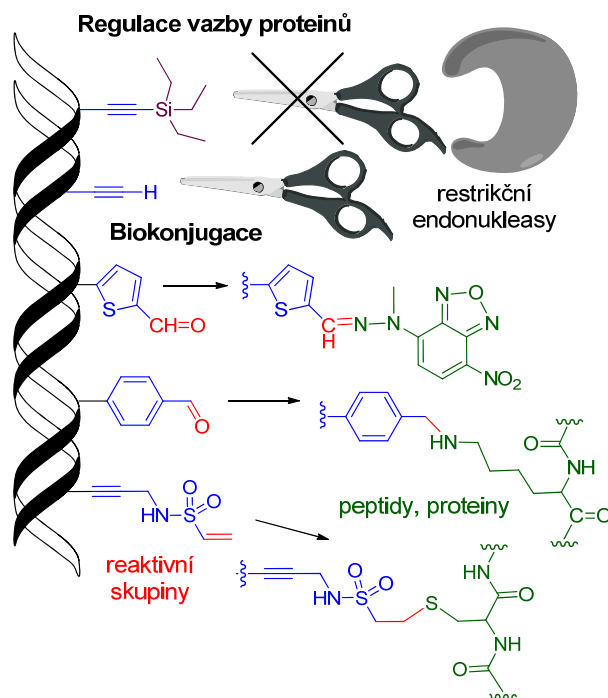
využít pro redoxní kódování DNA bází a tím i pro vývoj alternativních minisekvenčních metodik. Bohužel kombinace výše zmíněných značek lze použít v bioanalýze jen omezeně (překryv signálů ve voltamogramech) a teprve v letošním roce se podařilo vyvinout plně orthogonální sadu 3 redoxních značek s využitím benzofurazanu, amino- a nitrofenylu<sup>32</sup>.

Rovněž ve spolupráci s doc. Fojtou jsou vyvíjeny a studovány nové fluorescenční značky (obr. 1). Účelem zde není pouze doplnit řady velmi dobře známých a používaných komerčních fluorescenčních značek s výraznou fluorescencí, ale vyvinout fluorofory, které budou měnit intenzitu nebo i barvu emise při změnách okolí DNA (např. při vazbě proteinu na danou sekvenci). Dosud se podařilo dokončit studie biaryllových substituentů<sup>33</sup> reagujících na změny pH, solvatochromních aminoftalimidových substituentů<sup>34</sup>, které výrazně zvyšovaly fluorescenci po vazbě proteinu v důsledku změny polaroty prostředí, a konečně fluorofory inspirované zeleným fluorescenčním proteinem (GFP)<sup>35</sup>, které rovněž reagovaly na vazbu proteinů zvýšením intenzity fluorescence. Tyto a další značky budou dále vyvíjeny pro senzory DNA-vazebných proteinů (obr. 1).

Pomocí PEX nebo PCR lze na ON nebo DNA přímo připojit další biomolekuly, což bylo využito pro syntézu konjugátů DNA s aminokyselinami<sup>10</sup>, steroidy<sup>36</sup> i dalšími nukleobázemi<sup>37</sup>, mimikujícími vychlípění nukleotidu do velkého žlábků (což je mechanismus využívaný např.

DNA methyltransferasami nebo opravnými enzymy). Rovněž byly připojeny bi- a terpyridinové ligandy a využity pro komplexaci kationtů kovů<sup>38,39</sup>. Připojení postranních řetězců některých aminokyselin k DNA je studováno pro možnost tvorby katalytických míst v sekundárních strukturách, které by napodobovaly enzymy<sup>40</sup>. Obvykle se tento přístup kombinuje s *in vitro* evolucí<sup>41</sup>.

