

**Uniwersytet Warszawski**  
**Wydział Fizyki**



**Marcin Ziemiak**  
Nr Albumu: 249066

**PRACA DOKTORSKA**

**Nowe syntetyczne analogi kapu mRNA i ich zastosowania  
w badaniach biochemicznych i strukturalnych nad  
kompleksem enzymatycznym degradującym kap  
Dcp1/Dcp2 i innymi białkami oddziałującymi z kapem**

*Praca wykonana pod kierunkiem dr hab.  
Jacka Jemielitego, prof UW w Zakładzie  
Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej  
Wydziału Fizyki Uniwersytetu  
Warszawskiego*

Warszawa 2015



## Chciałem wyrazić podziękowania dla:

**dr hab. Jacka Jemielitego** za możliwość realizacji interesującego tematu pracy badawczej w Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego oraz nieocenioną pomoc i opiekę (a także cierpliwość) podczas prowadzenia badań

**dr Joanny Kowalskiej** za opiekę merytoryczną, pomoc w przygotowaniu manuskryptów publikacji oraz wsparcie podczas prowadzenia badań naukowych

**Prof. Roberta E. Rhoadsa** za możliwość pracy w jego zespole badawczym w LSU Health w Shreveport oraz nieocenione wsparcie podczas tego stażu

**Prof. Johna D. Grossa** za możliwość pracy w jego zespole badawczym w UCSF w San Francisco, pomoc i zainteresowanie podczas badań prowadzonych w tym zespole

**dr Błażeja Wojtczaka** za pomoc podczas realizacji eksperymentów oraz ciekawe dyskusje i wartościowe uwagi dotyczące nie tylko chemii organicznej

**dr Ewy Grudzień-Nogalskiej** oraz **dr Macieja Nogalskiego** za dużą pomoc i wsparcie (nie tylko merytoryczne) podczas stażu naukowego w Shreveport

**dr Joanny Żuberek** oraz **dr Macieja Łukaszewicza** za pomoc w badaniach biochemicznych

**Wei Su** oraz **Sergeya Slepenskova** za pomoc w czasie prowadzenia badań naukowych w LSU Health

**Jeffreya S. Mudridga** za życzliwość oraz pomoc w badaniach biochemicznych nad białkiem Dcp2 w UCSF

**dr Doroty Kubackiej** za pomoc oraz wartościowe uwagi merytoryczne

**Anny Nowickiej** oraz **Małgorzaty Waszczuk** za pomoc w pomiarach fluorescencji

**Dominiki Strzeleckiej** za pomoc w pomiarach spektrometrii mas

Wszystkich **Współautorów** publikacji za wspólny trud pracy naukowej oraz opracowania uzyskanych wyników

**Koleżanek i Kolegów** (zwłaszcza **Malwiny Strenkowskiej**, **Mai Cieplak-Rotowskiej** oraz **Przemysława Wanata**) z Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Zakładu Biofizyki, LSU Health oraz UCSF za owocną współpracę, wsparcie oraz pozytywne nastawienie

Wszystkich bliskich mi **Osób** za pomoc, życzliwość i wyrozumiałość podczas tego okresu

**Prof. dr hab. Edwarda Darzynkiewicza** za życzliwość i zainteresowanie prowadzonymi badaniami

**Prof. dr hab. Andrzeja Dziembowskiego** oraz **dr Mariusza Czarnockiego-Cieciury** za możliwość wykonania pomiarów DLS oraz pomoc w interpretacji wyników

**Prof. dr hab. Pawła Golika**, **Jakuba Piątkowskiego** oraz **Agnieszki Stelmachowskiej** za pomoc w oczyszczaniu i przygotowaniu białka Dcp2

**Prof. dr hab. Jana Antosiewicza** za możliwość wykonania pomiarów dichroizmu kołowego

**Fundacji na rzecz Nauki Polskiej** oraz **Narodowego Centrum Nauki** za wsparcie finansowego projektu

## STRESZCZENIE

Kap jest strukturą znajdującą się na 5' końcu eukariotycznego mRNA mającą istotną rolę w metabolizmie komórki. Białka usuwające strukturę kapu takie jak kompleks Dcp1/2 mają natomiast znaczącą funkcję w procesach degradacji mRNA. Jednak do tej pory ich mechanizm działania oraz sposoby regulacji aktywności nie zostały dokładnie poznane. Badania biochemiczne nad Dcp1/2 pokazały, że oddziałuje on specyficznie z m<sup>7</sup>GDP – produktem reakcji hydrolizy kapu. Zasugerowało to, że struktura m<sup>7</sup>GDP może być punktem wyjściowym dla syntezy nukleotydów mających większe powinowactwo do Dcp1/2, które mogą być wartościowymi narzędziami w badaniach biochemicznych. Przeprowadzono syntezę chemiczną oraz przebadano właściwości biologiczne serii analogów kapu opartych na strukturach nukleotydów takich jak m<sup>7</sup>GDP, m<sup>7</sup>GTP, oraz m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G. Związki te posiadają różnorodne modyfikacje w łańcuchu fosforanowym, takie jak grupa borano- lub tiofosforanowa, mające zwiększyć ich powinowactwo do białek wiążących kap. Otrzymano także szereg fluorescencyjnie znakowanych analogów kapu posiadające fluorofor o niewielkiej zawadzie sterycznej jako sondy molekularne w badaniach biofizycznych oraz narzędzia do syntezy fluorescencyjnego RNA. Po wykonaniu badań przesiewowych odkryto, że część z związków to inhibitory kompleksu Dcp1/2. Dalsze badania biochemiczne i strukturalne wykonano na najsilniejszym z inhibitorów (m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>ppp<sub>s</sub>m<sup>7</sup>G izomer D3). Eksperymenty NMR pokazały położenie miejsca wiążącego inhibitor oraz powinowactwo tego związku do Dcp2. Badania kinetyczne pokazały, że badany inhibitor wiąże się zarówno z wolnym enzymem jak i kompleksem ES. Zaobserwowano też, że analogi kapu o wydłużonym łańcuchu fosforanowym są hydrolizowane przez Dcp2. Inne badania biochemiczne pokazały, że część z uzyskanych analogów kapu wykazuje silne powinowactwo do białka inicjującego translację eIF4E oraz posiadają obniżoną podatność na degradację enzymatyczną. Otrzymane fluorescencyjne analogi kapu są pierwszymi tego rodzaju związkami, które są inkorporowane do RNA *in vitro*. Niektóre z nich są także selektywnie odporne na działanie enzymów dekapujących Dcp1/2 bądź DcpS. Wstępne rezultaty badań biochemicznych świadczą, że znakowane fluorescencyjnie analogi kapu mogą być pomocne w badaniach oddziaływań kap-białko. W pracy opisano także przykładowe zastosowania modyfikowanych chemicznie analogów kapu w badaniach nad degradacją eukariotycznego mRNA. W ramach tych badań wykorzystano egzogenne mRNA zawierające niehydrolizowany kap do śledzenia mechanizmów degradacji mRNA histonów w komórkach ssaczych. Dzięki temu poznano lepiej rolę Dcp1/2 w tym procesie oraz wpływ poliurydylacji 3' końca mRNA na jego stabilność.

## ABSTRACT

The cap is a structure located on 5' terminus of eukaryotic mRNA and it has a substantial role in cellular homeostasis. Hence proteins involved in cap removal, such as Dcp1/2 complex play a vital function in mRNA degradation. Nevertheless their mechanisms of both action and regulation remains obscure. Biochemical studies on Dcp2 protein have shown that Dcp2 interacts specifically with m<sup>7</sup>GDP (a product of the cap cleavage). It suggested that m<sup>7</sup>GDP structure could be a starting point for preparation of nucleotides displaying higher affinity to Dcp2, which could become valuable tools for biochemical research. A number of cap analogues based on m<sup>7</sup>GDP, m<sup>7</sup>GTP or m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G structures was synthesised and their biological properties were examined. These compounds possess a variety of chemical modifications in their phosphate chain, including tio- or boranophosphate groups, which are expected to increase their affinity to cap-interacting proteins. Furthermore, a set of fluorescently labelled cap analogues was also prepared. Since their fluorophores are very compact these nucleotides should be useful for preparation of fluorescent mRNA or as molecular probes. A screening assay revealed that some of prepared nucleotides are inhibitors of Dcp1/2. Further biochemical and structural researches were conducted using the most potent inhibitor (m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>ppp<sub>s</sub>m<sup>7</sup>G, isomer D3). NMR experiments allowed to unravel the nucleotide binding site and its affinity to Dcp2. Kinetic studies showed that the inhibitor is bind by both free enzyme and ES complex. It also have been observed that cap analogues with elongated phosphate chain are hydrolysed by Dcp2. Other biochemical studies showed that some of prepared cap analogues display high affinity to eIF4 translation factor and lower susceptibility to enzymatic degradation. Fluorescent cap analogues obtained in this study are the first such compounds which can be incorporated into RNA *in vitro*. Some of them are also selectively resistant to either Dcp2 or DcpS decapping enzymes. Preliminary biochemical experiments indicated that these fluorescent cap analogues could be applied to studies on cap-protein interactions. Exemplary applications of chemically modified cap analogues to study mRNA degradation was also described in this study. These experiments were based on usage of exogenous mRNA, containing a non-hydrolysable cap analogue, to monitor the degradation of histone mRNA in mammalian cells. Obtained results provided a better understanding of the role of Dcp2 in these processes and the influence of 3' mRNA uridylation on its stability.

# Spis treści

<b>WPROWADZENIE</b>	12
<b>Wykaz ważniejszych skrótów stosowanych w pracy</b>	14
<b>CZĘŚĆ LITERATUROWA</b>	16
<b>1.1. Przegląd prezentowanych zagadnień</b>	16
<b>1.2. Nukleotydy</b>	16
<b>1.2.1. Budowa</b>	16
<b>1.2.2. Nomenklatura</b>	17
<b>1.2.3. Struktura i rola biologiczna</b>	18
<b>1.2.3.1. Kwasy nukleinowe</b>	18
<b>1.2.3.2. Wolne nukleotydy</b>	18
<b>1.2.4.1. Wybrane metody wprowadzania grupy (oligo)fosforanowej w pozycję 5'</b>	18
<b>1.2.5. Modyfikacje chemiczne w łańcuchu fosforanowym</b>	20
<b>1.2.5.1. Ogólna charakterystyka</b>	20
<b>1.2.5.2. Reakcje substytucji nukleofilowej</b>	20
<b>1.2.5.3. Opis fizykochemiczny wybranych modyfikacji</b>	21
<b>1.2.5.3.1. Grupa tiofosforanowa</b>	21
<b>1.2.5.3.2. Grupa boranofosforanowa</b>	22
<b>1.2.5.3.2.1. Stabilność chemiczna grupy boranofosforanowej w roztworze</b>	23
<b>1.2.5.3.3. Stereochemia atomu fosforu</b>	23
<b>1.2.5.3.3.1. Przypisywanie konfiguracji absolutnej</b>	24
<b>1.2.5.3.4. Modyfikacje w pozycjach mostkowych</b>	25
<b>1.2.5.4. Metody syntezy</b>	26
<b>1.2.5.4.1. Metylenobisfosfonianowe analogi nukleotydów</b>	26
<b>1.2.5.4.2. Inne bisfosfoniany</b>	27
<b>1.2.5.4.3. Imidodifosforany</b>	27
<b>1.2.5.4.4. Tiofosforany</b>	28
<b>1.2.5.4.4.1. Monofosforany</b>	28
<b>1.2.5.4.4.2. Difosforany</b>	29
<b>1.2.5.4.4.3. Trifosforany</b>	30
<b>1.2.5.4.5. Boranofosforany</b>	32
<b>1.2.5.4.5.1. Monofosforany</b>	32
<b>1.2.5.4.5.2. Difosforany</b>	33
<b>1.2.5.4.5.3. Trifosforany</b>	35
<b>1.2.5.5. Właściwości biologiczne i zastosowania</b>	35
<b>1.2.5.5.1. Badania biochemiczne</b>	35
<b>1.2.5.5.2. Zastosowania medyczne</b>	36
<b>1.2.5.5.3. Modyfikowane kwasy nukleinowe</b>	37
<b>1.3. Fluorescencja i znaczniki fluorescencyjne</b>	37
<b>1.3.1. Podstawy technik fluorescencyjnych</b>	37
<b>1.3.1.1. Fizyka procesu wzbudzenia i emisji</b>	37
<b>1.3.1.2. Wydajności kwantowe i czas życia fluorescencji</b>	38
<b>1.3.1.3. Rezonansowy transfer energii (RET)</b>	39
<b>1.3.1.4. Spektroskopia czasowo-rozdzielcza</b>	40
<b>1.3.2. Znaczniki fluorescencyjne</b>	40
<b>1.3.2.1. Naturalnie występujące fluorofory</b>	40
<b>1.3.2.2. Syntetyczne fluorofory</b>	41
<b>1.3.2.2.1. Związki stosowane do kowalencyjnego znakowania makrocząsteczek</b>	41
<b>1.3.2.2.2. Znaczniki DNA i RNA</b>	42
<b>1.3.2.2.3. Fluorescencyjne analogi nukleozydów i nukleotydów</b>	42
<b>1.3.2.2.4. Metody fluorescencyjnego obrazowania RNA w komórkach</b>	44
<b>1.3.2.3. Nukleotydy znakowane grupą antranoilową i mantranoilową</b>	45
<b>1.3.2.3.1. Wprowadzanie znacznika</b>	45
<b>1.3.2.3.1. Struktura i właściwości</b>	45
<b>1.3.2.3.2. Zastosowania w badaniach biochemicznych i biofizycznych</b>	46
<b>1.4. Dynamika białek i wiązanie ligandów</b>	48
<b>1.4.1. Struktura białek</b>	48
<b>1.4.2. Dynamika konformacyjna białek</b>	49

1.4.2.1. Przyjmowanie struktur przestrzennych przez białka	49
1.4.2.2. Dynamika konformacyjna białek	50
1.4.3. Wiązanie ligandów przez białka	51
1.4.3.1. Termodynamika	51
1.4.3.2. Efekt allosteryczny	52
1.4.4. Metody badań dynamiki konformacyjnej	53
1.4.4.1. Wprowadzenie	53
1.4.4.2. Spektroskopia NMR	53
1.4.5. Kinetyka enzymatyczna	54
1.4.5.1. Podstawowe informacje o enzymach	54
1.4.5.2. Proste modele kinetyczne	54
1.4.5.3. Opis fizyczny procesu katalizy	55
1.4.5.3.1. Procesy elementarne w katalizie enzymatycznej	56
1.4.5.4. Teoria stanu przejściowego	56
1.4.5.5. Wyjście poza model indukcyjnego dopasowania	58
1.4.5.6. Dyskusja nad ogólnym mechanizmem działania enzymów	59
1.4.5.7. Inhibicja enzymów	59
1.4.5.7.1. Inhibicja odwracalna	60
1.4.5.7.1.1. Inhibicja współzawodnicząca	60
1.4.5.7.1.2. Inhibicja niewspółzawodnicząca	61
1.4.5.7.1.3. Inhibicja mieszana	61
1.4.5.7.1.4. Inhibicja anty-współzawodnicząca	61
1.4.5.7.1.5. Przypadki specjalne	61
1.4.5.7.2. Inhibicja nieodwracalna	62
1.4.5.7.3. Metody poszukiwania nowych inhibitorów	62
1.5 Struktura kapu i jej rola w komórce	63
1.5.1 Budowa i właściwości	63
1.5.1.1. Struktura i właściwości spektralne	63
1.5.1.2. Białka wiążące kap	64
1.5.1.3. Mechanizm wiązania kapu	65
1.5.2. Biosynteza i rola w komórce	66
1.5.2.1. Biosynteza	66
1.5.2.2. Splicing i transport mRNA do cytoplazmy	66
1.5.2.3. Inicjacja translacji	66
1.5.2.4. Ochrona mRNA przed degradacją	68
1.5.3.1. Budowa eukariotycznego mRNA	68
1.5.3.1.1. Sekwencja 5' UTR	68
1.5.3.1.2. Sekwencja kodująca	68
1.5.3.1.3. Sekwencja 3' UTR	68
1.5.3.1.4. Ogon poli(A)	68
1.5.3.2. Ogólny zarys degradacji mRNA w komórkach eukariotycznych	69
1.5.3.3. Główne mechanizmy degradacji cytoplazmatycznej	69
1.5.3.3.1. Regulacja stabilności mRNA i metody badań	71
1.5.3.3.2. Budowa ciałek P i ich rola w degradacji mRNA	71
1.5.3.4. Rola 3' końca w regulacji stabilności mRNA	72
1.5.3.5. Rola hydroliza kapu w regulacji stabilności mRNA	73
1.5.3.5.1. Enzymy odpowiedzialne za usuwanie kapu	73
1.5.3.5.2. Regulacja aktywności Dcp2	73
1.5.3.5.3. Cytoplazmatyczna degradacja kapu niezwiązana z Dcp2	74
1.5.3.5.4. Nieprawidłowo kapowane transkrypty i jądrowe mechanizmy kontroli jakości	75
1.5.3.6. Wybrane specyficzne ścieżki degradacji mRNA	75
1.5.3.6.1. Rozkład NMD	75
1.5.3.6.2. Inne mechanizmy kontroli jakości transkryptów	76
1.5.3.6.3. Rozkład kierowany przez elementy ARE i GRE	76
1.5.3.7. Urydynylacja mRNA	77
1.5.3.7.1. Niekanoniczne polimerazy poli(A)	77
1.5.3.7.2. Rozpowszechnienie w organizmach eukariotycznych	77
1.5.3.7.3. Rola fizjologiczna	77
1.5.3.7.4. Rola urydynylacji w kontroli stabilności mRNA	78

1.5.3.8. Metabolizm mRNA histonów	79
1.5.3.8.1. Informacje ogólne	79
1.5.3.8.2. Ekspresja genów histonów i translacja mRNA histonów	80
1.5.3.8.3. Translacja i regulacja stabilności histonowego mRNA	80
1.5.4. Struktura i funkcja białek hydrolizujących kap	82
1.5.4.1. Dcp2	82
1.5.4.1.1. Hydrolazy Nudix	82
1.5.4.1.2. Ogólna charakterystyka biochemiczna Dcp2	82
1.5.4.1.3. Struktura Dcp2	83
1.5.4.1.3.2. Ogólna charakterystyka	83
1.5.4.1.3.4. Podobieństwa do innych nukleaz	84
1.5.4.1.3.5. Domena Nudix i inne obszary zachowawcze w ewolucji	85
1.5.4.1.3.6. Rola domeny N-końcowej	85
1.5.4.1.3.7. Struktura kompleksu Dcp1-Dcp2	86
1.5.4.1.3.8. Mechanizm wiązania RNA	87
1.5.4.1.3.9. Kinetyka enzymatyczna	88
1.5.4.1.3.10. Wiązanie ATP przez Dcp2	88
1.5.4.1.3.11. Oddziaływanie Dcp2 z Dcp1	89
1.5.4.1.3.12. Dynamika konformacyjna i mechanizm działania kompleksu	90
1.5.4.1.3.12.1. Badania za pomocą technik dyfrakcyjnych	90
1.5.4.1.3.12.2. Wiązanie nukleotydów i centrum katalityczne	90
1.5.4.1.3.12.3. Badania za pomocą NMR	92
1.5.4.1.3.13. Oddziaływania Dcp1/2 z innymi białkami	94
1.5.4.1.3.14. Dcp2 jako cel terapeutyczny	94
1.5.4.1.4. Inne białka degradujące kap	95
1.5.4.1.4.1. Pirofosfataza DcpS	95
1.5.4.1.4.2. Inne białka z rodziny Nudix	96
1.5.4.1.4.3. Rai1 i białka spokrewnione	96
1.6 Otrzymywanie i zastosowania analogów kapu	97
1.6.1. Przegląd modyfikacji w łańcuchu fosforanowym	97
1.6.1.1. Modyfikacje w łańcuchu fosforanowym a odporność na degradację	97
1.6.2. Metody syntezy i oczyszczania	98
1.6.2.1. Aktywacja fosforanów	99
1.6.2.1.1. Imidazolowe pochodne fosforanów nieorganicznych	100
1.6.2.2. Sprzęganie jednostek fosforanowych	100
1.6.2.3. Metylacja guanozyny	101
1.6.2.4. Synteza dinukleotydowych analogów kapu	101
1.6.2.5. Metody oczyszczania i charakteryzacji analogów kapu	101
1.6.2.5.1. Wydzielanie i oczyszczanie nukleotydów	101
1.6.2.5.2. Charakteryzacja chemiczna	102
1.6.3. Właściwości biologiczne oraz wybrane zastosowania	103
1.6.3.1. Synteza RNA <i>in vitro</i> oraz jego wykorzystanie w badaniach biomedycznych.	103
1.6.3.1.1. Stabilizacja mRNA za pomocą analogów kapu	103
1.6.3.1.2. Wykorzystanie w terapiach genowych	104
1.6.3.1.3. Inhibicja translacji w komórkach nowotworowych	106
1.6.3.1.3.1. Podstawy biologiczne	106
1.6.3.1.3.2. eIF4E jako cel terapeutyczny	106
1.6.3.1.3.3. Analogi kapu jako inhibitory translacji – ogólne rozważania	106
1.6.3.1.3.4. Analogi kapu jako inhibitory translacji – wybrane przykłady	107
1.6.3.1.4. Fluorescencyjne analogi kapu	109
1.7 Metody stosowane w pracy doktorskiej	110
1.7.1. Techniki pracy z DNA i RNA	110
1.7.1.1. Podstawowe techniki inżynierii genetycznej	110
1.7.1.2. Izolacja i oczyszczanie RNA	110
1.7.1.3. Wysokorozdzielcza elektroforeza SDS PAGE	110
1.7.1.4. Transkrypcja <i>in vitro</i>	111
1.7.1.5. Translacja <i>in vitro</i>	111
1.7.2. Wybrane techniki pracy z komórkami	112
1.7.2.1. Nokauty genetyczne i wyciszanie genów	112

1.7.2.2. Wprowadzanie kwasów nukleinowych do komórek	112
1.7.3. Znakowanie izotopowe biopolimerów	112
1.7.3.1. Podstawowe rodzaje znaczników izotopowych	112
1.7.3.2. Radioaktywne znakowanie kwasów nukleinowych	112
1.7.3.3. Znakowanie białek na potrzeby spektroskopii NMR	113
1.7.4. Metody wykorzystujące absorbcję i fluorescencję białek	114
1.7.4.1. Fluorescencyjne reszty aminokwasowe	114
1.7.4.2. Właściwości fluorescencji białek	115
1.7.4.3. Miareczkowanie fluorescencyjne	116
1.7.5. Spektroskopia czasowo-rozdzielcza	116
1.7.5.1. Wprowadzenie do metody	116
1.7.6. Kinetyka enzymatyczna pojedynczego obrotu	117
1.7.6.1. Opis metody	117
1.7.6.2. Wykorzystanie w badaniach inhibicji	118
1.7.8. Spektroskopia NMR	119
1.7.8.1. Wprowadzenie teoretyczne	119
1.7.8.2. Wykorzystanie NMR w badaniach strukturalnych	120
1.7.8.3. Badanie oddziaływań białko-ligand za pomocą NMR	121
1.7.8.3.1. Zastosowania	121
1.7.8.3.2. Wybrane metody	121
1.7.9. Spektroskopia dichroizmu kołowego	123
1.7.9.1. Opis metody	123
1.7.9.2. Wykorzystanie w badaniach zmian konformacyjnych białek	123
1.7.10. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)	123
1.7.10.1. Opis teoretyczny	123
1.7.10.2. Zastosowania w badaniach białek	124
<b>BADANIA WŁASNE</b>	125
2.1. Założenia projektu doktoranckiego	125
2.2. Synteza chemiczna	125
2.2.1. Cele syntetyczne	125
2.2.2. Strategia syntezy analogów kapu	127
2.2.2.1. Ogólne uwagi o syntezie analogów kapu	127
2.2.2.2. Wydłużanie łańcucha fosforanowego w mononukleotydach	127
2.2.2.3. Synteza dinukleotydów zawierających mostek 5', 5' oligofosforanowy	127
2.2.2.4. Wprowadzanie modyfikacji chemicznych do struktury kapu	127
2.2.2.5. Rozdział diastereoizomerów	128
2.2.3. Opis syntezy analogów kapu	128
2.2.3.1. Informacje ogólne	128
2.2.3.2. Difosforany nukleozydów	128
2.2.3.2.1. Cel syntezy	128
2.2.3.2.2. Synteza m <sup>7</sup> GDP	128
2.2.3.2.3. Synteza związków z modyfikacjami mostkowymi	129
2.2.3.2.3.1. Synteza przez aktywne jednostki fosforanowe	129
2.2.3.2.3.2. Synteza poprzez aktywowane nukleozydy	130
2.2.3.2.3.3. Synteza aktywnych pochodnych dichloro- i difluorometylenobisfosfonianów	130
2.2.3.2. Trifosforany nukleozydów	131
2.2.3.2.1. Cel syntezy	131
2.2.3.2.2. Synteza m <sup>7</sup> GTP	131
2.2.3.2.3. Synteza związków z modyfikacjami mostkowymi	131
2.2.3.2.3.1. Syntezy z wykorzystaniem pochodnej <i>P</i> -imidazolowej β-cyjanofosforanu	132
2.2.3.2.4. Synteza związków z modyfikacjami niemoistkowymi	133
2.2.3.2.4.1. Syntezy z udziałem pochodnych <i>P</i> -imidazolowych difosforanów	133
2.2.3.2.4.1.1 Synteza pochodnych 1 <i>P</i> ,2 <i>P</i> -di(1-imidazolowych)	134
2.2.3.2.4.1.2 Synteza boranofosforanów	134
2.2.3.2.4.1.3. Synteza tiofosforanów	136
2.2.3.2.4.1.4. Synteza imidofosforanów i dichlorobisfosfonianów	137
2.2.3.3. Trifosforany dinukleozydów	138
2.2.3.3.1. Cel syntezy	138
2.2.3.3.2. Synteza chemiczna	138



2.2.3.4. Tetrafosforany dinukleotydów	138
2.2.3.4.1. Cel syntezy	138
2.2.3.4.2. Syntezy z udziałem <i>P1,P2</i> -bisfosforoimidazolidów	139
2.2.3.5. Analogi kapu znakowane fluorescencyjnie	141
2.2.3.5.1. Wybór znacznika fluorescencyjnego	141
2.2.3.5.2. Cel syntezy	142
2.2.3.5.3. Wprowadzanie znacznika fluorescencyjnego	142
2.2.3.5.4. Synteza znakowanych dinukleotydów	143
2.3. Właściwości fizykochemiczne i biochemiczne	145
2.3.1. Podstawowa charakterystyka fizykochemiczna	145
2.3.1.1. Stabilność chemiczna na zmiany pH	145
2.3.1.2. Spektroskopia NMR	146
2.3.1.2.1. Analogi $m^7GTP$ oraz $m^7Gppppm^7G$ .	146
2.3.1.2.2. Znakowane fluorescencyjnie analogi kapu	148
2.3.1.3. Stereochemia	150
2.3.1.4. Badania spektroskopowe UV-VIS	152
2.3.1.4.1. Analogi kapu modyfikowane w łańcuchu fosforanowym	152
2.3.1.4.2. Znakowane fluorescencyjnie analogi kapu	152
2.3.1.4.2.1. Informacje ogólne	152
2.3.1.4.2.2. Widma absorpcyjne	154
2.3.1.4.2.3. Widma emisyjne	154
2.3.2. Charakterystyka biochemiczna	156
2.3.2.1. Mononukleotydy	156
2.3.2.1.1. Odporność na degradację enzymatyczną	156
2.3.2.1.2. Wiązanie do eIF4E	157
2.3.2.1.3. Inhibicja translacji	158
2.3.2.1.4. Wiązanie się do DcpS oraz inhibicja tego enzymu	159
2.3.2.2. Dinukleotydy	160
2.3.2.2.1. Wiązanie do eIF4E	160
2.3.2.2.2. Stereoselektywna podatność na działanie DcpS	161
2.3.2.2.3. Inkorporacja do mRNA <i>in vitro</i>	161
2.3.2.2.3.1. Ogólna procedura	161
2.3.2.2.3.2. Tetrafosforanowe analogi $m^7Gppppm^7G$	162
2.3.2.2.3.3. Analogi fluorescencyjne	162
2.3.2.2.4. Odporność na Dcp2 <i>in vitro</i>	162
2.3.2.2.4.1. Wybór i przygotowanie białka	162
2.3.2.2.4.2. Opis metody	162
2.3.2.2.4.3. Tetrafosforanowe analogi $m^7Gppppm^7G$	163
2.3.2.2.4.4. Analogi fluorescencyjne	164
2.3.2.2.5. Translacja <i>in vitro</i>	164
2.3.2.2.5.1. Tetrafosforanowe analogi kapu	164
2.3.2.2.5.2. Analogi fluorescencyjne	165
2.3.2.2.6. Wykorzystanie fluorescencyjnych analogów kapu w badaniach biofizycznych	165
2.3.2.2.6.1. Doświadczenia modelowe	165
2.3.2.2.6.2. Proponowane zastosowania	166
2.4. Wykorzystania analogów kapu do badań biochemicznych	167
2.4.1. Analogi kapu jako narzędzia do badania kompleksu dekapującego Dcp1/2	167
2.4.1.1. Poszukiwanie nowych inhibitorów	167
2.4.1.1.1. Uzasadnienie i motywacja	167
2.4.1.1.2. Badania przesiewowe	168
2.4.1.1.2.1. Optymalizacja metody	168
2.4.1.1.2.2. Badania analogów kapu	168
2.4.1.2. Badania kinetyki inhibicji	171
2.4.1.2.1. Kinetyka w warunkach wielokrotnego obrotu	171
2.4.1.2.2. Kinetyka w warunkach pojedynczego obrotu	173
2.4.1.2.2.1. Opis metody	173
2.4.1.2.2.2. Badanie mechanizmu inhibicji	173
2.4.1.2.3. Aktywność katalityczna kompleksu SpDcp1/2 względem wolnych analogów kapu	175
2.4.1.2.3.1. Specyficzność substratowa SpDcp2	176

2.4.1.2.3.2. Miejsce hydrolizy mostka fosforanowego	177
2.4.1.2.3.3. Dalsza dyskusja i znaczenie uzyskanych wyników	177
2.4.1.3.1. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)	178
2.4.1.3.2. Dynamiczne rozpraszanie światła	178
2.4.1.3.3. Spektroskopia NMR	179
2.4.1.4. Poszukiwanie mechanizmu działania Dcp2	182
2.4.1.5. Dalsze badania strukturalne nad wiązaniem analogów kapu przez Dcp2	185
2.4.2. Badania ścieżek degradacji histonowego mRNA przy użyciu reporterowego mRNA	186
2.4.2.1. Wprowadzenie	186
2.4.2.2. Wpływ elementów strukturalnych na 3' i 5' końcach RNA na jego stabilność	186
2.4.2.3. Translacja i stabilność egzogenego histonowego mRNA	187
2.4.2.4. Destabilizacja histonowego mRNA przez hydroksymocznik.	188
2.4.2.6. Badania oligourydylacji histonowego mRNA	188
2.4.2.7. Wpływ białek PAPD5 i ZCCHC11 na stabilność histonowego mRNA	189
2.5. Podsumowanie badań własnych	193
<b>MATERIAŁY I METODY</b>	195
3.1. Synteza organiczna	195
3.1.1. Podstawowe odczynniki i reagenty	195
3.1.2. Przygotowanie soli trietyloamoniowych:	195
3.1.3. Metody chromatograficzne	195
3.1.3.1. Chromatografia adsorpcyjna	195
3.1.3.2. Chromatografia jonowymienna:	195
3.1.3.3. Chromatografia RP-HPLC:	196
3.1.4. Potwierdzenie struktury związków	197
3.1.5. Syntezy organiczne	197
3.1.5.1. Nukleozydy:	197
3.1.5.2. Fosforany i ich pochodne	199
3.1.5.2.1. Ogólna procedura syntezy diimidazolowych pochodnych difosforanów nieorganicznych	200
3.1.5.3. Nukleotydy	201
3.1.5.3.1. Pochodne imidazolowe nukleotydów:	201
3.1.5.3.2. Selektywna reakcja metylowania w pozycji N7	202
3.1.5.3.3. Monofosforany nukleotydów:	202
3.1.5.3.4. Difosforany nukleotydów:	205
3.1.5.3.5. Trifosforany nukleotydów:	208
3.1.5.3.6. Dinukleotydowe analogi kapu	213
3.1.5.3.7. Znakowane fluorescencyjnie nukleotydy	219
3.1.5.3.7.1. Syntezy dinukleotydowych analogów kapu znakowanych fluorescencyjnie	222
3.2. Badania fizykochemiczne	226
3.2.1. Badania fluorescencyjnie znakowanych analogów kapu.	226
3.2.1.1. Wyznaczanie charakterystyki spektralnej badanych związków	226
3.2.1.2. Pomiary czasów życia fluorescencji	226
3.2.2. Pomiary NMR	226
3.3. Badania biochemiczne	227
3.3.1. Materiały i odczynniki	227
3.3.1.1. Powszechnie stosowane bufory	227
3.3.1.2. Przygotowanie białek do badań biochemicznych i biofizycznych.	228
3.3.1.2.1. eIF4E	228
3.3.1.2.2. hDcpS	228
3.3.1.2.3. SpDcp1/2	229
3.3.1.2.4. SpDcp1	229
3.3.1.2.5. Domeny Dcp2 (ScDcp <sub>1-99</sub> , ScDcp <sub>100-245</sub> , SpDcp <sub>1-93</sub> , SpDcp <sub>94-243</sub> )	230
3.3.1.3. Przygotowanie białek znakowanych izotopowo do pomiarów NMR	230
3.3.1.3.1. SpDcp2 <sub>1-243</sub> (znakowanie <sup>2</sup> H oraz <sup>15</sup> N)	230
3.3.1.3.2. SpDcp2 <sub>1-93</sub> (znakowanie <sup>15</sup> N)	231
3.3.1.3.3. SpDcp2 <sub>94-243</sub> (znakowanie <sup>15</sup> N)	231
3.3.1.4. Synteza krótkich transkryptów RNA znakowanych radioaktywnie <i>in vitro</i>	231
3.3.2. Pomiary spektroskopowe białek	232
3.3.2.1. Spektroskopia fluorescencyjna	232
3.3.2.1.1. Wyznaczanie stałych dysocjacji do białek eIF4E i DcpS	232

3.3.2.2. Spektroskopia dichroizmu kołowego kompleksu SpDcp1/2	232
3.3.2.3. Spektroskopia NMR kompleksu SpDcp1/2	232
3.3.3. Badania enzymatyczne	233
3.3.3.1. Pomiary odporności na degradację enzymatyczną	233
3.3.3.1.1. Degradacja analogów kapu przez DcpS	233
3.3.3.1.2. Degradacja analogów kapu przez Dcp1/2	233
3.3.3.1.3. Stabilności analogów kapu w roztworze FBS	233
3.3.3.1.4. Reakcji dekapingu prowadzona przez SpDcp2	234
3.3.3.2. Poszukiwanie inhibitorów SpDcp1/2	234
3.3.3.3. Kinetyka inhibicji SpDcp1/2 w przybliżeniu Michaelisa-Menten	234
3.3.3.4. Kinetyka inhibicji SpDcp1/2 w przybliżeniu pojedynczego obrotu	235
3.3.4. Badania wydajności translacji	235
3.3.4.1. Wydajność translacji kapowanego mRNA lucyferazy w RRL w układzie <i>in vitro</i>	235
3.3.4.2. Inhibicja translacji kapowanego mRNA lucyferazy w RRL w układzie <i>in vitro</i>	236
3.3.5. Inne badania biochemiczne	236
3.3.5.1. Pomiary DLS	236
3.3.5.2. Krystalizacja kompleksów Dcp2 z nukleotydami	236
3.3.5.3. Wizualizacja i analiza struktur makrocząsteczek	237
<b>BIBLIOGRAFIA:</b>	240

# WPROWADZENIE

Niniejsza praca doktorska poświęcona jest syntezie chemicznej, badaniom właściwości fizykochemicznych oraz biochemicznych, a także wykorzystaniem w badaniach biologicznych nukleotydów będących analogami struktury 5' mRNA kapu.

Kap jest nietypową strukturą znajdującą się na 5' końcu transkryptów syntezowanych przez polimerazę RNA II takich jak mRNA lub snRNA. Obecność kapu ma fundamentalne znaczenie dla funkcjonalności mRNA ponieważ bierze on udział w większości etapów obróbki mRNA oraz inicjacji translacji. Ponadto jest on konieczny jest w ochronie mRNA przed degradacją enzymatyczną. Dlatego też białka hydrolizujące strukturę kapu takie jak kompleks Dcp1/2 i pirofosfotataza DcpS odgrywają istotną rolę w procesach degradacji mRNA. Do tej pory zarówno katalityczny mechanizm działania jak i sposoby regulacji aktywności tych enzymów nie zostały dokładnie poznane, cały czas dokonuje się na tym polu nowych odkryć. Dlatego też istnieje zapotrzebowanie na związki chemiczne mogące zostać wykorzystane do badań zarówno nad wspomnianymi enzymami jak i całymi ścieżkami degradacji mRNA w organizmach eukariotycznych.

Związki chemiczne posiadające strukturę opartą na budowie naturalnie występującego kapu (analogi kapu) już teraz są pomocnymi narzędziami w badaniach nad biologią mRNA. Zostały one wykorzystane m.in. w poszerzeniu wiedzy na temat translacji mRNA oraz ścieżek jego degradacji. Wiele z tych związków wykazało takie interesujące cechy jak zwiększone powinowactwo do białek wiążących kap lub poprawioną odporność na degradację enzymatyczną. Ponadto, wcześniejsze badania biochemiczne nad białkiem Dcp2 pokazały, że oddziałuje ono specyficznie z  $m^7GDP$  – produktem reakcji hydrolizy kapu. Wyniki te zasugerowały, że struktura  $m^7GDP$  może być dobrym punktem wyjściowym w syntezie nukleotydów mających większe powinowactwo do Dcp1/2. Takie związki mogłyby być także inhibitorami tego enzymu będąc przez to pomocnymi narzędziami w zrozumieniu jego mechanizmu działania oraz oddziaływać z innymi białkami. Oparte o strukturę kapu inhibitory innych enzymów dekapujących, takich jak DcpS, także mogą być cenną pomocą w badaniach biochemicznych.

Podczas realizacji projektu doktorskiego przeprowadzono syntezę chemiczną oraz przebadano właściwości biologiczne serii modyfikowanych analogów kapu opartych na strukturach nukleotydów takich jak  $m^7GDP$ ,  $m^7GTP$ , oraz  $m^7Gppppm^7G$ . Związki te posiadają różnorodne modyfikacje w łańcuchu fosforanowym, takie jak wprowadzenie grupy borano- lub tiofosforanowej. W wielu wypadkach ich synteza wymagała opracowania nowych metod syntetycznych lub udoskonalenia istniejących poprzednio technik. Dodatkowym celem pracy było otrzymanie szeregu fluorescencyjnie znakowanych analogów kapu posiadające fluorofor o niewielkiej zawadzie sterycznej. Związki te w zamierzeniu miały zostać mogą wykorzystane do przygotowywania wyznakowanego fluorescencyjnie RNA oraz jako sondy fluorescencyjne w badaniach biofizycznych nad wiązaniem się kapu do białek. Sumarycznie podczas realizacji pracy uzyskano sumarycznie 29 nowych analogów kapu.