Jednou z nejvýznamnějších aplikací je zavedení chemicky reaktivních funkčních skupin a jejich použití pro biokonjugace s dalšími molekulami a biomolekulami (obr. 2). Bylo publikováno zavedení alkynových substituentů pro „click“ reakce<sup>42</sup> nebo dienů pro Diels-Alderovy cykloadice<sup>43</sup>. V naší laboratoři se úspěšně podařilo připravit dNTP nesoucí aldehydové funkce a inkorporovat je do DNA pomocí PEX i PCR. Tyto modifikované reaktivní nukleové kyseliny pak byly obarveny tvorbou hydrazonů<sup>44</sup> nebo použity k biokonjugaci s lysinem a peptidy pomocí redukativní aminace<sup>45</sup>. Tyto reakce ovšem ve vodě dávají nízké konverze v důsledku nevýhodné rovnováhy při tvorbě Schiffových bází a rovněž je třeba použití redukčního činidla ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ), což komplikuje případné přímé biologické využití *in vivo*. Dalším vývojem se nám ale podařilo vyvinout vinylsulfonamidové modifikace, které specificky reagují s aminokyselinou cysteinem a poskytují produkty Michaelovy adice. Příslušné dNTP nesoucí vinylsulfonamid byly inkorporovány do ON a DNA a následně byly využity nejen k syntéze stabilních kovalentních konjugátů s peptidy, ale také ke specifickému vychytávání (cross-linkování) s DNA-vazebnými proteiny obsahujícím cystein v rozpoznávacím místě<sup>46</sup>. Tento přístup se nyní snažíme



Obr. 2. Aplikace modifikovaných DNA v chemické biologii

aplikovat na vývoj reaktivních DNA sond (molekulových „pastiček“) pro specifické vychytávání onkogenních proteinů a pro DNA-proteomiku a identifikaci neznámých DNA vazebných proteinů.

Důležitým aspektem připojení substituentu do velkého žlábků DNA je jeho vliv na vazbu a rozpoznávání dané sekvence proteiny. Bylo provedeno systematické studium vlivu substituentů různé velikosti na kostře 7-deazaadeninu<sup>47</sup>, cytosinu nebo uracilu<sup>48</sup> na štěpení DNA restrikčními endonukleasami (RE). Tato studie ukázala, že jakékoli modifikace na cytosinu mají za následek plnou ochranu DNA proti štěpení, zatímco některé RE tolerovaly přítomnost menších substituentů v poloze 7 na 7-deazaadeninu a v poloze 5 na uracilu. To naznačuje možnost, že G-C páry jsou pro sekvenčně specifické rozpoznávání DNA RE důležitější než A-T páry. Fakt, že řada RE tolerovala přítomnost 7-ethynyl-7-deazaadeninu a danou sekvenci rozpoznávala a štěpila, byla využita k prvnímu chemickému přepínači rozpoznání dvouvláknové DNA na bázi chránící skupiny<sup>49</sup>. Byl připraven 2'-deoxy-7-(triethylsilyl)ethynyl-7-deazaadenosin 5'-O-trifosfát, který byl pomocí PEX nebo PCR inkorporován do DNA a tato byla chráněna proti štěpení RE (v důsledku přítomnosti objemných silylových skupin ve velkém žlábků). Ovšem po desilylaci alkynů reakcí s amoniakem byla připravena DNA obsahující pouze relativně malé ethynylové substituenty a tato DNA již byla RE rozpoznána a štěpena. Stejný modifikovaný dNTP byl využit ve spolupráci se skupinou Dr. J. Dickschata z univerzity v Braunschweigu na nový princip klonování a exprese genů pro případ, kde se rozpoznávací sekvence pro RE vyskytuje ve více kopiích<sup>50</sup>. Pomocí série PCR reakcí byl připraven DNA konstrukt, kde sekvence genu obsahovala chránící skupiny, zatímco okolní sekvence pouze přirozené báze. Tato byla štěpena RE, klonována do plasmidu a po transfekci do *E. coli* využita k expresi proteinu. Nyní je v naší laboratoři (ve spolupráci s Dr. L. Krásným z MBÚ AV ČR) rozvíjena studie vlivu modifikace na transkripci a možnost její chemické regulace.

## 5. Závěr

Kombinací metodiky pokročilé organické syntézy (cross-coupling reakce ve vodné fázi) s biochemickými metodikami (inkorporace polymerasou) se podařilo vypracovat jednoduchý dvoukrokový protokol pro přípravu modifikovaných nukleových kyselin. Jsou studovány možnosti jejich aplikací v bioanalýze a diagnostice (redoxní nebo fluorescenční značení) a v chemické biologii (biokonjugace, vychytávání proteinů a regulace vazby proteinů na DNA). Otevírá to zcela nové možnosti v hraniční oblasti bioorganické chemie a chemické biologie.