Natomiast głównym celem wykonanych badań biochemicznych było ustalenie czy otrzymane związki wykazują działanie inhibitorowe względem kompleksu białkowego Dcp1/2 lub białka DcpS. Po przeprowadzeniu badań przesiewowych odkryto, że szereg z przebadanych związków ma zdolność do inhibicji kompleksu enzymatycznego Dcp1/2. Dalsze badania biochemiczne i strukturalne wykonane na najsilniejszym z inhibitorów ( $m^7Gp_sppp_s m^7G$  izomer D3) miały na celu zrozumienie mechanizmu działania tych tego związku. Badania przy użyciu NMR pomogły w poznaniu miejsc wiążących inhibitory oraz wyznaczeniu ich powinowactwa do poszczególnych domen Dcp2. Natomiast badania kinetyczne pokazały, że mechanizm inhibicji jest złożony, obejmuje wiązanie zarówno przez wolny enzym jak i kompleks enzym-substrat. Wcześniej uważano, że Dcp2 wiąże się jedynie z mRNA i nie przypuszczano, że analogi strukturalne kapu mogą być silnie i specyficznie wiązane przez to białko. Innym ważnym odkryciem była obserwacja, że analogi kapu o wydłużonym łańcuchu fosforanowym są w istocie hydrolizowane przez Dcp2, dawniej uważano, że jedynie struktura kapu dołączona do mRNA może być substratem dla Dcp2. W czasie wykonywania pracy nie udało się jeszcze poznać mechanizmu odpowiedzialnego za ten proces, jednakże bez wątpienia wiedza ta znajdzie zastosowanie w poszukiwaniu selektywnych inhibitorów tego enzymu. Ponadto oceniono przydatność wybranych związków w syntezie kapowanego RNA oraz potencjał

do inhibicji translacji. Charakterystyka biochemiczna pokazała, że nowo otrzymane analogi kapu z modyfikacjami w łańcuchu fosforanowym wykazują silne powinowactwo do białka inicjującego translację eIF4E oraz posiadają zwiększoną odporność na degradację enzymatyczną.

Dodatkowym celem badań biochemicznych prowadzonych w pracy była ocena potencjału otrzymanych sond fluorescencyjnych opartych na strukturze kapu w badaniach biochemicznych. Dowiedziono, że te analogi kapu są inkorporowane do RNA *in vitro* co pozwala na otrzymanie transkryptów selektywnie znakowanych fluorescencyjnie na 5' końcu. Są to pierwsze związki tego rodzaju, bowiem wcześniej opisane fluorescencyjne analogi kapu nie mogły zostać zastosowane do syntezy tak znakowanego RNA. Co więcej niektóre z uzyskanych tutaj analogów są selektywnie odporne na działanie Dcp1/2 bądź DcpS, co może natomiast znaleźć zastosowanie w badaniach nad mechanizmem działania tych białek. Uzyskane tutaj wstępne rezultaty badań biochemicznych nad białkami DcpS oraz eIF4E są zachęcające do dalszej eksploracji zagadnienia znakowanych analogów kapu.

Odporne na działanie enzymów analogi kapu mają także potencjał do zastosowania w badaniach ścieżek degradacji mRNA w komórkach, a nawet całych organizmach. Przykładem tego mogą być opisane w pracy badania nad degradacją histonowego mRNA w komórkach ssaczych. W ramach tego projektu przeprowadzono analizę stopnia degradacji egzogenego mRNA zawierającego strukturę kapu, która znacznie zwiększa jego stabilność w komórce. Badania te pomogły w zrozumieniu roli Dcp1/2 w degradacji histonowego mRNA oraz wpływu poliurydylacji 3' końca mRNA na jego stabilność. Ponadto stanowią one dowód na rosnący znaczenie modyfikowanych chemicznie analogów kapu w badaniach biologicznych.

Podsumowując, badania wykonane podczas realizacji pracy doktorskiej pozwoliły na poszerzenie zarówno metod syntezy analogów kapu jak i spektrum ich zastosowań w badaniach metabolizmu mRNA ze szczególnych uwzględnieniem mechanizmów jego degradacji. Uzyskano szereg związków będących pierwszymi znanymi inhibitorami kompleksu enzymatycznego Dcp1/2 oraz rozpoczęto badania nad ich mechanizmem działania. Opisano także pierwsze analogi kapu znakowane fluorescencyjnie, które mogą zostać włączone do mRNA w procesie transkrypcji *in vitro*. Na szeregu przykładów pokazano, że zarówno fluorescencyjne jak i odporne na degradację analogi kapu mają duży potencjał jako narzędzia w badaniach biochemicznych i biologicznych nad białkami i procesami zaangażowanymi w obieg mRNA organizmów eukariotycznych.

## Wykaz ważniejszych skrótów stosowanych w pracy

3'UTR – niekodujący region przy 3' końcu (ang. *3' Untranslated Region*)  
4-DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna  
5'UTR – niekodujący region przy 5' końcu (ang. *5' Untranslated Region*)  
ACN – acetonitryl  
ADP – adenozydodifosforan  
AMPS – adenozydomonotiofosforan  
Ant – grupa antranoilowa  
ARCA – analog kapu niepodatny na inkorporację od odwrotnej strony (ang. *Anti-reverse Cap Analogue*)  
ATP - adenozyotrifosforan  
BSA- bis(trimetylosilyl)acetamid  
BTH – „dwugłowy” boranowy analog kapu (ang. *Borane Two-headed Cap Analogue*)  
CAP – białko aktywujące katabolitem (ang. *Catabolite Activate Protein*)  
CBC – kompleks wiążący kap (ang. *Cap Binding Complex*)  
CDI – karboksy(diimidazol)  
cDNA – kodujące DNA (ang. *coding DNA*)  
CPMG – Car-Purcell-Meiboom-Gill (sekwencja pulsów w NMR)  
DBU – 1.8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en  
Dcp1/2 – kompleks dekapujący Dcp1/2 (ang. *Decapping complex*)  
DcpS – białko dekapujące DcpS (ang. *Decapping Scavenger*)  
DLS – dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering*)  
DMF – dimetyloformamid  
DMSO – dimetylosulfotlenek  
dsDNA – podwójna nić DNA (ang. *double stranded DNA*)  
DTDP – ditiodipirydyna  
eIF4E – eukariotyczny czynnik inicjujący 4E (ang. *Eukaryotic Initiation Factor 4E*)  
EtOH – alkohol etylowy  
EVH1 – domena białkowa o homologii do VASP (ang. *Enabled/VASP Homology 1 Domain*)  
FBS – płodowe osocze bydłce (ang. *Fetal Bovine Serum*)  
FRET – transfer rezonansowy energii Förstera (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*)  
GDP – guanozyotrifosforan  
GMP – guanozyomonofosforan  
GTP – guanozyotrifosforan  
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)  
HSQC – hetero-pojedyncza korelacja kwantowa (ang. *Hetero Single Quantum Correlation*)  
HU - hydroksymocznik  
IC<sub>50</sub> – stężenie o połowie maksymalnej siły inhibitorowej (ang. *Half Maximal Inhibitory Concentration*)  
iDC – niedojrzała komórka dendrytyczna (ang. *immature Dendritic Cell*)  
IRES – wewnętrzne miejsce przyłączania rybosomu (ang. *Internal Ribosome Entry Site*)  
m<sup>7</sup>GDP – difosforan 7-metyloguanozyny  
m<sup>7</sup>GMP – monofosforan 7-metyloguanozyny  
m<sup>7</sup>GTP – trifosforan 7-metyloguanozyny  
Mant – grupa mantranilowa (*N*-metyloantranilowa)  
MeOH – alkohol metylowy  
miRNA – mikro RNA (ang. *micro RNA*)  
MMG – monometylowany kap  
mRNP – matrycowa rybonukleoproteina (ang. *messenger Ribonucleoprotein*)  
MS – spektrometria mas (ang. *Mass Spectrometry*)  
NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona)

NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma zredukowana)  
 ncRNA – niekodujący RNA (ang. *non-coding RNA*)  
 NDKP – kinaza difosforanów nukleozydów (ang. *Nucleoside Diphosphate Kinase*)  
 NDP – difosforan nukleozydu  
 NMP – monofosforan nukleozydu  
 NMR – jądrowy rezonans magnetyczny (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*)  
 NOE – jądrowy efekt Overhausera (ang. *Nuclear Overhauser Effect*)  
 NTP – trifosforan nukleozydu  
 ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *Open Reading Frame*)  
 PABP – białko wiążące ogon poli(A) (ang. *Poly(A) Binding Protein*)  
 PAGE – żelowa elektroforeza w poliakrylamidzie (ang. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)  
 PARN – rybonukleaza specyficzna względem poli(A) (ang. *Poly(A)-specific Ribonuclease*)  
 PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *Phosphate Buffered Saline*)  
 PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)  
 PDB – baza danych struktur białkowych (ang. *Protein Database*)  
 PKA – kinaza białkowa A (ang. *Protein Kinase A*)  
 Q – wydajność kwantowa fluorescencji  
 qRT-PCR – ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative Real Time PCR*)  
 RMSD – (ang. *Root Mean Square Deviation*)  
 RNAi – interferencja RNA (ang. *RNA interference*)  
 RP HPLC – HPLC w układzie odwrotnych faz (ang. *Reverse Phase HPLC*)  
 RRL – lizat z króliczych retikulocytów (ang. *Rabbit Reticulocyte Lysate*)  
 SAXS – rozpraszanie rentgenowskie pod małym kątem (ang. *Small Angle X-ray Scattering*)  
 SDS – laurylosiarczan sodu (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate*)  
 shRNA – RNA typu pojedynczej spinki (ang. *single hairspin RNA*)  
 siRNA – krótkie interferujący RNA (ang. *small interfering RNA*)  
 SLBP – białko wiążące pojedynczą pętlę (ang. *Single Loop Binding Protein*)  
 SMA – rdzeniowy zanik mięśni (ang. *Spinal Muscular Atrophy*)  
 snoRNA – małe jąderkowe RNA (ang. *small nucleolar RNA*)  
 snRNA – małe jądrowe RNA (ang. *small nuclear RNA*)  
 snRNP – mała jąderkowa rybonukleoproteina (ang. *Small Nuclear Ribonucleoprotein*)  
 ssDNA – pojedyncza nić DNA (ang. *single strand DNA*)  
 SVPDE – fosfordiesteraza z jadu węża (ang. *Snake Venom Phosphodiesterase*)  
 TBA – tributylamina  
 TEA – trietyloamina  
 TEAA – octan trietyloaminy (bufor)  
 TEAB – wodorowęglan trietyloaminy (bufor)  
 TL – poczwórna pętla (ang. *Tetra Loop*)  
 TMBP – tymidynomonoboranofosforan  
 TMG - trimetylokap  
 TMP – tymidonomonofosforan  
 TNP – grupa trinitrofenylowa  
 TsCl – chlorek tosyłu  
 TST – miareczkowanie fluorescencyjne synchronizowane w czasie (ang. *Time Synchronized Titration*)  
 TUTaza – terminalna transferaza urydylowa  
 UTP – urydynotrifosforan  
 UV/VIS – spektroskopia w świetle ultrafioletowym i widzialnym

Inne skróty zostały wyjaśnione w tekście

# CZEŚĆ LITERATUROWA

## 1.1. Przegląd prezentowanych zagadnień

Jednym z głównych celów pracy doktorskiej był rozwój metod syntetycznych stosowanych w chemii nukleotydów dlatego też Rozdział 1.2 przedstawia w zarysie strukturę i rolę biologiczną nukleotydów. Następnie omawiane są wybrane metody syntezy tych związków. Na końcu rozdziału przedstawiono charakterystykę wybranych modyfikacji w łańcuchu fosforanowym – właściwości fizykochemiczne, metody wprowadzania do cząsteczek nukleotydów oraz zastosowania tak zmodyfikowanych związków. Z uwagi na to, że część z otrzymanych w czasie realizacji doktoratu związków jest znakowana fluorescencyjnie w Rozdziale 1.3 omówiono krótko znaczniki fluorescencyjne ze szczególnym naciskiem na znakowanie nukleotydów oraz wykorzystanie fluoroforów o niedużej masie cząsteczkowej w badaniach biochemicznych.

Pośród modyfikowanych chemicznie nukleotydów uzyskanych podczas realizacji projektu doktoranckiego większość wykorzystano w badaniach biochemicznych i biofizycznych nad wiążącymi je białkami. Dlatego też Rozdział 1.4 zadedykowany jest chemii fizycznej białek. Przedstawiono w nim podstawy budowy i dynamiki strukturalnej białek oraz wiązanie ligandów. Następnie opisano podstawy katalizy enzymatycznej, kinetykę enzymatyczną oraz rolę dynamiki strukturalnej w procesach katalitycznych. Ponadto omówiono wybrane metody (z naciskiem na spektroskopię NMR) stosowane w takich badaniach.

Większość nukleotydów uzyskanych podczas realizacji pracy to syntetyczne analogi 5' mRNA kapu i z uwagi na to Rozdział 1.5 jest zadedykowany roli struktury kapu w komórce. Przedstawiono właściwości fizykochemiczne tej grupy oraz jej znaczenie w metabolizmie RNA ze szczególnym uwzględnieniem procesów degradacji mRNA. Dalej omówiono biologię strukturalną oraz molekularną białek degradujących kap koncentrując się przede wszystkim na kompleksie Dcp1/2. Rozdział 1.6 omawia metody syntezy syntetycznych analogów kapu oraz ich zastosowania. Natomiast ostatni Rozdział 1.7 omawia krótko techniki badawcze bezpośrednio związane z badaniami prowadzonymi podczas realizacji rozprawy doktorskiej.

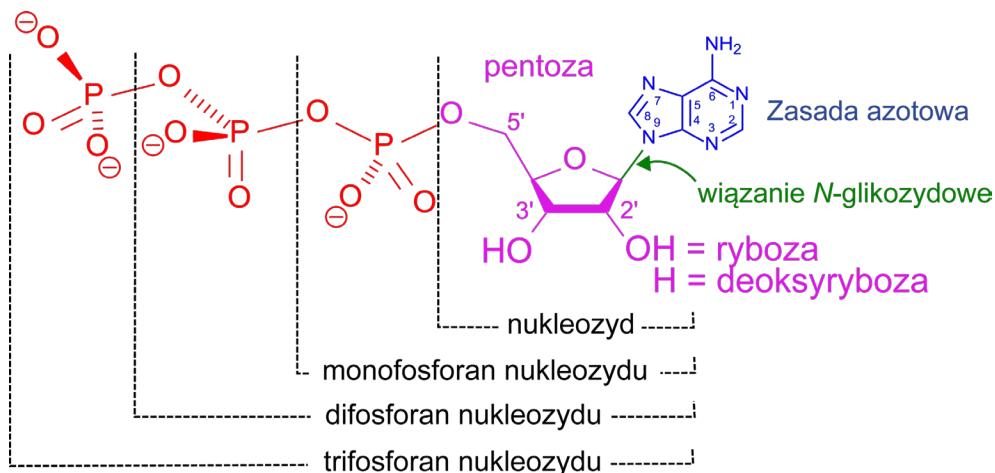
## 1.2. Nukleotydy

### 1.2.1. Budowa

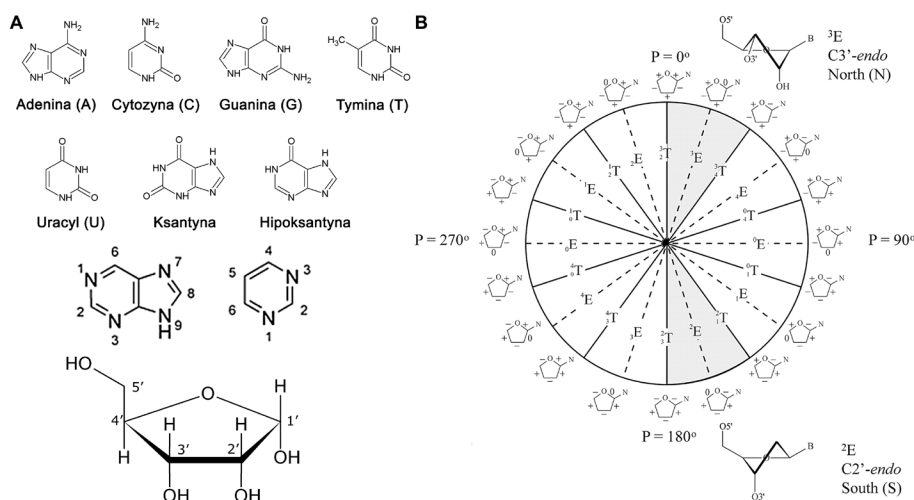
Nukleotydy to naturalnie występujące związki organiczne będące monomerami budującymi kwasy nukleinowe. Każdy nukleotyd zbudowany jest z organicznej zasady azotowej, pięciowęglowego cukru w formie pierścieniowej oraz co najmniej jednej grupy fosforanowej. Związek pozbawiony fosforanu nazywany jest nukleozydem (**Rys. 1.1**). Występujące w przyrodzie nukleotydy zawierają jedną z dwóch pentoz (**Rys. 1.2**). Deoksyrybonukleotydy, będące składnikami DNA zawierają 2'-deoksyrybozę natomiast rybonukleotydy, będące składnikami RNA zawierają rybozę. W obydwu przypadkach przeważającą formą, w której występują te sacharydy stanowi  $\beta$ -furanosa, tworząca pięcioczłonowy, heterocykliczny pierścień.<sup>1</sup>

Prowadzono wiele badań na temat konformacji nukleotydów, zwłaszcza pierścienia cukrowego. Z powodu występowania naprężeń sterycznych cykliczna struktura tego pierścienia nie jest planarna ale występuje pod postacią zbioru wzajemnie przechodzących w siebie konformacji. Równowaga konformacyjna opisywanego układu jest stosunkowo skomplikowana, dokładniejszy opis został sporządzony pierwotnie dla pierścienia pentanu, następnie zaproponowano mechanizm pseudorotacji układu furazonowego w cukrach. Zastosowanie tego modelu, przy wprowadzeniu zredukowanych parametrów geometrycznych opisujących pierścień pozwala na wyróżnienie zbioru 12 przechodzących w siebie konformacji o niedużych różnicach w wartości energii potencjalnej (**Rys. 1.2B**). Zakłada się, że w standardowych warunkach fizjologicznych pierścień rybozy nukleozydów przyjmuje jedną z dwóch skręconych konformacji, w przypadku każdej z nich, cztery z pięciu atomów znajdują się w jednej płaszczyźnie a piąty atom (C-2' lub C-3') znajduje się po tej samej stronie wymienionej płaszczyzny co atom C-5' lub po stronie przeciwnej (**Rys. 1.2B**). Pierwsza z wymienionych aranżacji atomów nazywana jest konformacją C3'-*endo* (North, N) natomiast druga konformacją C2'-*endo* (South, S).<sup>2</sup>





**Rys. 1.1.** Budowa nukleozydów i nukleotydowych na przykładzie pochodnych adeniny. Zaczerpnięto i zmodyfikowano z WikiCommons.



**Rys. 1.2.** Elementy budulcowe naturalnie występujących nukleozydów. (A) Pospolite typy zasad azotowych obserwowanych w naturze. Pięć z nich (A, C, G, T, U) występuje regularnie w RNA i DNA (górze), przedstawiono także schemat numeracji atomów w pierścieniu purynowym (środek, lewo) oraz pirymidynowym (środek, prawo). Na dole pokazano schemat numeracji w pierścieniu cukrowym. (B) Równowagi konformacyjne w pierścieniu rybozy w oparciu o model pseudorotacji pierścienia. Pokazano także najbardziej stabilne i rozpowszechnione typy konformacji (C3'-endo oraz C2'-endo). Zaczerpnięto i zmodyfikowano z WikiCommons oraz *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 2975-2989.

### 1.2.2. Nomenklatura

Z powodu skomplikowanych systematycznych nazw nukleotydów wprowadza się konwencje pozwalające na zapisanie nazwy związku w skróty i jednoznaczny sposób co można zobrazować na przykładzie. Związek o formalnej nazwie 5'-*O*-trifosforan adenozyne składa się z adeniny połączonej wiązaniem *N*-glikozydowym z atomem węgla C1' w pierścieniu rybozy, do którego grupy 5' hydroksylową dołączony jest liniowy trifosforan. Opisany związek może zostać zapisany jako ATP, gdzie A oznacza skrót literowy zasady azotowej, natomiast TP trifosforan. W podobny sposób można zapisać analogiczny związek będący difosforanem jako ADP a monofosforan jako AMP.

Zgodnie z oficjalnymi zaleceniami IUPAC w zakresie chemii bioorganicznej w przypadku 5'-*O*-fosforanów powinno stosować się konwencję zapisu w której grupy budujące łańcuch fosforanowy znajdują się po lewej stronie wzoru. W myśl tej konwencji ATP może zostać zapisany jako pppA, gdzie litera p oznacza pojedynczą grupę fosforanową w łańcuchu. Stosując tę konwencję można łatwo oznaczyć modyfikacje w łańcuchu fosforanowym. Przykładowo ATP zmodyfikowany przez podstawienie jednego z niemostrkowych atomów tlenu w grupie fosforanowej  $\alpha$  siarką może zostać zapisany jako pp<sub>s</sub>A. Jednakże dla większej klarowności w literaturze często rezygnuje się z tego

zalecenia na korzyść konwencji przedstawiającej skład łańcucha fosforanowego po prawej stronie, gdzie ATP jest przedstawiany jako Appp. Taki sposób zapisu będzie dalej stosowany w reszcie tekstu.

### 1.2.3. Struktura i rola biologiczna

#### 1.2.3.1. Kwasy nukleinowe

Kwasy nukleinowe pełnią kluczowe role w żywej komórce, ponieważ są konieczne do przechowywania i ekspresji informacji genetycznej. Zarówno DNA jak i RNA zawierają dwie podstawowe zasady purynowe, jakimi są adenina (A) oraz guanina (G) oraz dwie podstawowe zasady pirymidynowe (**Rys. 2A**). W obydwu typach kwasów nukleinowych jedną z tych zasad jest cytozyna (C), drugą zasadą pirymidynową jest w przypadku DNA tymina (T) a w przypadku RNA jest nią uracyl (U). Jednakże w pojedynczych przypadkach odnotowano udział T w RNA oraz U w DNA. Obecność dodatkowej grupy hydroksylowej w szkielecie RNA czyni go bardziej podatnym na hydrolizę zasadową niż DNA.<sup>1</sup>

Nukleotydy budujące kwasy nukleinowe są połączone ze sobą poprzez wiązania fosfodiesterowe gdzie grupa 5' fosforanowa jednego meru jest wiązana z grupą 3' hydroksylową następnego meru. Zasady azotowe stanowią ugrupowania boczne odchodzące od szkieletu fosforowego i w przypadku naturalnie występującej struktury DNA są one skierowane do środka formowanej helisy podczas gdy grupy fosforanowe eksponowane są na zewnątrz cząsteczki. W warunkach fizjologicznych grupy fosforanowe kwasów nukleinowych są niemal całkowicie zjonizowane, gdyż ich  $pK_a$  wynosi w przybliżeniu zero. Ujemne ładunki są neutralizowane na drodze elektrostatycznych oddziaływań z kationami pojedynczo- i dwuwartościowymi metali oraz dodatnio naładowanymi białkami. Wszystkie wiązania fosfodiesterowe w danym łańcuchu RNA lub DNA mają taką samą orientację, co prowadzi do specyficznej polarności cząsteczki i wyróżnienia w niej specyficznych końców 3' oraz 5'. Z definicji dany koniec (3' lub 5') nie posiada związanego nukleotydu do wymienionej w nazwie grupy hydroksylowej. Na drodze powszechnie przyjętej konwencji sekwencja danej nici kwasu nukleinowego jest zawsze zapisywana od końca 5' po lewej stronie i końca 3' po prawej stronie, co może zostać schematycznie przedstawione jako 5'-3'.<sup>1</sup>

#### 1.2.3.2. Wolne nukleotydy

Występujące naturalnie w stanie wolnym nukleotydy stanowią źródło energii chemicznej dla wielu procesów metabolicznych (ATP, GTP), ważne przekaźniki w komórkowych ścieżkach transdukcji sygnału (cAMP) a także kofaktory w reakcjach enzymatycznych takie jak NAD i NADP.<sup>1,3</sup>

### 1.2.4. Chemiczna synteza nukleotydów

Obecnie istnieje bardzo wiele metod syntezy nukleotydów oraz ich pochodnych. Charakterystykę i zastosowanie metod można znaleźć w szeregu prac przeglądowych i podręczników.<sup>4-6</sup> Tutaj zostanie zaprezentowany jedynie skromny wycinek metod opisujących syntezy fosforanów nukleotydów. W kolejnym rozdziale więcej uwagi zostanie poświęcone właściwościom modyfikacji grupy fosforanowej i metodą ich wprowadzania. Ponadto rozdział 1.6 zawiera dodatkowe informacje na temat specyficznych metod syntetycznych stosowanych w przypadku analogów 5' mRNA kapu.

#### 1.2.4.1. Wybrane metody wprowadzania grupy (oligo)fosforanowej w pozycję 5'

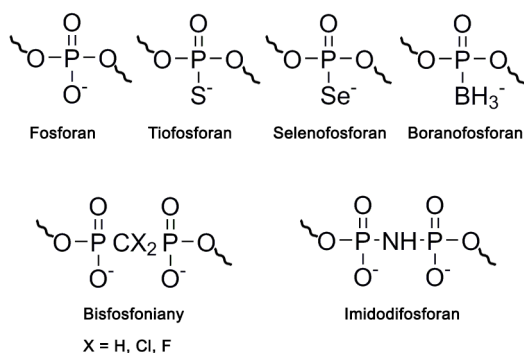
Prawdopodobnie najpowszechniej stosowaną reakcją fosforylacji nukleotydów jest opracowana w latach 60' metoda fosforylacji chlorkiem fosforylu ( $POCl_3$ ) nazywana fosforylacją Yoshikawy (**Schemat 1.1**).<sup>7</sup> Zaletami tej metody są dobre wydajności oraz duża chemo- i regioselektywność w stosunku do grupy 5' OH nukleotydu, przez co nie jest wymagane stosowanie zabezpieczeń na pozostałych grupach funkcyjnych. Pierwotnym produktem reakcji jest 5'-dichlorofosforan nukleotydu, który po następczej hydrolizie przekształca się w oczekiwany 5'-fosforan nukleotydu. Uważa się, że wysoka regioselektywność reakcji wynika prawdopodobnie z mechanizmu



## 1.2.5. Modyfikacje chemiczne w łańcuchu fosforanowym

### 1.2.5.1. Ogólna charakterystyka

Do tej pory uzyskano różnorodne związki zawierające modyfikacje w łańcuchu lub grupie fosforanowej. Wiele z nich to estry fosforanowe takie jak nukleotydy i kwasy nukleinowe. Na **Rys. 1.3** pokazano struktury wybranych modyfikacji łańcucha fosforanowego występujących w syntetycznie otrzymanych nukleotydach. Zamiana zarówno mostkowego jak i niemostkowego atomu tlenu zwykle ma diametralny wpływ na właściwości fizykochemiczne i biologiczne tak zmodyfikowanych związków. Z tego powodu badaniom nad takimi nukleotydami poświęcono wiele uwagi i niektóre z tych związków znalazły zastosowania w biochemii oraz medycynie. W dalszych rozdziałach zostaną omówione właściwości i metody syntezy związków zawierających modyfikację tio- i boranofosforanową a także bisfosfonianową oraz imidodifosforanową.



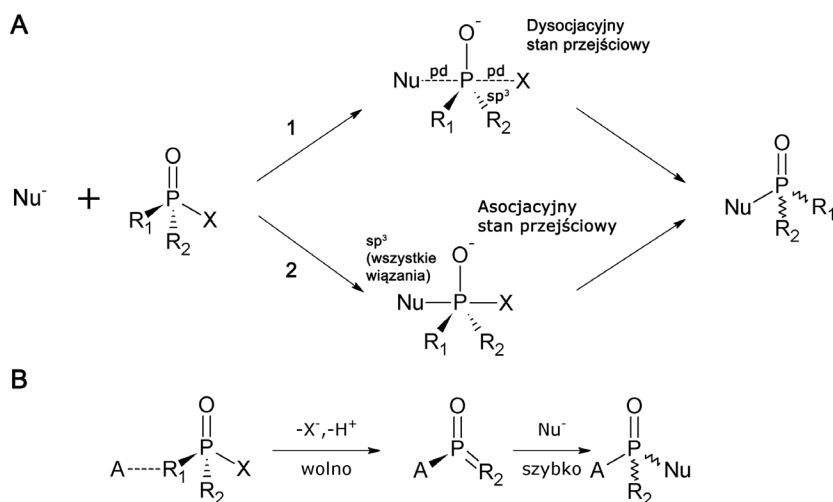
**Rys. 1.3.** Struktura wybranych modyfikacji łańcucha fosforanowego w nukleotydach. Przedstawiono zarówno modyfikacje w niemostkowych atomach tlenu (góra) jak i mostkowych (dół).

### 1.2.5.2. Reakcje substytucji nukleofilowej

Wprowadzenie modyfikacji do łańcucha fosforanowego ma znaczący wpływ na jego reaktywność w reakcjach takich jak substytucja nukleofilowa, będąca jedną z najważniejszych reakcji zachodzącej w tej grupie. W odróżnieniu od substytucji nukleofilowej na karbonylowym atomie węgla przebiegającej przez tetraedyczny stan przejściowy, reakcja ta na atomie fosforu przebiega poprzez pentakoordynacyjny stan przejściowy o geometrii bipiramidy trygonalnej gdzie zarówno grupa dochodząca jak i odchodząca przyjmują pozycje apikalne. Substytucja nukleofilowa w grupie fosforanowej może zachodzić według trzech mechanizmów: asocjacyjno-dysocjacyjnego ( $A_N D_N$ ), dysocjacyjno-asocjacyjny ( $D_N + A_N$ ) oraz addycji-eliminacji ( $A_N + D_N$ ).<sup>13</sup> Dwa pierwsze wykazują do siebie duże podobieństwo i mogą zostać rozważone jako odpowiedniki klasycznego mechanizmu  $S_N2$  (**Rys. 1.4A**), natomiast ostatni z nich zakłada tworzenie się przypominającego metafosforan reaktywnego produktu pośredniego, dlatego też może zostać rozpatrzony jako odpowiednik mechanizmu  $S_N1$  (**Rys. 1.4B**).<sup>13</sup> Preferencja danego ligandu do przyjmowania pozycji apikalnej w pentakoordynacyjnym stanie przejściowym jest określana mianem apikofilowości. Jest formalnie zdefiniowana jako różnica w entalpii swobodnej aktywacji ( $\Delta G^\ddagger$ ) pomiędzy dwoma stanami przejściowymi, gdzie w pierwszym ze stanów ligand jest w pozycji apikalnej a w drugim w pozycji równikowej.<sup>14</sup> Czynniki mającymi wkład do apikofilowości są elektroujemność, skłonność do formowania wiązań  $\pi$  oraz zawada steryczna. Na tej podstawie zaproponowany następujący szereg obrazujący względną apikalność ligandów:  $CF_3 > CF_2H > CFH_2 > OH > CH_3 > O > SH > NH_2 \gg BF_3^- > BH_3^-$ . Należy jednak pamiętać, że zaprezentowane zestawienie ma charakter jedynie empiryczny i w znacznym stopniu stanowi jedynie odzwierciedlenie elektroujemności podstawników.<sup>14, 15</sup>

Reakcje estrów fosforanowych wykazują różną preferencję co do mechanizmu. W przypadku monoestrów ma on charakter dysocjacyjny (mechanizm  $D_N + A_N$ ), w przeciwieństwie do triestrów (mechanizm  $A_N D_N$ ), gdzie ma on charakter asocjatywny, z kolei diestry tworzą stan przejściowy o pośrednim charakterze. Zastąpienie jednego z niemostkowych atomów tlenu przez siarkę nie ma wpływu na znaczącą zmianę struktury stanu przejściowego dla opisanych powyżej reakcji<sup>16, 17</sup>. Zmiana ta wpływa jednak na kinetykę reakcji hydrolizy w porównaniu do estrów fosforanowych, co oznacza, że występują znaczące różnice w wielkości stałych szybkości w zależności od stopnia rodzaju estru. Opisywano efekt „tio” zdefiniowany jako  $k_{\text{fosforan}}/k_{\text{tiofosforan}}$  dla triestrów i diestrów jest odpowiednio 1000-krotnie i 25-krotnie większy niż dla monoestrów, które ulegają hydrolizie szybciej niż niemodyfikowane

analogi fosforanowe<sup>18</sup>. Tak znaczące zmiany mogą zostać wytłumaczone dzięki różnicom w elektroujemności tlenu i siarki oraz odmiennej geometrii stanów przejściowych. Na podstawie danych doświadczalnych zaproponowano, że dysocjacyjna reakcja monoestrów posiadających elektrofilowy atom wodoru jest przyspieszana przez elektronodonorowy atom siarki, podczas gdy asocjacyjny mechanizm reakcji triestrów posiadających bardziej nukleofilowy atom fosforu jest z kolei przyspieszana przez elektronoakceptorowy atom tlenu.<sup>13</sup>



**Rys. 1.4.** Substytucja nukleofilowa w grupie fosforanowej. **(A)** Porównanie mechanizmu dysocjacyjno-asocjacyjnego ( $D_N+A_N$ , ścieżka 1 z asocjacyjno-dysocjacyjnego ( $A_N+D_N$ , ścieżka 2). Pokazano różnice w postulowanych stanach przejściowych. **(B)** Schemat mechanizmu eliminacji-addycji ( $A_N+D_N$ ). Eliminacja prowadzi do powstania niestabilnego metafosforanu ( $R_2 = O, S$ ) szybko ulegającemu podstawieniu. Zacerpnięto i zmieniono na podstawie *Current Organic Chemistry*, 2005, 9, 61-74.

Grupa boranowa nie jest podatna na usunięcie z boranofosforanu na drodze substytucji nukleofilowej z uwagi na jej niską apikofilowość, co zostało potwierdzone eksperymentalnie poprzez badania hydrolizy boranofosforanu tymidyny. W pierwszym etapie związek ten rozpada się do tymidyny i grupy boranofosforanowej. Dopiero wolny boranofosforan ulega powolnej hydrolizie do fosforanu i kwasu borowego w niskim pH (patrz rozdział 1.2.5.3.2.1. *Stabilność chemiczna grupy boranofosforanowej w roztworze*).<sup>19</sup>

### 1.2.5.3. Opis fizykochemiczny wybranych modyfikacji

#### 1.2.5.3.1. Grupa tiofosforanowa

Wykazano, że zastąpienie jednego lub więcej niestokowych atomów tlenu przez siarkę ma istotny wpływ na strukturę elektronową grupy fosforanowej.<sup>20</sup> Atomy tlenu i siarki posiadają tę samą ilość elektronów walencyjnych, jednakże siarka posiada dodatkowo elektrony znajdujące się na orbitalu *d*, (jest pseudoizoelektronowa względem tlenu). Zarówno niemodyfikowany fosforan jak i tiofosforan mają taki sam wypadkowy ładunek ujemny, i przyjmuje się, że jeden z ładunków ujemnych jest ulokowany na atomie siarki.<sup>21</sup> Dopóki nie uzyskano dokładnych danych strukturalnych uważano, że wiązanie podwójne jest lokalizowane pomiędzy atomami siarki i fosforu a ładunki ujemne na atomach tlenu. Wczesne struktury krystalograficzne uzyskane dla soli dialkiloamoniowych AMPS wskazały, że rząd wiązania P-O wynosi 1 i ładunek zlokalizowany jest na atomie tlenu albo rząd wiązania wynosi 1,5 a jeden z ładunków umieszczony jest na atomie siarki a drugi zdelokalizowany pomiędzy dwoma atomami tlenu. Żadna z tych form nie zakłada znacznego udziału atomu siarki w delokalizacji ładunku.

Późniejsze badania z użyciem spektroskopii NMR ujawniły, że druga z proponowanych struktur stanowi lepsze przybliżenie rozkładu ładunku w dianionie AMPS znajdującym się w środowisku wodnym. Wykazano, że struktura jonów *O*-alkilo i *O'*-dialkilo tiofosforanowych w roztworze posiada ładunki ujemne preferencyjnie ulokowane na siarce i wiązaniami P-O o rzędzie wynoszącym odpowiednio 1,5 i 2. W tych pomiarach wyznaczano częstotliwości oscylacji wiązania P-O dla związków znakowanych izotopem <sup>18</sup>O i zauważono niewielkie podwyższenie wartości przesunięcia chemicznego atomu fosforu związanego z <sup>18</sup>O. Intensywność tych zmian jest dobrze skorelowana z rzędem wiązania i na tej podstawie wyznaczono, że rząd wiązania P-O w anionach monoestrów wynosi około 1,5 dla tlenu bez dołączonej grupy alkilowej.<sup>22, 23</sup> Takie same wartości rzędowości wiązań pomiędzy tlenem a fosforem zaobserwowano dla anionu tiofosforanowego, co jest zgodne z zaproponowaną wcześniej strukturą zakładającą obecność ujemnie naładowanej reszty siarki połączonej z atomem tlenu wiązaniem pojedynczym.<sup>24</sup>

Co ciekawe, obliczenia kwantowe oraz dane krystalograficzne wskazują, że rząd wiązania w połączeniach P-S i P-O jest zbliżony do 1,5 sugerując, że większy ładunek jest jednak zgromadzony na atomie tlenu.<sup>25, 26</sup> Wszystkie wcześniejsze rozważania prowadzono dla struktur nie związanych z kationami metali. Rozmieszczenie ładunku w kompleksach tiofosforanów z kationami metali przejściowych jest bowiem zależne od charakteru chemicznego danego kationu. W przypadku  $Mg^{2+}$  ładunek ulega przemieszczeniu na atom tlenu natomiast w przypadku  $Zn^{2+}$  pozostaje on na siarce, co jest tłumaczone w oparciu o teorię kwasów i zasad Pearsona.<sup>27</sup>

Ważnym aspektem wprowadzenia siarki do grupy fosforanowej, są różnice strukturalne wynikłe z większego promienia van der Waalsa atomu siarki (1,85 Å) niż atomu tlenu (1,44 Å).<sup>25</sup> Dlatego taka substytucja może prowadzić do znacznych zmian w reaktywności, a zwłaszcza aktywności biologicznej (np niedopasowanie konturu elektronowego związku do centrum katalitycznego enzymu zmniejszające powinowactwo do substratu). Ponadto zwiększenie podwójnego charakteru wiązania pomiędzy tlenem a fosforanem prowadzi do jego znacznego skrócenia.<sup>20</sup> Przeprowadzone obliczenia wskazują na zmiany w dynamice konformacyjnej grupy fosforanowej co ma znaczący wpływ na efekty solwatacyjne, i oddziaływania dyspersyjne oraz elektrostatyczne.<sup>26</sup> Przykładowo zaobserwowano, że wprowadzenie grupy tiofosforanowej do DNA prowadzi do wzrostu giętkości łańcucha. W przypadku formowania się dupleksów DNA zawierających takie modyfikacje obserwuje się zmiany w szerokości małej bruzdy<sup>28</sup>, ponadto obserwuje się zmiany w stopniu hydratacji oraz lokalizacji kationów metali wzdłuż tej bruzdy<sup>29</sup> co istotnie zmienia stabilność takiego dupleksu.