*Tato práce byla podpořena institucionálním financováním ÚOCHB AV ČR (RVO: 61388963) a PŘF UK a granty GA ČR (203/09/0317 a P206/12/G151) a GA AV (IAA4000409010). Poděkování patří všem bývalým i současným studentům a spolupracovníkům uvedeným jako*

*spoluautory citovaných publikací. Rovněž děkuji spolupracujícím týmům M. Fojty (BFÚ AV ČR, elektrochemie a vazby proteinů), J. Dickschata (TU Braunschweig, strategie klonování genů) a N. Ernstinga (HU Berlin, fluorescenční spektroskopie).*

## LITERATURA

1. Famulok M., Hartig J. S., Mayer G.: *Chem. Rev.* 107, 3715 (2007).
2. Feldkamp U., Niemeyer C. M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 1856 (2006).
3. Beaucage S. M., Caruthers M. H.: *Tetrahedron Lett.* 22, 1859 (1981).
4. Hocek M., Fojta M.: *Org. Biomol. Chem.* 6, 2233 (2008).
5. Hocek M., Fojta M.: *Chem. Soc. Rev.* 40, 5802 (2011).
6. Hollenstein M.: *Molecules* 17, 13569 (2012).
7. Kovacs T., Otvös L.: *Tetrahedron Lett.* 29, 4525 (1988).
8. Western E. C., Daft J. R., Johnson E. M. II., Gannett P. M., Shaughnessy K. H.: *J. Org. Chem.* 68, 6767 (2003).
9. Čapek P., Pohl R., Hocek M.: *Org. Biomol. Chem.* 4, 2278 (2006).
10. Čapek P., Cahová H., Pohl R., Hocek M., Gloeckner C., Marx A.: *Chem. Eur. J.* 13, 6196 (2007).
11. Dadová J., Vidláková P., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 78, 9627 (2013).
12. Lee S. E., Sidorov A., Gourlain T., Mignet N., Thorpe S. J., Brazier J. A., Dickman M. J., Hornby D. P., Grasby J. A., Williams D. M.: *Nucleic Acids Res.* 29, 1565 (2001).
13. Cahová H., Pohl R., Bednářová L., Nováková K., Cvačka J., Hocek M.: *Org. Biomol. Chem.* 6, 3657 (2008).
14. Obeid S., Baccaro A., Welte W., Diederichs K., Marx A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21327 (2010).
15. Baccaro A., Marx A.: *Chem. Eur. J.* 16, 218 (2010).
16. Baccaro A., Steck A.-L., Marx A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 254 (2012).
17. Brázdilová P., Vrábel M., Pohl R., Pivoňková H., Havran L., Hocek M., Fojta M.: *Chem. Eur. J.* 13, 9527 (2007).
18. Ménová P., Cahová H., Plucnara M., Havran L., Fojta M., Hocek M.: *Chem. Commun.* 49, 4652 (2013).
19. Jäger S., Rasched G., Kornreich-Leshem H., Engeser M., Thum O., Famulok M.: *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15071 (2005).
20. Ménová P., Hocek M.: *Chem. Commun.* 48, 6921 (2012).
21. Ménová P., Raindllová V., Hocek M.: *Bioconjugate Chem.* 24, 1081 (2013).
22. Horáková P., Macíčková-Cahová H., Pivoňková H., Špaček J., Havran L., Hocek M., Fojta M.: *Org. Biomol. Chem.* 9, 1366 (2011).
23. Obeid S., Yulikow M., Jeschke G., Marx A.: *Angew.*