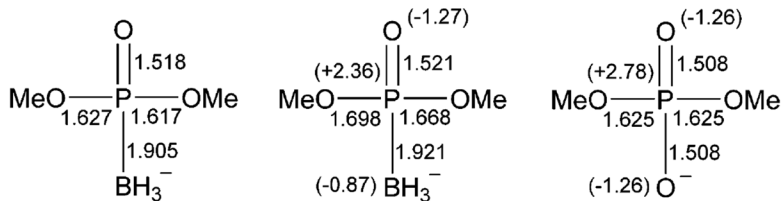
### 1.2.5.3.2. Grupa boranofosforanowa

Ponieważ liczba elektronów walencyjnych w grupie boranowej i atomie tlenu jest taka sama to obydwa indywidua są względem siebie izoelektronowe. W podobny sposób siarka jest pseudoizoelektronowa z grupą boranową (jedyną różnicą jest obecność elektronów *d* w atomie siarki). Zarówno borano- jak i tiofosforany posiadają taką samą ilość ładunków ujemnych co fosforan. Dlatego też uznaje się je za dobre odpowiedniki strukturalne fosforanów.<sup>19</sup>

Struktura elektronowa wiązania diestrowego w boranofosforanach była wyznaczona za pomocą obliczeń *ab initio* na zbiorze pokrewnych sobie związków a w przypadku niektórych związków zostały wyznaczone dokładne struktury krystalograficzne (**Rys. 1.5**). Pokazały one, że zamiana kationu diizopropylaminy na kation potasu nie ma znaczącego wpływu na wiązania P-B w anionie<sup>30, 31</sup>. Obliczenia kwantowe wykazują dużą zgodność z tymi danymi doświadczalnymi, znaleziona długość wiązania P-B była tylko nieznacznie mniejsza. Geometria wiązania w pobliżu atomu fosforu w diestrach fosforanowych i boranofosforanowych jest tetraedryczna, główną różnicą strukturalną jest długość wiązania P-O w odniesieniu do P-B<sup>30</sup>. Rozkład ładunku w grupie boranofosforanowej został uzyskany zarówno na drodze obliczeń teoretycznych jak i pomiarów NMR i jest on zgodny z przewidywaniami opartymi na podstawie różnic w elektroujemnościach tlenu i boru. Po wprowadzeniu grupy boranowej ładunek na atomie fosforu zwiększa się z +2,36 do +2,78 (skala Paulinga), natomiast wielkość ładunku grupy boranowej jest mniejsza (-0,87) niż dla atomu tlenu (-1,26). Skutkuje to rozmieszczeniem pewnego ładunku ujemnego w dużej odległości od fosforu, co zmienia polarność całego ugrupowania.<sup>30</sup>

Zastąpienie jednego z atomów tlenu przez grupę boranową powoduje spadek hydrofilowości związku, pomimo zachowania całkowitego ładunku ujemnego. Stwierdzono, że 5'-boranofosforan tymidyny jest prawie 20-krotnie bardziej hydrofobowy niż TMP<sup>19</sup>. Ponadto, dinukleotydy boranofosforanowe mają znacznie wydłużony czas retencji na RP HPLC w porównaniu z odpowiednimi niezmodyfikowanymi związkami oraz dinukleotydami związkami z grupą tiofosforanową. Na podstawie tych obserwacji zaproponowano następujący szereg związków, ułożonych względem narastającej hydrofobowości: fosforany > tiofosforany > boranofosforany.

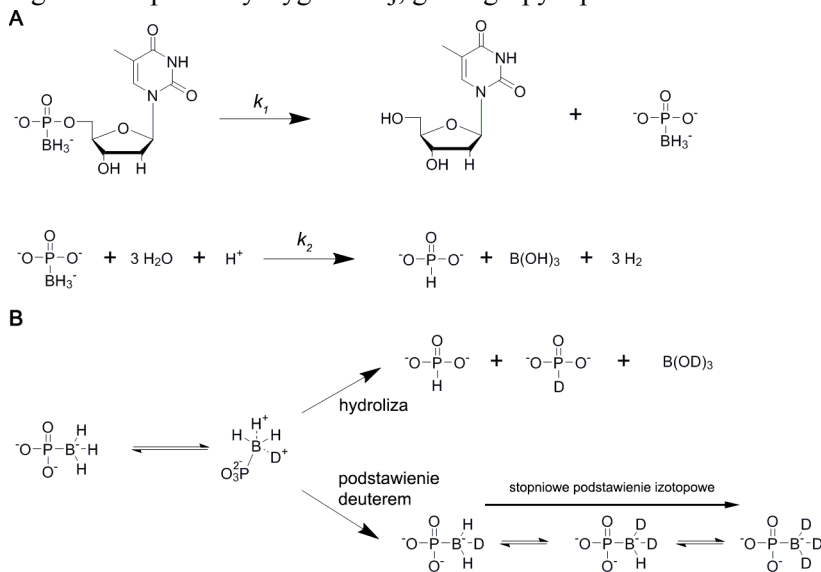
Badania strukturalne pokazały, że grupa boranowa w soli diizopropylamoniowej dimetyloboranofosforanu jest położona w hydrofobowym otoczeniu i jest ona niezdolna do konkurencji z terminalnym tlenem do tworzenia wiązań wodorowych z kwasowymi protonami.<sup>30, 32</sup> Jest to zgodne z wysoką hydrofobowością nukleotydów posiadających ugrupowanie boranofosforanowe (w porównaniu ze swoimi niezmodyfikowanymi analogami). Z uwagi na wspomniane czynniki oddziaływania z akceptorami wiązań wodorowych występujących w białkach wiążących nukleotydy mogą być znacząco odmienne niż dla grupy fosforanowej.<sup>19</sup>



**Rys. 1.5.** Porównanie długości wiązań (Å) i rozkładu ładunków w strukturze krystalograficznej diestru metylowego boranofosforanu (na lewo) oraz wyznaczonych teoretycznie strukturach diestru metylowych boranofosforanu i fosforanu (na prawo). Zaczepnięte i zmodyfikowane z *Chemical Reviews*, 2007, 107, 4746-4796.

### 1.2.5.3.2.1. Stabilność chemiczna grupy boranofosforanowej w roztworze

W odróżnieniu od wielu innych związków boranoorganicznych, boranofosforany są stosunkowo stabilne w roztworach wodnych, co sprawia że mechanizm hydrolizy może być w dogodny sposób badany za pomocą spektroskopii  $^1\text{H}$ ,  $^{11}\text{B}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR oraz wymiany izotopowej pomiędzy H i D.<sup>19</sup> Zauważono, że 5' boranofosforan tymidyny (TMBP) ulega powolnemu rozkładowi (**Rys. 1.6A**), pierwszym etapem jest rozpad wiązania P-O do tymidyny oraz nieorganicznego boranofosforanu ( $k_1 = 4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  w 50 °C w  $\text{H}_2\text{O}$ ), drugim etapem jest wolniejszy rozpad powstałego produktu do fosforanu i kwasu borowego ( $k_2 = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  w 50 °C w  $\text{H}_2\text{O}$ ).<sup>33</sup> Innym aspektem dyskutowanego procesu jest wymiana izotopowa wodoru na deuter opierająca się na potrójnej wymianie protonu na deuter, zachodzącej w  $\text{D}_2\text{O}$  (**Rys. 1.6B**). Mechanizm tego procesu został zaproponowany na podstawie występowania specyficznych przesunięć izotopowych w sygnałach  $^{31}\text{P}$  i  $^{11}\text{B}$  NMR, oraz zmian wartości stałych sprzężenia. Proces wymiany izotopowej nakłada się na hydrolizę częściowo lub całkowicie zdeuterowanego boranofosforanu, w wyniku której powstaje zdeuterowany fosforan oraz kwas borowy. W temperaturze 50 °C podstawienie deuterem zachodzi o rząd wielkości szybciej niż hydroliza.<sup>33</sup> Wynika stąd, że wiązanie P-B wydaje się być mniej wrażliwe na hydrolizę niż wiązanie P-O w reszcie cukrowej. Pomiarzy te są zgodne z obliczeniami teoretycznymi SCF, pokazujące, że wiązanie P-O jest bardziej podatne na hydrolizę zachodzącą poprzez intermedial o geometrii piramidy trygonalnej, gdzie grupy wprowadzana i odchodząca znajdują się w pozycji apikalnej.<sup>14</sup>

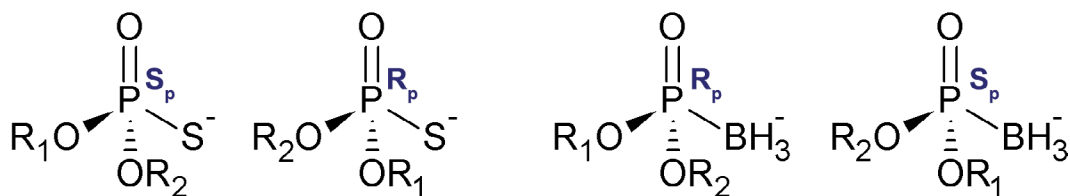


**Rys. 1.6.** (A) Mechanizm hydrolizy grupy boranofosforanowej TMBP oraz następczej hydrolizy anionu boranofosforanowego. (B) Schematyczne przedstawienie substytucji izotopowej w anionie boranofosforanu.

### 1.2.5.3.3. Stereochemia atomu fosforu

Zastąpienie niemoistkowego atomu tlenu na inny atom lub grupę atomów prowadzi do powstania centrum stereogenicznego na atomie fosforu (**Rys. 1.7**) co w przypadku nukleotydów skutkuje występowaniem dwóch diastereoizomerów,  $S_p$  oraz  $R_p$ .<sup>16</sup> Ponieważ działanie większości białek oddziałujących z nukleotydami zależne jest od specyficznego rozpoznania układu przestrzennego wiązań wodorowych i atomów biorących udział w wiązaniu to diastereo selektywność jest często obserwowana. Przykładowo w wielu przypadkach diastereoizomery tiofosforanów nukleozydów charakteryzują się odmienną podatnością na hydrolizę przez enzymy z grupy fosfordiesteraz.<sup>34, 35</sup> W przypadku boranofosforanów także zaobserwowano taką zależność.<sup>36, 37</sup>

Z uwagi na wyższy priorytet atomu siarki niż atomu boru względem atomu tlenu ( $S > O > B$ ) konfiguracje absolutne boranofosforanów i tiofosforanów o takiej samej przestrzennej aranżacji podstawników są względem siebie przeciwne. Wykorzystując tę informację w wielu przypadkach możliwe jest ustalenie konfiguracji absolutnej danego boranofosforanu poprzez porównanie jego podatności na działanie enzymu, którego preferencja stereochemiczna została ustalona wcześniej podczas badań na tiofosforanowym odpowiedniku badanego związku o znanej stereochemii.<sup>19</sup>



**Rys. 1.7.** Stereochemia atomu fosforu dla tiofosforanów (lewo) oraz boranofosforanów (prawo), według reguł CIP. Założono następująco kolejność ważności podstawników  $R_1 > R_2$ .

### 1.2.5.3.3.1. Przypisywanie konfiguracji absolutnej

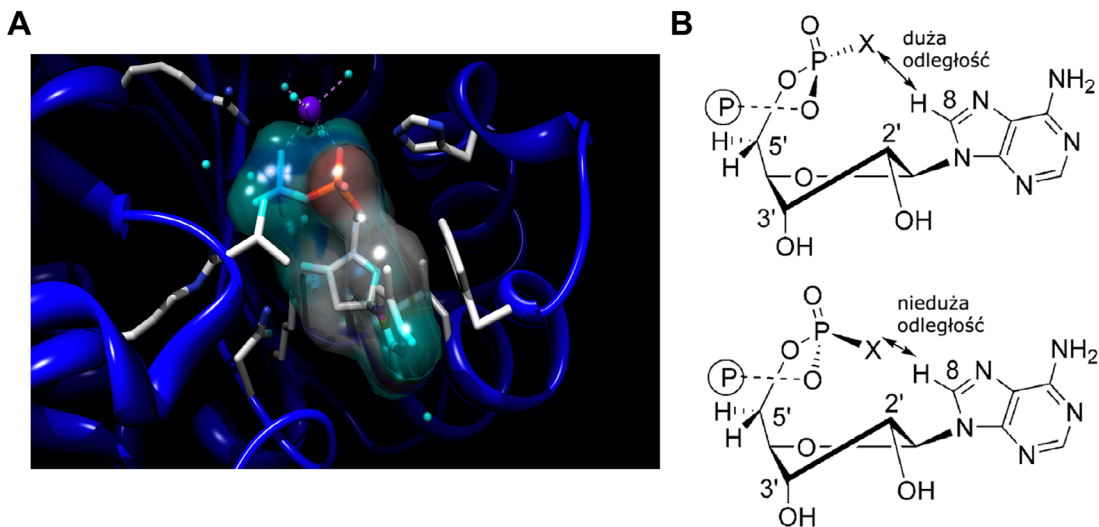
Większość tiofosforanowych i boranofosforanowych analogów nukleotydów może zostać rozdzielona na czyste diastereizomery za pomocą HPLC. Izomer o krótszym czasie retencji na kolumnie RP jest określany mianem D1 natomiast izomer o dłuższym czasie retencji nazywany jest D2.

Konfiguracji absolutna diastereoizomerów  $Np_{BH_3}P$  została wyznaczona poprzez krystalizację z kinazą pochodząca ze śluzorośla *Dictyostelium*, (**Rys. 1.8A**) którego struktura jest bardzo podobna do miejsca aktywnego kinazy difosforanów nukleozydów (NDPK). Ustalenie stereochemii połączenia  $Np_{BH_3}P$  ze wspomnianym enzymem było możliwe z powodu selektywnego rozpoznania diastereoizomerów tych związków przez enzym.<sup>38</sup> Izomer D1  $Ap_{BH_3}P$  został wykrystalizowany w kompleksie z białkiem, a otrzymana struktura krystaliczna wskazała, że grupa boranowa przyjmuje konfigurację  $R_p$ . Jeżeli założy się, że czasy retencji na HPLC są niezależne od zmiany zasady azotowej to izomerom D1 i D2 można przypisać następujące konfiguracje:  $R_p$  i  $S_p$ . Wyniki te zostały dodatkowo potwierdzone przez badania  $^1H$  NMR prowadzone na serii analogów ADP zawierających w pozycji  $\alpha$  atom siarki, selenu oraz grupę  $BH_3^-$ . Przypisanie konfiguracji absolutnej w ten sposób jest możliwe poprzez pomiar przesunięcia sygnału od protonu H8 w pierścieniu adenozyliny lub guanozyliny.<sup>39</sup> Sygnał od H8 izomeru D2 powinien być mocniej przesłaniany względem sygnału pochodzącego od drugiego diastereoizomeru z uwagi na efekty anizotropowe pochodzące od położonego blisko w przestrzeni heteroatomu. Dlatego też w izomerze D2 sygnał znajduje się w relatywnie wyższym polu niż sygnał od D1 (**Rys. 1.8B**). Dalsze badania wykazały, że różnica przesunięcia pomiędzy sygnałami H8 narasta w następującym szeregu:  $Ap_{BH_3}P < Ap_S P < Ap_{Se}P$ , co jest spowodowane spadkiem odległości protonu H8 od ujemnego ładunku, ulokowanego na grupie fosforanowej, na skutek skracania się wiązań P-X (1,91 Å dla P-B, 1,96 Å dla P-S oraz 2,24 Å dla P-Se).<sup>19, 30, 39</sup>

Absolutna konfiguracja żadnego diastereoizomeru  $Np_{BH_3}PP$  nie została jeszcze ustalona eksperymentalnie przez krystalizację, może ona jednak zostać ustalona pośrednio poprzez porównanie aktywności enzymatycznej dla odpowiednich analogów tiofosforanowych. Dla analogów tych izomer  $S_p$  jest bardziej aktywny w reakcji z polimerazą DNA natomiast jedynie izomer  $R_p$  jest substratem dla fosfordiesterazy z jadu węża (SVPDE).<sup>34</sup> Można wywnioskować, że izomer D1 ma konfigurację  $R_p$  z powodu jego ułatwionej inkorporacji do DNA w porównaniu do drugiego diastereoizomeru. Wymaga to jednak założenia, że  $Np_{BH_3}PP$  mają taką samą stereospecyficzność względem polimerazy DNA jak ich odpowiedniki tiofosforanowe. Ponadto konfiguracja absolutna może zostać wyznaczona poprzez pomiar przesunięcia chemicznego sygnału H8 w spektroskopii  $^1H$  NMR w sposób analogiczny jak przedstawiono wcześniej dla  $Np_{BH_3}P$  jednak nie daje to takiej pewności jak dane krystalograficzne.

Więcej informacji na temat badań enzymatycznych z udziałem P-diastereoizomerycznych nukleotydów zawarto w rozdziale 1.2.5.5.1. *Badania biochemiczne.*





**Rys. 1.8.** Ustalanie konfiguracji absolutnych boranofosforanowych analogów NDP. (A) Struktura difosforanu związanego  $Ap_{BH_3}P$  z kinazą z *Dictyostelium*. Na pomarańczowo zaznaczono pozycję grupy boranofosforanowej (B) Konfiguracja diastereoizomerów w oparciu o pomiary  $^1H$  NMR (izomer D1 na górze, izomer D2 na dole) Sporządzone na podstawie *Journal of American Chemical Society*, 2005, 127, 16782-16783.

#### 1.2.5.3.4. Modyfikacje w pozycjach mostkowych

W chemii nieorganicznej pirofosforan definiowany jest jako anion zbudowany z dwóch odwodnionych grup fosforanowych połączonych ze sobą za pomocą wiązania P-O-P (z tego powodu jest one często nazywane wiązaniem pirofosforanowym). Wiązanie pirofosforanowe pełni szczególną rolę w biochemii, ponieważ jego rozpad jest źródłem energii chemicznej wykorzystywanej do przeprowadzania większości procesów anabolicznych zachodzących w komórkach. W wyniku reakcji zachodzi rozpad trifosforanu nukleozydu do monofosforanu nukleozydu oraz anionu pirofosforanowego. Do innych występujących na szeroką skalę procesów angażujące rozpad wiązania pirofosforanowego można zaliczyć replikację DNA oraz transkrypcję.<sup>1</sup>

W celu zwiększenia stabilności *in vivo* związków zawierających połączone ze sobą grupy fosforanowe można dokonać podstawienia jednego lub więcej mostkowych atomów tlenu za pomocą grup chemicznych stanowiących odpowiedniki steryczne i elektronowe atomu tlenu. Badania biologiczne wskazały, że wiele z takich modyfikacji zapewnia odporność na hydrolizę enzymatyczną w miejscu ich wprowadzenia.<sup>40</sup> W dalszej części zostaną zarysowane właściwości i synteza nukleotydów modyfikowanych przy pomocy grupy metylenowej i imidowej. Podstawienie mostkowego atomu tlenu przez grupę metylenową czyni analog pirofosforanu stabilniejszym termodynamicznie, zwiększając odporność na hydrolizę enzymatyczną.<sup>41</sup> Z powodu dużego podobieństwa strukturalnego metylenobisfosfonianowe analogi związków aktywnych biologicznie są często rozpoznawane przez enzymy katalizujące reakcje z ich naturalnymi odpowiednikami. Są one przez nie wiązane ale nie podlegają hydrolizie z uwagi na znacznie większą stabilność wiązania P-C w porównaniu do P-O, co w wielu wypadkach pozwala na wykorzystanie tych analogów w badaniach biochemicznych.<sup>40</sup>

Pomimo że, grupa metylenowa uważana jest za dobry odpowiednik mostkowego atomu tlenu to dokonanie takiej substytucji prowadzi do zmian w rozkładzie gęstości elektronowej zmieniającej właściwości fizykochemiczne metylenobisfosfonianów. Głównym powodem tych zmian jest znaczna różnica w elektroujemności pomiędzy atomem tlenu a węgla, co prowadzi do spadku polaryzowalności wiązania P-C względem P-O. Z powodu małej elektroujemności węgla można by oczekiwać zwiększenia gęstości elektronowej na atomie fosforu, jednak zarówno pomiary spektroskopowe jak i obliczenia teoretyczne wskazują na zachodzenie przeciwnego efektu.<sup>42</sup> Uważa się, że jest to głównie wywołane brakiem wiązania zwrotnego (ang. *back-bonding*) w metylenobisfosfoniach. Powstawanie wiązania zwrotnego polega na nakładaniu się wiążących orbitali atomowych *d* jednego atomu z antywiązącymi orbitalami *p* drugiego atomu, jest ono często spotykane w kompleksach metali przejściowych z ligandami takimi jak CO, CN<sup>-</sup> i N<sub>2</sub>.<sup>43</sup> Spadek gęstości elektronowej na atomie fosforu sprawia, że związki

zawierające wiązania P-C są słabszymi nukleofilami i kwasami niż niemodyfikowane fosforany. Ponadto grupa metylenowa nie posiada wolnych par elektronowych przez co nie jest w stanie tworzyć wiązań wodorowych co może mieć istotny wpływ na wiązanie przez białka.

Podobnie jak w przypadku modyfikacji metylenobisfosfonianowej wymiana mostkowego atomu tlenu na grupę imidową także zwiększa odporność na hydrolizę enzymatyczną. Jednakże powstałe w ten sposób imidodifosforany nie są tak stabilne jak metylenobisfosfoniany. Nieorganiczny imidodifosforan jest stabilny w roztworach wodnych jednakże w przypadku zakwaszenia lub zalkalizowania środowiska ulega stosunkowo szybkiej hydrolizie do fosforanu i amoniaku.<sup>44</sup> W odróżnieniu od grupy metylenowej wprowadzenie do łańcucha polifosforanowego grupy imidowej nie prowadzi do istotnych zmian w polarności całego łańcucha fosforanowego. Ponadto grupa imidowa wykazuje zdolność tworzenia wiązań wodorowych. Jednakże układ wiązań wodorowych tworzonych z cząsteczkami rozpuszczalnika lub miejscem wiążącym białka będzie odmienny ponieważ grupa NH, w porównaniu do atomu tlenu wykazuje raczej własności donorowe, a nie akceptorowe. Pomimo tej różnicy uważa się, że z punktu widzenia oddziaływań z biocząsteczkami grupa imidowa stanowi lepszy odpowiednik mostkowego atomu tlenu niż grupa metylenowa.<sup>45</sup>

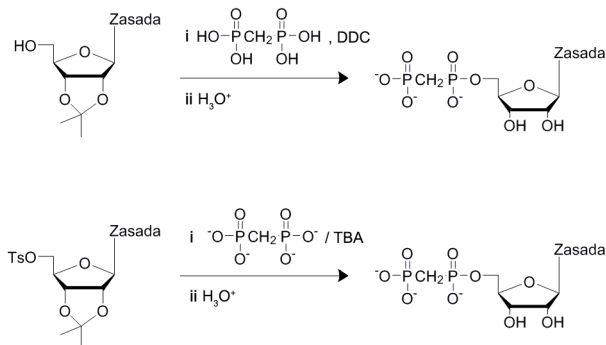
### 1.2.5.4. Metody syntezy

Literatura dotycząca przedmiotu jest bardzo bogata dlatego z konieczności w poniższych rozdziałach zostaną przedstawione jedynie wybrane metody syntez związków zawierających modyfikacje w łańcuchu fosforanowym, które były przedmiotem pracy doktorskiej (grupy: bisfosfonianowa, imidodifosfonianowa, tiofosfonianowa oraz boranofosfonianowa).

#### 1.2.5.4.1. Metylenobisfosfonianowe analogi nukleotydów

Historycznie pierwszym udanym podejściem syntetycznym prowadzącym do uzyskania metylenobisfosfonianowych analogów nukleotydów było przeprowadzone przy pomocy DCC (dikarborboksimidazolu) sprzęganie 2',3' izopropylidenoadenozyny z kwasem metylenobisfosfonianowym (**Schemat 1.3**). Metoda ta charakteryzowała się dobrą wydajnością (> 80%) jednakże wymaga zastosowania nukleozydu z zabezpieczonymi grupami 2'OH oraz 3'OH w pierścieniu rybozy.<sup>46</sup>

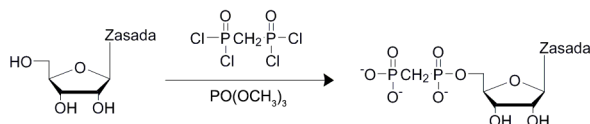
W wyniku dalszych badań udało się udoskonalić opisaną metodę poprzez zastosowanie nadmiaru DCC, który działając na monoester bisfosfonianu prowadzi do wygenerowania bicyklicznego bezwodnika. Związek ten poddany reakcji z alkoholem pozwala na otrzymanie diestrów. Użycie bisfosfonianu 2-(4-nitrofenylo)etylu pozwala na bezpośrednie przyłączenie grupy bisfosfonianowej do cząsteczki nukleozydu i następczą eliminację grupy 2-(4-nitrofenylo)etylowej w środowisku zasadowym co jest istotnym udoskonaleniem. Opisane metody zostały zastosowane do syntezy szeregu związków takich jak NpCH<sub>2</sub>p (N = A, G, T, C) oraz analogów koenzymu FAD.<sup>47</sup>  
<sup>48</sup> Podstawienie nukleofilowe estrów 5'-tosylowych nukleozydów z solami tributyloamoniowymi bisfosfoniannów także znajduje szerokie zastosowanie w syntezie 5'-bisfosfonianów nukleozydów. Za jej pomocą otrzymano między innymi GpCH<sub>2</sub>p, UpCH<sub>2</sub>p oraz ApCH<sub>2</sub>p (**Schemat 1.3**). Proces sprzęgania zachodzi w temperaturze pokojowej w środowisku acetonitrylu. Głównym ograniczeniem jest konieczność syntezy odpowiednich tosylianów nukleozydów co wiąże się z koniecznością przeprowadzenia kilkietapowej syntezy.<sup>49,50</sup>



**Schemat 1.3.** Synteza metylenobisfosfonianów nukleozydów z wykorzystaniem *N,N'*-karbodiimidazolu (góra) lub poprzez 5' tosylianowe pochodne nukleozydów (dół).

Metoda syntezy metylenobisfosfonianowych pochodnych nukleozydów z użyciem  $\text{CH}_2(\text{OPCl}_2)_2$  pozwala w dogodny sposób otrzymać różnorodne  $\text{NpCH}_2\text{P}$  z wysokimi wydajnościami (65-90%) i bez konieczności stosowania grup ochronnych w pierścieniu cukrowym (**Schemat 1.4**). Dużą zaletą tej techniki jest możliwość stosowania handlowo dostępnych nukleozydów, które nie wymagają wprowadzania grup ochronnych ani aktywacji za pomocą tosyłanu.<sup>51</sup>

Inną metodą syntezy metylenobisfosfonianowych analogów trifosforanów jest wykorzystanie zmodyfikowanej reakcji Ludwiga-Ecksteina (patrz rozdział 1.2.5.4.4.3. *Trifosforany z modyfikacją tiofosforanową*). Jeżeli jako reagenta użyje się soli metylenobisfosfonianu to w ten sposób można uzyskać związki zawierające grupę metylenową w pozycji  $\beta/\gamma$  łańcucha fosforanowego.<sup>52</sup>



**Schemat 1.4.** Synteza metylenobisfosfonianów nukleozydów poprzez zmodyfikowaną reakcję fosforylacji Yoshikawy.

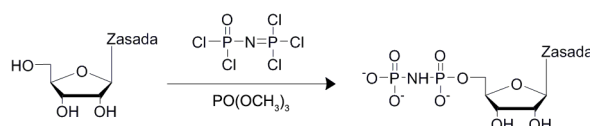
#### 1.2.5.4.2. Inne bisfosfoniany

Synteza innych bisfosfonianów nukleozydów takich jak dichloro- oraz difluorometylenobisfosfoniany prowadzi się w analogiczny sposób jak opisane w poprzednim rozdziale syntezy wykorzystując odpowiednie pochodne bisfosfonianowe. Używając tych metod (synteza poprzez 5' tosyłany nukleozydów i reakcję Ludwiga-Ecksteina) otrzymano m.in. szereg pochodnych NDP oraz NTP, posiadających także modyfikacje tio- i boranofosforanowe.<sup>53-55</sup> W innym podejściu sól difluorometylenobisfosfonianu przyłączana jest do amidofosforynu odpowiedniego nukleozydu.<sup>55</sup>

#### 1.2.5.4.3. Imidodifosforany

Istnieją dwie główne metody syntezy estrów imidodifosforanu. W historycznie pierwszej syntezie związek ten otrzymano z estru fenyłowego pirofosforanu, który został poddany reakcji z amidkiem sodu w toluenie. Natomiast dostępna komercyjnie sól sodowa imidodifosforanu może zostać uzyskana na skutek saponifikacji estrów fenyłowych imidodifosforanu.<sup>44</sup>

W latach 80' opracowano dogodną metodę syntezy imidodifosforanów nukleozydów poprzez bezpośrednią imidofosforylację nukleozydu. Nie wymaga ona stosowania grup ochronnych w nukleozydach jednak wydajności są zazwyczaj gorsze niż w przypadku bisfosfonylacji (**Schemat 1.5**). Powodem tego stanu rzeczy jest niższa regioselektywność oraz zachodzenie konkurencyjnej reakcji powstawania 5' chloropochodnej nukleozydu. Produkt chlorowania powstaje w wyniku reakcji nukleozydu z resztkami  $\text{PCl}_5$  pozostałymi z syntezy chlorku imidodifosforanowego oraz w skutek wewnątrzcząsteczkowego chlorowania produktu pośredniego reakcji co jest obserwowane w temperaturze powyżej  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>45</sup>



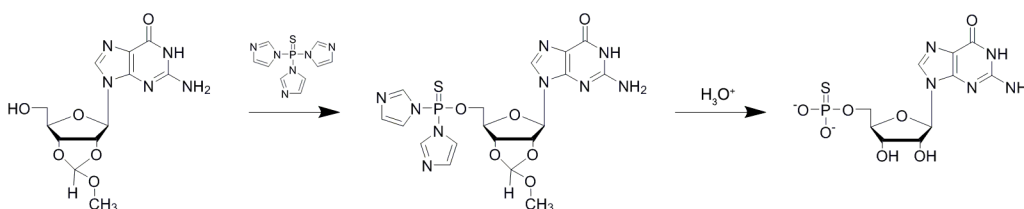
**Schemat 1.5.** Synteza imidodifosforanów nukleozydów poprzez reakcję imidodifosforylacji.

#### 1.2.5.4.4. Tiofosforany

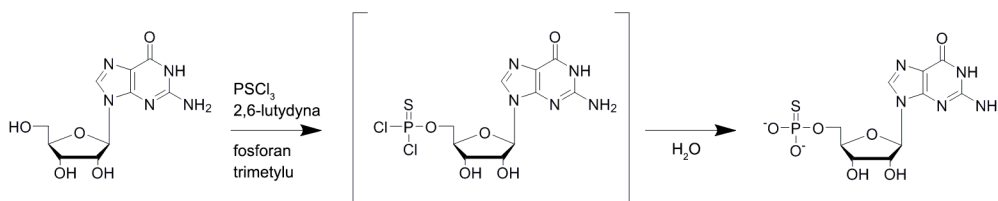
Do chwili obecnej opracowano szereg metod syntezy zarówno tiofosforanowych pochodnych wolnych nukleotydów oraz kwasów nukleinowych zawierających tiofosforany w szkielecie fosforanowym. Poniżej przedstawiono wybrane metody syntezy nukleotydów z grupą tiofosforanową.

##### 1.2.5.4.4.1. Monofosforany

Pierwszą metodą zastosowaną do syntezy 5'-monotiofosforanów nukleozydów była reakcja odpowiednio zabezpieczonego nukleozydu z siarczkiem tri(1-imidazolo)fosfiny (**Schemat 1.6**).<sup>56</sup> W celu zabezpieczenia produktu przed hydrolizą konieczne jest dodanie dużego nadmiaru imidazolu. Lepszym rozwiązaniem jest wykorzystanie bezpośredniej tiofosforylacji niezabezpieczonego nukleozydu przy pomocy  $\text{PSCl}_3$ , używając fosforanu trimetylu jako rozpuszczalnika oraz dodatku aminy aromatycznej wykorzystywanej do buforowania reakcji (**Schemat 1.7**). Tak opisana reakcja tiofosforylacji jest obecnie główną metodą wprowadzania grupy tiofosforanowej do nukleozydów.<sup>57</sup>



**Schemat 1.6.** Synteza monotiofosforanów nukleozydów poprzez siarczek tri(1-imidazolo)fosfiny na przykładzie GMPS.

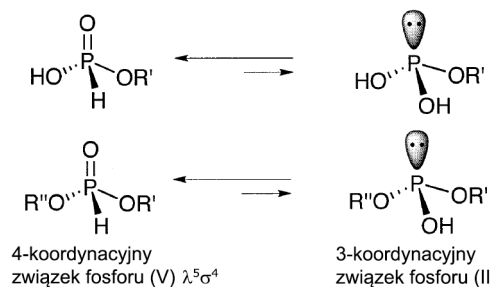


**Schemat 1.7.** Synteza monotiofosforanów nukleozydów poprzez reakcję tiofosforylacji na przykładzie GMPS.

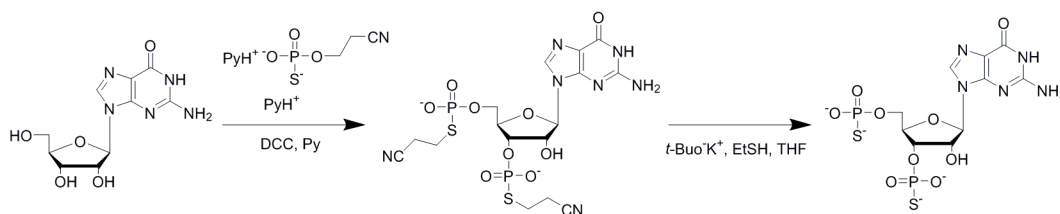
Inna metoda syntezy 5' tiofosforanów deoksyrybonukleozydów opiera się na wykorzystaniu odpowiednich *H*-fosfonianów nukleozydów jako substratów (**Schemat 1.8**). Uzyskano je z niezabezpieczonych nukleozydów poddanych reakcji z kwasem fosforowym (III) w obecności stechiometrycznej ilości *N,N'*-di-*p*-toluyllokarbodiimidu jako odczynnika sprzęgającego a reakcja przebiegała z dużą regioselektywnością na grupie 5'-OH. Pochodne *H*-fosfonianów w roztworze występują w równowadze tautomerycznej złożonej z 4-koordynacyjnej formy fosfonianowej oraz 3-koordynacyjnej formy fosforynowej (**Rys. 1.9**). Ponieważ w standardowych warunkach równowaga jest silnie przesunięta na korzyść formy 4-koordynacyjnej, atom fosforu może być traktowany jedynie jako centrum elektrofilowe.<sup>58</sup> Jednakże równowaga może zostać znacząco przesunięta na korzyść formy 3-koordynacyjnej za pomocą odpowiedniego reagenta. Taka konwersja może zostać bezpośrednio osiągnięta przez zastosowanie jednego z kilku dostępnych odczynników silylujących takich jak *N,O*-bis(trimetylosillil)-acetamid (BSA) lub *N,O*-bis(trimetylosillil)-trifluoroacetamid (BSTFA).<sup>59</sup> Związki te przeprowadzają konwersję *H*-fosfonianu do fosforynu w przeciągu kilku minut. Związki silylujące są zwykle stosowane w dużym nadmiarze celem szybkiej konwersji substratu.<sup>60</sup> W opisywanej metodzie *H*-fosfoniany utleniało następnie do odpowiednich tiofosforanów siarką elementarną a pożądane 5'-monotiofosforany nukleozydów wyizolowano z wysokimi wydajnościami (80-90%). Zaproponowano, że metoda ta może być bardzo korzystna w syntezie związków znakowanych izotopem  $^{35}\text{S}$ , ze względu na jej szybkość i dostępność izotopu  $^{35}\text{S}$ , w przeciwieństwie do znakowanego  $\text{P}^{35}\text{SCl}_3$ , który jest dużo trudniej dostępny.<sup>61</sup>

Ciekawą strategią syntezy bistiofosforanów nukleozydów jest użycie soli pirydyniowej  $\beta$ -cyjanotiofosforanu (**Schemat 1.9**). Opisywana metoda pozwoliła na uzyskanie 2',3' oraz 3'5' bistiofosforanów adenozyiny oraz guanozyiny jednakże wydajności były niskie (6% po HPLC).<sup>62</sup>

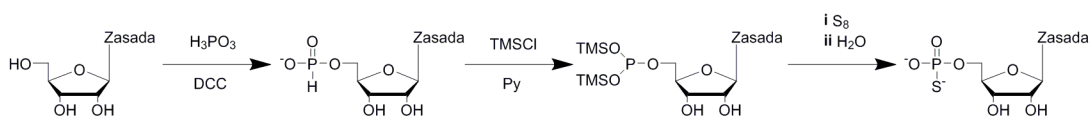
Równowagi tautomeryczne dla pochodnych *H*-fosfonianów



**Rys. 1.9.** Równowaga tautomeryczna pomiędzy formami tetrakoordynacyjną oraz trikoordynacyjną dla estrów *H*-fosfonianów. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35, 952-960.



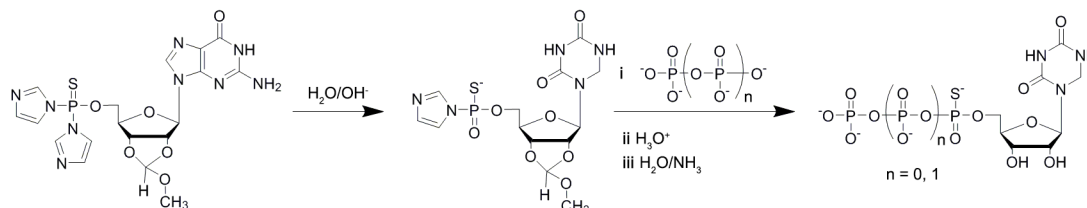
**Schemat 1.8.** Synteza monotiofosforanów nukleozydów z użyciem metody *H*-fosfonianowej.