- Chem. Int. Ed. 47, 6782 (2008).
24. Thoresen L. H., Jiao G.-S., Haaland W. C., Metzker M. L., Burgess K.: Chem. Eur. J. 9, 4603 (2003).
  25. Brázdilová P., Vrábel M., Pohl R., Pivoňková H., Havran L., Hocek M., Fojta M.: Chem. Eur. J. 13, 9527 (2007).
  26. Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M.: Angew. Chem. Int. Ed. 47, 2059 (2008).
  27. Vrábel M., Horáková P., Pivoňková H., Kalachová L., Černocká H., Cahová H., Pohl R., Šebest P., Havran L., Hocek M., Fojta M.: Chem. Eur. J. 15, 1144 (2009).
  28. Riedl J., Horáková P., Šebest P., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M.: Eur. J. Org. Chem. 2009, 3519.
  29. Macíčková-Cahová H., Pohl R., Horáková P., Havran L., Špaček J., Fojta M., Hocek M.: Chem. Eur. J. 17, 5833 (2011).
  30. Raindlová V., Pohl R., Klepetářová B., Havran L., Šimková E., Horáková P., Pivoňková H., Fojta M., Hocek M.: ChemPlusChem 77, 652 (2012).
  31. Balintová J., Pohl R., Horáková P., Vidláková P., Havran L., Fojta M., Hocek M.: Chem. Eur. J. 17, 14063 (2011).
  32. Balintová J., Plucnara M., Vidláková P., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M.: Chem. Eur. J. 19, 12720 (2013).
  33. Riedl J., Pohl R., Rulišek L., Hocek M.: J. Org. Chem. 77, 1026 (2012).
  34. Riedl J., Pohl R., Ernsting N. P., Orsag P., Fojta M., Hocek M.: Chem. Sci. 3, 2797 (2012).
  35. Riedl J., Ménová P., Pohl R., Orsag P., Fojta M., Hocek M.: J. Org. Chem. 77, 8287 (2012).
  36. Ikonen S., Macíčková-Cahová H., Pohl R., Šanda M., Hocek M.: Org. Biomol. Chem. 8, 1194 (2010).
  37. Kielkowski P., Pohl R., Hocek M.: J. Org. Chem. 76, 3457 (2011).
  38. Kalachova L., Pohl R., Hocek M.: Org. Biomol. Chem. 10, 49 (2012).
  39. Kalachova L., Pohl R., Bednářová L., Fanfrlík J., Hocek M.: Org. Biomol. Chem. 11, 78 (2013).
  40. Hollenstein M.: Chem. Eur. J. 18, 13320 (2012).
  41. Hollenstein M., Hipolito C. J., Lam C. H., Perrin D. M.: Nucleic Acids Res. 37, 1638 (2009).
  42. Wirges C. T., Timper J., Fischler M., Sologubenko A. S., Mayer J., Simon U., Carell T.: Angew. Chem. Int. Ed. 48, 219 (2009).
  43. Borsenberger V., Howorka S.: Nucleic Acids Res. 37, 1477 (2009).
  44. Raindlová V., Pohl R., Šanda M., Hocek M.: Angew. Chem. Int. Ed. 49, 1064 (2010).
  45. Raindlová V., Pohl R., Hocek M.: Chem. Eur. J. 18, 4080 (2012).
  46. Dadová J., Orsag P., Pohl R., Brázdová M., Fojta M., Hocek M.: Angew. Chem. Int. Ed. 52, 10515 (2013).
  47. Macíčková-Cahová H., Hocek M.: Nucleic Acids Res. 37, 7612 (2009).
  48. Macíčková-Cahová H., Pohl R., Hocek M.: ChemBioChem 12, 431 (2011).
  49. Kielkowski P., Macíčková-Cahová H., Pohl R., Hocek M.: Angew. Chem. Int. Ed. 50, 8727 (2011).
  50. Kielkowski P., Brock N. L., Dickschat J. S., Hocek M.: ChemBioChem 14, 801 (2013).

**M. Hocek<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, <sup>b</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): **Preparation of Base-Modified DNA by Enzymatic Incorporation of Modified Nucleoside Triphosphates**

Synthesis of base-modified oligonucleotides and DNA by polymerase incorporations of modified nucleoside triphosphates (dNTPs) is summarized. The cross-coupling synthesis of modified dNTPs, methods of their enzymatic incorporations, as well as their applications in bioanalysis and chemical biology are discussed.