**Schemat 1.9.** Synteza 3',5' bis(tiofosforanu) guanozyiny z użyciem soli  $\beta$ -cyjanotiofosforanu.

#### 1.2.5.4.4.2. Difosforany

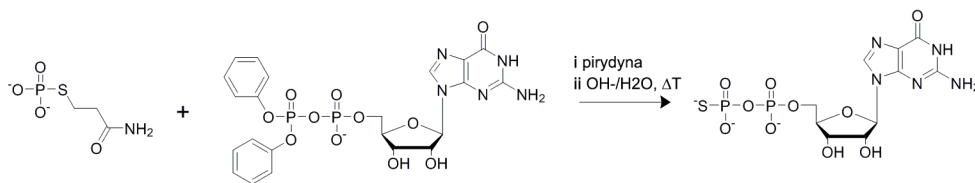
Synteza di- oraz trifosforanów może być prowadzona poprzez aktywację 5'-tiofosforanu, po której następuje atak anionu fosforanowego lub pirofosforanowego. W przypadku tiofosforanów z uwagi na to, że atak zachodzi albo poprzez atom siarki albo atom tlenu możliwe jest otrzymanie dwóch odmiennych produktów. Jeden z powstałych związków zawiera grupę tiofosforanową, podczas gdy drugi posiada mostek sulfidowy pomiędzy dwoma atomami fosforu. Jednakże w większości przypadków obserwuje się atak poprzez atom tlenu, prowadzący do uzyskania oczekiwanego tiofosforanu. Pierwsza opisana metoda aktywacji polegała na wykorzystaniu *N,N'*-karbodiimidazolu prowadząca do powstania 5'-fosforoimidazolidu adenozyiny. Reakcja tego związku z anionem fosforanowym (**Schemat 1.10**) okazała się jednak nieefektywna, nawet znaczące wydłużenie czasu reakcji nie prowadzi do powstania oczekiwanego produktu z dobrą wydajnością (uzyskano ~10%).<sup>63</sup>



**Schemat 1.10.** Synteza tiofosforanów nukleozydów z użyciem imidazolowych pochodnych tiofosforanów nukleozydów.

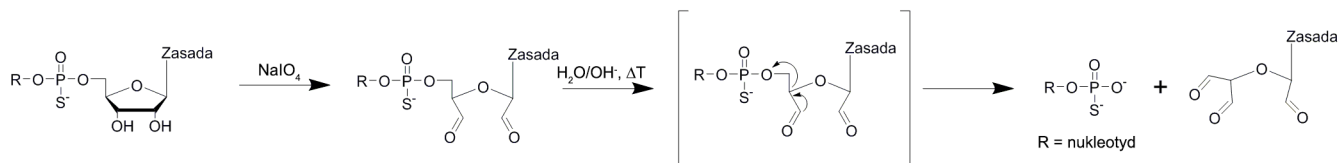
Syntezy związków zawierających terminalny tiofosforan prowadzono opierając się na reakcji *P1*-difenilo, *P2*-adenozyino 5' pirofosforanu z ortofosforanem która okazała się mało efektywna. Zasugerowano, że obecność wiązania P-S w grupie fosforanowej obniża reaktywność jonu w reakcji sprzęgania. Poddanie siarki reakcji estryfikacji okazało się dobrym rozwiązaniem – sprzęganie *S*-2-etylokarbaminianu tiofosforanu z *P1*-difenilo,

*P2*-adenozyno 5'-*O*-pirofosforanem przebiega stosunkowo wydajnie i App<sub>S</sub> został otrzymany z zadowalającą wydajnością (**Schemat 1.11**).<sup>64</sup>



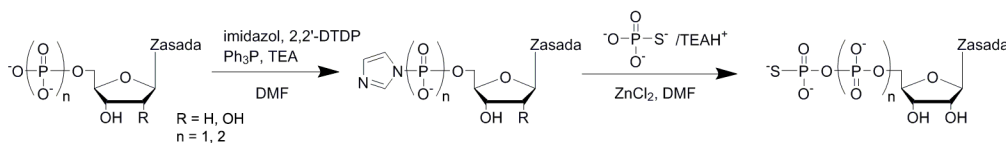
**Schemat 1.11.** Synteza GppS z użyciem *S*-2-etylokarbaminianu tiofosforanu.

Jedną z innych metod syntezy oparto na wykorzystaniu reszty nukleozydu w roli nietypowej grupy zabezpieczającej, która może być usunięta z cząsteczki produktu w wyniku utlenienia NaIO<sub>4</sub> i następczej β-eliminacji (**Schemat 1.12**). Difenylfosforanową pochodną 5'-tiofosforanu nukleozydu poddawano reakcji z odpowiednim nukleotydem co prowadziło do powstania modyfikowanego tiofosforanem nukleotydu, który przekształcano następnie w mononukleotyd rozszczepiając układ *cis*-diolowy rybozy jednego z nukleozydów do dialdehydu za pomocą NaIO<sub>4</sub>. Związek ten rozpada się do odpowiednich produktów po podgrzaniu w środowisku zasadowym. Początkowo, jako substraty do syntezy stosowano różne niezabezpieczone dinukleotydy purynowe typu Npp<sub>S</sub>N' co prowadziło do otrzymania w przybliżeniu równomolowych ilości pożądanego produktu (Npp<sub>S</sub>) oraz produktu ubocznego zawierającego resztę tiofosforanową w pozycji α (Np<sub>S</sub>p) znacznie obniżając wydajność.<sup>65</sup> Wprowadzenie grupy metoksymetylidenowej do rybozy jednego z nukleozydów zapewniło selektywną eliminację tylko jednej z cząsteczek nukleozydu i otrzymanie pożądaných Npp<sub>S</sub> lub Nppp<sub>S</sub> z dobrymi wydajnościami.<sup>65, 66</sup>



**Schemat 1.12.** Synteza tiofosforanów nukleozydów poprzez rozszczepienie pierścienia rybozy za pomocą NaIO<sub>4</sub>.

Inna metoda syntezy wspomnianych związków opiera się na sprzęganiu imidazolowej pochodnej NMP lub NDP z tiofosforanem trietyloaminy (**Schemat 1.13**). Zaletami tej metody jest relatywna prostota oraz duża wydajność (80-100% wydajności HPLC). Uzyskanie imidazolowych pochodnych nukleotydu nie nastręcza trudności syntetycznych natomiast tiofosforan sodu jest dostępny komercyjnie a jego zamiana na sól trietyloamoniową także nie jest skomplikowana.<sup>67</sup> Metoda ta została także wykorzystana do syntezy szeregu pochodnych adenozyne takich jak ApCH<sub>2</sub>pp<sub>S</sub>.<sup>68</sup> Więcej informacji o imidazolowych pochodnych nukleotydu i fosforanach nieorganicznych zawartych jest w rozdziale 1.6

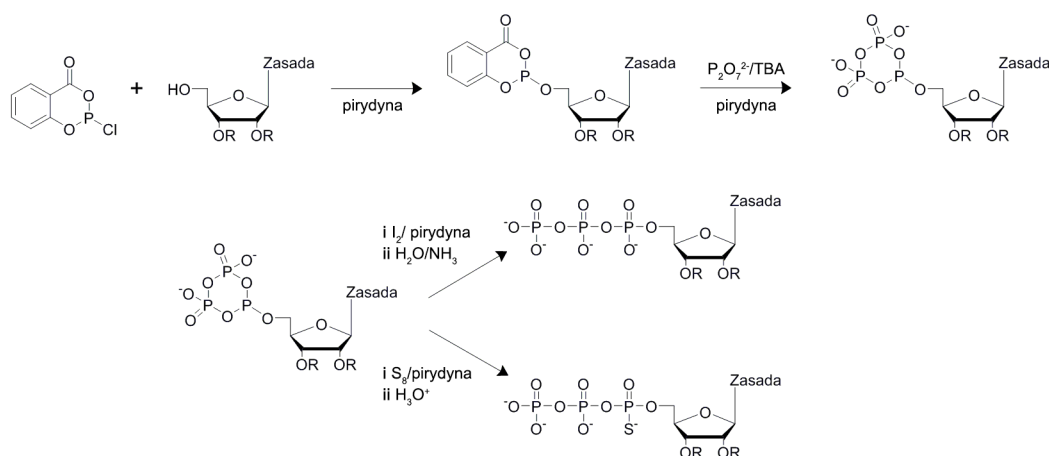


**Schemat 1.13.** Synteza Npp<sub>S</sub> oraz Nppp<sub>S</sub> z użyciem soli tiofosforanu.

#### 1.2.5.4.4.3. Trifosforany

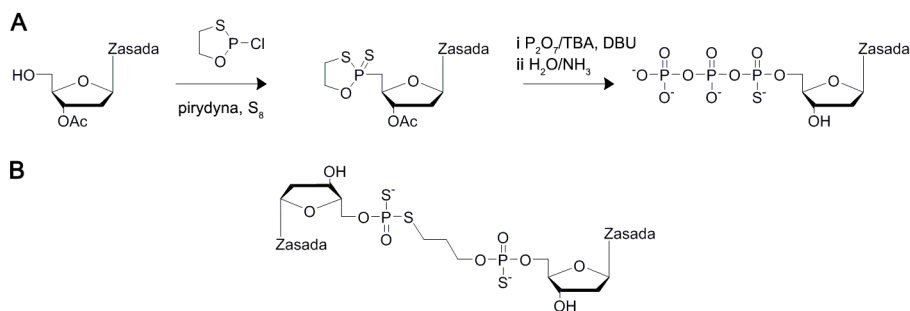
Z powodu zapotrzebowania na nukleotydy zawierające tiofosforan w pozycji α konieczne było opracowanie bardziej wydajnej metody syntezy tych związków niż wspomniana wcześniej metoda fosforoimidazolowa. Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxosofosforyn-4-on (chlorofosforyn salicylu) był związkiem od dawna wykorzystywanym do syntezy *H*-fosfonianów nukleotydu jako bloków budulcowych w syntezie oligonukleotydu na podłożu stałym.<sup>69</sup> Jego wielofunkcyjność została wykorzystana do opracowania prostej metody syntezy modyfikowanych trifosforanów nukleotydu (**Schemat 1.14**). Reakcja chlorofosforynu salicylu z nukleotydem (reakcja Ludwiga-Ecksteina) prowadzi do powstania dwóch diastereoizomerów związku przejściowego (fosfosalicylowej pochodnej nukleotydu), który ulega reakcji z anionem pirofosforanowym tworząc nowy związek.<sup>8</sup> Istnienie dwóch

diastereoizomerów jest możliwe z powodu chiralności ugrupowania nukleotydowego etylowej. Aktywowana pochodna nukleotydu może podlegać dwóm następczym reakcjom substytucji nukleofilowej. Zakłada się, że grupą opuszczającą w pierwszej reakcji jest grupa karboksylowa a grupa aromatyczna jest eliminowana w drugim wewnątrzcząsteczkowym etapie reakcji. Powstały cykliczny intermediat może zostać utleniony za pomocą jodu elementarnego w celu otrzymania niemodyfikowanego trifosforanu nukleozydu lub poddany reakcji z siarką elementarną w celu otrzymania 5'-*O*-(1-tiotrifosforanu) nukleozydu.<sup>8</sup> Hydroliza cyklicznego fosforanu przy użyciu H<sub>2</sub><sup>18</sup>O i pomiary <sup>31</sup>P NMR pokazały, że powstałe związki zawierają atom <sup>18</sup>O jedynie w terminalnej grupie fosforanowej. W tych badaniach nie wykryto form łańcuchowych, które mogłyby powstać z rozszczepienia wiązania pirofosforanowego. Ponadto nie stwierdzono produktów podstawionych izotopem <sup>18</sup>O w pozycji α, co świadczy o regioselektywności ataku nukleofilowego. Ostatecznym produktem reakcji jest równomolowa mieszanina dwóch diastereoizomerów Np<sub>s</sub>pp.<sup>8</sup> Opisana metoda posiada szereg zalet w porównaniu z poprzednio opracowanymi syntezami takimi jak szybki przebieg i brak problemów z rozpuszczalnością. Co więcej, dzięki łatwemu wprowadzaniu siarki do mieszaniny reakcyjnej otrzymywanie produktów znakowanych izotopowo jest ułatwione. Pomimo, że ochrona grup aminowych w naturalnie występujących zasadach azotowych nie jest konieczna to dla lepszej selektywności reakcji konieczna jest ochrona grup hydroksylowych w pierścieniu rybozy.<sup>8</sup> Metoda Ludwiga-Ecksteina została też zastosowana do syntezy nukleotydów cyklicznych oraz oligofosforanów nukleozydów zawierających dwie grupy tiosfosforanowe (Np<sub>s</sub>p<sub>s</sub>, Np<sub>s</sub>pp<sub>s</sub> oraz Np<sub>s</sub>p<sub>s</sub>p).<sup>8, 70, 71</sup>



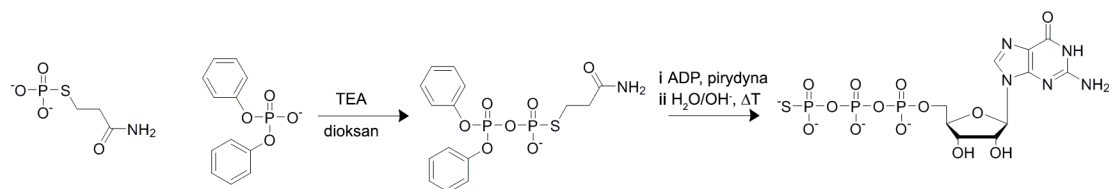
**Schemat 1.14.** Synteza trifosforanów w reakcji Ludwiga-Ecksteina z uwzględnieniem wprowadzania modyfikacji tiosfosforanowej w pozycję α łańcucha fosforanowego.

Jedną z nowszych metod syntezy α-tiosfosforanów nukleozydów jest metoda oksatiafosforanowa, która pierwotnie była stosowana głównie w syntezie modyfikowanych chemicznie oligonukleotydów ze szkieletem tiosfosforanowymi. W pierwszym etapie do zabezpieczonego w pozycjach 2' i 3' nukleozydu przyłącza się ugrupowanie oksatiafosforanowe poprzez reakcję z aktywną pochodną chlorową. Tak aktywowany nukleozyd jest w dalszym etapie sprzęgany z nukleotydem lub innym związkiem zawierającym grupę fosforanową. Proces ten opiera się na wykorzystaniu DBU, który prowadzi do otwarcia pierścienia heterocyklicznego umożliwiając dołączenie drugiej jednostki fosforanowej.<sup>72</sup> Należy nadmienić, że istnieje wariant stereoselektywny tej reakcji wykorzystany m.in do otrzymywania czystych diastereoizomerycznych oligofosforanów zawierających modyfikację tiosfosforanową.<sup>73-75</sup> Z uwagi na swoją użyteczność metoda ta została także wykorzystana do otrzymywania modyfikowanych tiosfosforanowych pochodnych nukleozydów (**Schemat 1.15**). Pierwsze rezultaty wskazały na pomyślne zachodzenie otwarcia pierścienia 2-tio-1,3,2-ditiosfosforanowego, jednakże wydajności uzyskanego produktu były nieduże. Analiza widm <sup>31</sup>P NMR uzyskanych z mieszaniny reakcyjnej wskazały na obecność sygnałów od powstającego się pseudodimerycznego produktu ubocznego, powstałego na skutek substytucji nukleofilowej połączonej z otwarciem pierścienia przez wodę (**Schemat 1.15B**). Po rozwiązaniu problemów wynikłych z obecności wody reakcja zachodziła z dużą wydajnością jednakże nie zaobserwowano znaczącej stereoselektywności i obydwa diastereoizomery występowały w podobnym stosunku molowym.<sup>76</sup>



**Schemat 1.15.** Zastosowanie metody oksatiafosforanowej w syntezie ( $\alpha$ -tio)trifosforanów. **(A)** Synteza 2-deoksytiofosforanów. **(B)** Obserwowany produkt uboczny powstający w wilgotnym środowisku reakcji.

Poza ( $\alpha$ -tio)trifosforanami nukleozydów prowadzono pracę nad syntezą innych pochodnych tiofosforanowych. Pierwszą opisaną w literaturze syntezą adozyno 5'-O-(3-tio)trifosforanu ( $\text{App}_S$ ) opierała się na aktywacji ADP za pomocą reakcji z tlenochlorkiem difenylu (**Schemat 1.16**). Powstały intermediat był następnie poddany działaniu 2-S-etylokarbamoilotiofosforanem, jednakże wydajność tego procesu była bardzo niska - poniżej 5%. By zaradzić niskiej efektywności reakcji, przy pomocy tlenochlorku difenylu, aktywowano karbamoilotiofosforan. Następnie do tak powstałej mieszaniny reakcyjnej dodawano porcjami ADP a powstały związek hydrolyzowano co znacząco polepszyło wydajność całej syntezy.<sup>64</sup>

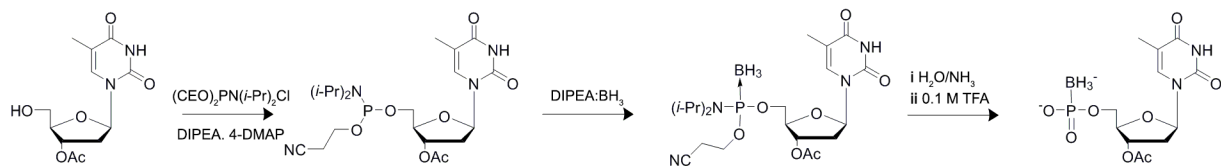


**Schemat 1.16.** Synteza  $\text{App}_S$  z użyciem S-2-etylokarbamoilotiofosforanu.

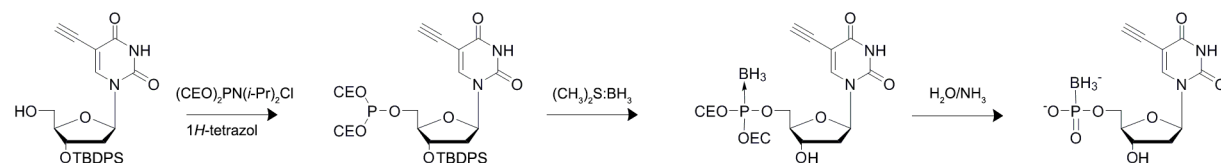
## 1.2.5.4.5. Boranofosforany

### 1.2.5.4.5.1. Monofosforany

Amidofosforany znajdują szerokie zastosowanie w chemii kwasów nukleinowych, głównie w syntezie oligonukleotydów.<sup>77</sup> Zostały one także użyte do otrzymania boranomonomofosforanów (**Schemat 1.17**). Głównym problemem tej metody jest powstawanie produktu ubocznego (NMP), który jest trudny do oddzielenia od właściwego produktu.<sup>19, 78</sup> Po pewnych modyfikacjach metoda ta została użyta do syntezy leku przeciwnowotworowego, 5'monoboranofosforanu 5-etynourydyny (**Schemat 1.18**). Po przeprowadzeniu boronacji i usunięciu grupy ochronnej TBDPS uzyskano oczekiwany produkt. Znaczącą zaletą tego podejścia jest eliminacja etapu hydrolyzy co czyni je efektywną metodą do syntezy modyfikowanych nukleotydów wrażliwych na niskie pH.<sup>79</sup>



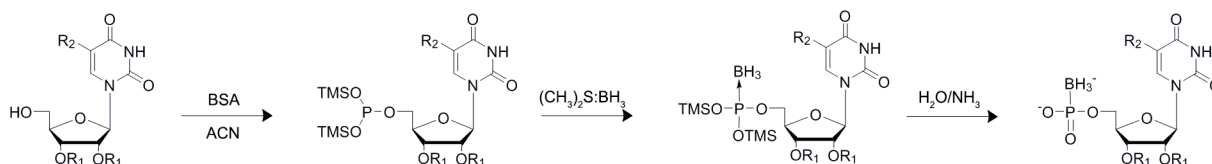
**Schemat 1.17.** Wykorzystanie amidofosforanów nukleozydów w syntezie boranofosforanów nukleozydów.



**Schemat 1.18.** Jedna z modyfikacji metody amidofosforanowej.

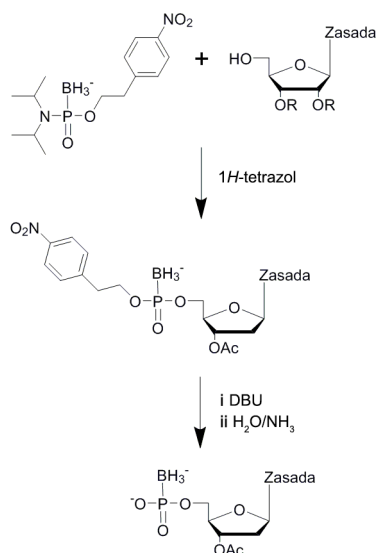


W latach 90' chemia *H*-fosfonianów znalazła zastosowanie do syntezy wielu różnorodnych pochodnych fosforanów oraz oligonukleotydów wliczając w to boranofosforany (**Schemat 1.19**).<sup>80</sup> *H*-fosfonian może pod wpływem środka boranującego, takiego jak kompleks DIPEA·BH<sub>3</sub>, ulec konwersji do boranofosforanu. Mimo tych potencjalnych problemów (rozpad kompleksu boranowego pod wpływem wody) metoda *H*-fosfonianowa została zastosowana do syntezy szeregu boranofosforanowych pochodnych nukleotydów. Jednym z przykładów zastosowania tej metody może być synteza acykloNMPB.<sup>19</sup>



**Schemat 1.19.** Metoda *H*-fosfonianowa w syntezie boranofosforanów nukleozydów.

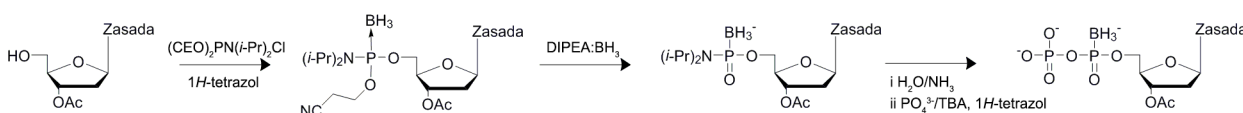
Synteza 5'-boranomono-fosforanów może zostać także osiągnięta za pomocą elektrofilowych związków boranofosforujących. Jednym z pierwszych przykładów takiego podejścia była synteza 5'-dimetyloboranofosforanu tymidyny przy pomocy boranofosforanu tetrametylu. Innym związkiem boranofosforującym jest ester etylowy 2-(4-nitrofenylo), który łatwo reaguje z grupami hydroksylowymi nukleotydów (**Schemat 1.20**). Do efektywnego działania związek ten wymaga obecności 1*H*-tetrazolu jako katalizatora natomiast grupa 2-(4-nitrofenylo)etylowa może zostać łatwo usunięta na drodze β-eliminacji przy wykorzystaniu DBU.<sup>19</sup>



**Schemat 1.20.** Wykorzystanie elektrofilowych środków boranofosforujących w syntezie boranofosforanów nukleozydów.

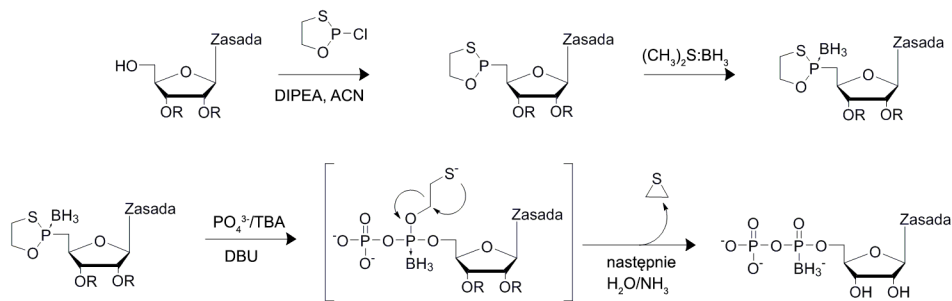
#### 1.2.5.4.5.2. Difosforany

Boranowane amidofosforyny mogą zostać użyte jako dogodne prekursorzy w syntezie 5-(1-*P*-borano) difosforanów nukleozydów (Np<sub>BH<sub>3</sub></sub>p, **Schemat 1.21**). Metoda ta była pierwszym sposobem syntezy Np<sub>BH<sub>3</sub></sub>p o zadowalającej wydajności i polega na fosfitylacji zabezpieczonego w pozycjach 2' i 3' nukleozydu za pomocą 2-cyanoetylotetraizopropylfosforodiamidu.<sup>31</sup> Związek ten, w odróżnieniu od wielu podobnych mu związków nie wykazuje skłonności do reakcji z grupami aminowymi w zasadach azotowych.<sup>81</sup>



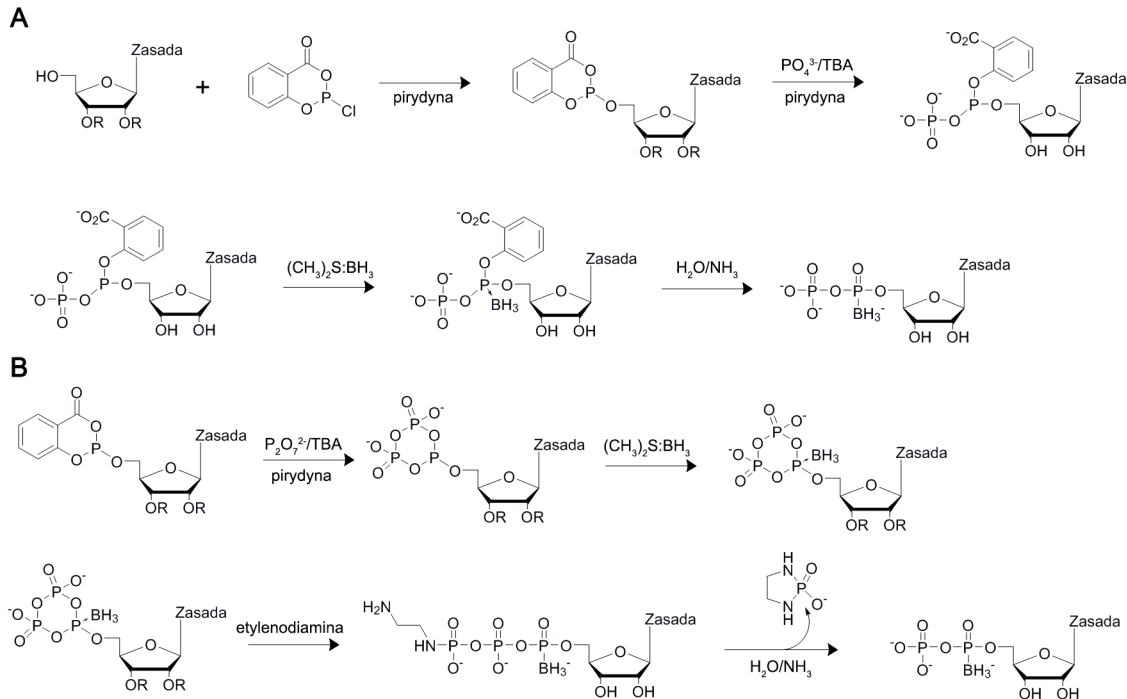
**Schemat 1.21.** Metoda syntezy Np<sub>BH<sub>3</sub></sub>p w oparciu o boranowane amidofosforyny.

Oksazotiofosfolany także mogą zostać zastosowane w syntezie boranofosforanów (**Schemat 1.22**). Taka jednoetapowa synteza została zastosowana w celu otrzymania zestawu związków, obejmujących m.in.  $\text{Ap}_{\text{BH}_3}\text{p}$ ,  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$ ,  $\text{Cp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  oraz  $\text{Tp}_{\text{BH}_3}\text{p}$ , każdy z tych związków został uzyskany z satysfakcjonującą wydajnością. Znaczną zaletą tej metody jest eliminacja procesu redukcji zasady azotowej podczas etapu boranowania, dlatego też nie jest wymagane stosowanie ochrony zasady za pomocą aminy egzocyklicznej.<sup>82</sup>



**Schemat 1.22.** Metoda oksazotiofosfolanowa w syntezie  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{p}$ .

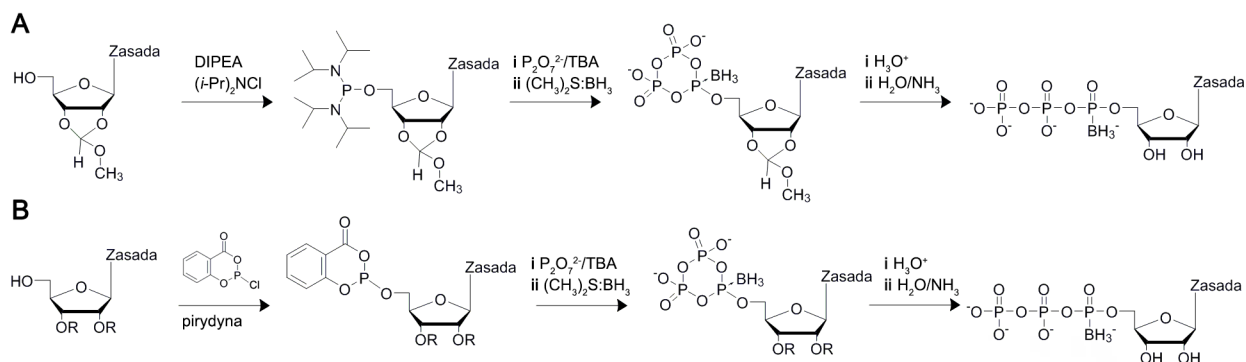
Reakcja Ludwiga-Ecksteina (**Schemat 1.23A**) także może zostać zaadaptowana do syntezy  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{p}$ , jednakże pierwsze próby otrzymania  $\text{Tp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  zachodziły z niską wydajnością. Co gorsza wydajność syntezy produktu ubocznego,  $\text{Tp}_{\text{BH}_3}\text{pp}$ , była wyższa niż oczekiwanego produktu. W celu przezwyciężenia tych trudności reakcja jest prowadzona w obecności dietyloaminy co znacznie poprawia wydajność (**Schemat 1.23B**). W kluczowym etapie reakcji cykliczny trifosforan jest boronowany *in situ* przez kompleks boranu z disiarczkiem metylu w obecności dietyloaminy w wyniku czego powstaje  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{p}$  oraz cykliczny fosforoamid.<sup>39</sup> Obecność tych produktów tłumaczy się za pomocą mechanizmu polegającego na otwarciu pierścienia metafosforanowego przez dietyloaminę i następujące po nim wewnątrzcząsteczkowe podstawienie nukleofilowe. Pomimo, że przedstawione intermedyaty nie zostały wyizolowane, to ich obecność została potwierdzona przez pomiary NMR. Proces otwarcia pierścienia może teoretycznie zachodzić na grupie fosforanowej lub boranofosforanowej, jednak struktura końcowego produktu wskazuje, że ma on miejsce jedynie na grupie fosforanowej (podobnie jak w przypadku syntez  $\text{Np}_s\text{p}$ ).<sup>83</sup>



**Schemat 1.23.** Mechanizm reakcji Ludwiga-Ecksteina dla wprowadzania grupy boranowej. **(A)** Podstawienie ortofosforanem i następnie boronowanie prowadzi do powstania  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{p}$  podstawionego w pozycji  $\alpha$  ugrupowaniem aromatycznym, grupa aromatyczna jest usuwana podczas hydrolizy w środowisku zasadowym. **(B)** ulepszony wariant reakcji zapewniający większą wydajność.

### 1.2.5.4.5.3. Trifosforany

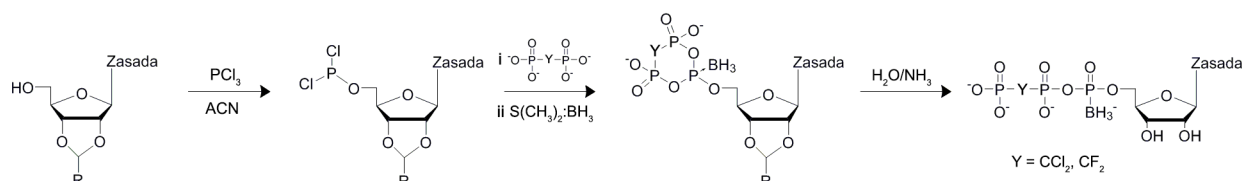
$\text{Tp}_{\text{BH}_3}\text{pp}$  był pierwszym syntetycznie otrzymanym boranofosforanowym analogiem NTP. Otrzymano go w reakcji z amidofosforanem nukleozydu i nadmiarem molowym pirofosforanu butyloaminy. Metoda ta może zostać zastosowana do syntezy innych  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{pp}$  (**Schemat 1.24A**), jednakże dla innych zasad azotowych wymagane jest zabezpieczenie grup aminowych w pierścieniu zasady.<sup>78</sup> W przeciągu kilku lat w oparciu o podejście amidofosforynowe opracowano nową strategię syntetyczną, która została zastosowana w syntezie serii analogów agonistów receptorów  $\text{P2Y}_1$ .<sup>84</sup> Synteza jest udoskonalona względem wcześniejszych wersji tej metody z uwagi na użycie łagodnego związku fosfitylującego, bis(diizopropylamido)fosforynu, który nie reaguje z grupami aminowymi w zasadach purynowych. Podobna strategia została wykorzystana do otrzymania kilku acykloNTP i ich boranofosforanowych analogów.<sup>85</sup>



**Schemat 1.24.** Syntezy  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{pp}$  z użyciem (A) amidofosforynów lub (B) reakcji Ludwiga-Ecksteina.

Na podstawie opisanej wcześniej reakcji Ludwiga-Ecksteina opracowano inną dogodną metodę syntezy  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{pp}$ . Jediną różnicą jest wykorzystanie kompleksu boranu w siarczku dimetylu w roli związku reagującego z cyklicznym trifosforanem powstałym po dodaniu pirofosforanu (**Schemat 1.24B**). Jak wspomniano wcześniej, możliwa jest selektywna produkcja  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{p}$  lub  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{pp}$  w zależności od nukleofila użytego w reakcji otwarcia pierścienia metafosforanowego, w pierwszym przypadku jest nim etylenodiamina w drugim woda.

Jedną z opisanych modyfikacji reakcja L-E mających znaczenie w syntezie polega na wykorzystaniu  $\text{PCl}_3$  jako odczynnika fosfitylującego (**Schemat 1.25**), czego zaletą jest pewne uproszczenie procedury reakcyjnej (reakcja zachodzi w acetonitrylu a nie w pirydynie i jest mniej wrażliwa na ślady wilgoci).<sup>54</sup> Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do syntez związków zawierających dodatkowe modyfikacje w pozycji mostkowej  $\beta/\gamma$  takie jak substytucja atomu tlenu przez grupy  $\text{CH}_2$  lub  $\text{CCl}_2$ .<sup>86</sup>



**Schemat 1.25.** Modyfikacja reakcji Ludwiga-Ecksteina z użyciem  $\text{PCl}_3$ .

## 1.2.5.5. Właściwości biologiczne i zastosowania

### 1.2.5.5.1. Badania biochemiczne

Nukleotydy modyfikowane grupą tio- lub boranofosforanową znalazły zastosowanie w badaniach nad stereospecyficznością enzymów wykorzystujących nukleotydy jako substraty (fosfordiesterazy, polimerazy DNA/RNA etc.) oraz w poszukiwaniu ich inhibitorów.

Jednym z przykładów może być enzymatyczna synteza kwasów nukleinowych (DNA lub RNA). W reakcji tej NTP mogą zostać zastąpione odpowiednimi  $\alpha$ -modyfikowanymi analogami ( $\text{Np}_s\text{pp}$ ,  $\text{Np}_{sc}\text{pp}$ ,  $\text{Np}_{\text{BH}_3}\text{pp}$ ) otrzymując

oligonukleotydy ze zmodyfikowanymi wiązaniami 5'-3'-fosfodiesterowymi. Wykazano, że większość polimeraz DNA i RNA (np. polimeraza RNA T7, polimerazy DNA z *E. coli*) działa z dużą stereoselektywnością, wykorzystując jeden z diastereizomerycznych substratów ( $S_p$  - dla S i Se,  $R_p$  - dla  $BH_3$ ) kilkadziesiąt do kilkuset razy szybciej niż drugi izomer.<sup>85, 87-89</sup> Podczas polimeryzacji zachodzi atak nukleofilowy grupy 3'-OH oligonukleotydu na atom fosforu  $\alpha$  kolejnego dołączanego nukleotydu (co wiąże się z odwróceniem konfiguracji na atomie fosforu). Hydroliza nukleotydów i oligonukleotydów przez fosfatazy i fosfodiesterazy jest innym przykładem P-diastereoselektywności w reakcjach enzymatycznych. Wiele z tych enzymów jest silnie selektywnych względem określonej konfiguracji absolutnej. Bakteryjna nukleaza P1 hydrolizuje tylko wiązania tiofosfodiesterowe o konfiguracji  $S_p$  natomiast wiele rybonukleaz hydrolizuje tylko wiązania o konfiguracji  $R_p$ .<sup>16, 19, 35, 90</sup>

Fosfodiesteraza wyizolowana z jadu węża *Crotalus adamanteus* (ang. SVPDE, *Snake Venom Phosphodiesterase*) miała istotne znaczenie w badaniach stereochemicznych nad modyfikowanymi nukleotydami.<sup>34</sup> SVPDE hydrolizuje zarówno wiązanie 3',5'-fosfodiesterowe w oligonukleotydach, uwalniając 5' monofosforan nukleozydu, jak i 5'-trifosforany nukleozydów (degradowane do odpowiednich monofosforanów). W obu przypadkach tylko grupy tiofosforanowe o konfiguracji  $R_p$  ulegają hydrolizie. Przy użyciu znakowanych izotopowo substratów udowodniono, że reakcja ta przebiega poprzez podwójne podstawienie co skutkuje retencją konfiguracji na atomie fosforu. Stereochemia tej reakcji jest taka sama w przypadku wiązań boranofosfodiesterowych co oznacza, że hydrolizowane są tylko wiązania o konfiguracji  $S_p$ .<sup>16, 34, 78</sup> Co więcej, analiza przebiegu reakcji enzymatycznej z SVPDE pomogła w ustaleniu konfiguracji enzymatycznej diastereomerów 5'-(1-tiotrifosforanu) adenozyne,  $Ap_{3pp}$ . Spośród izomerów D1 i D2  $Ap_{3pp}$  (kolejność elucji na kolumnie jonowymiennej) tylko izomer D2 był hydrolizowany przez SVPDE.<sup>91</sup> Hydrolizie przez ten enzym ulegał również tylko jeden z diastereomerów dinukleotydu  $Up_5A$ , którego konfigurację absolutną ustalono wcześniej jako  $R_p$ . Na tej podstawie uznano, że związki te mają takie same położenie przestrzenne podstawników wokół atomu fosforu, zatem  $Ap_{3pp}$  (D2) ma konfigurację  $R_p$ . W podobny sposób powiązano konfigurację  $Ap_{3pp}$  (D2) z konfiguracją 3'-5' cyklicznego tiofosforanu urydyny, ustaloną wcześniej na podstawie danych krystalograficznych.<sup>92, 93</sup>

Co ciekawe przeprowadzone kilka lat temu badania biochemiczne zakwestionowały niektóre ze wcześniejszych ustaleń dotyczących stereochemii reakcji katalizowanych przez enzymy takie jak egzonukleazy z grupy III oraz termostabilna polimeraza Taq.<sup>94</sup> Z uwagi na zróżnicowanie ewolucyjne nukleaz i polimeraz zasugerowano także, że uzyskane wcześniej wyniki dla kilku modelowych enzymów nie zawsze mogą być ekstrapolowane na inne białka.<sup>94, 95</sup>

#### 1.2.5.5.2. Zastosowania medyczne

Z uwagi na silne powinowactwo do niektórych białek oraz zmniejszoną podatność na degradację enzymatyczną zaproponowano kilka zastosowań medycznych dla nukleotydów z modyfikacjami w łańcuchu fosforanowym.

Białka należące do rodziny receptorów P2 są często aktywowane przez endogenne nukleotydy postaci  $Np_nN'$  takie jak  $Ap_4A$ . Do tej pory opisano 8 receptorów P2 występujących w różnych tkankach, zwłaszcza w układzie nerwowym. Ponieważ zaburzenia ich działania związane są z różnymi schorzeniami to na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat prowadzono intensywne badania nad syntezą i zastosowaniami medycznymi agonistów tych receptorów.<sup>96, 97</sup> Wiele boranofosforanowych analogów  $Ap_4A$  i  $Up_4U$  wykazało takie właściwości *in celluo* a badania nad mechanizmem ich działania mogą być pomocne w zaprojektowaniu bardziej selektywnych agonistów.<sup>98, 99</sup> Z tym zagadnieniem łączy się też zastosowanie modyfikowanych trifosforanów nukleozydów oraz analogów  $Ap_5A$  jako inhibitorów pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydu 1 (NPP1). Enzym ten odgrywa rolę w regulacji szlaków sygnałowych związanych z receptorami P1 oraz P2<sup>100</sup> a zaburzenia jego aktywności są skorelowane ze schorzeniami takimi jak chondrokalcycytoza<sup>101</sup>, nowotwory mózgu<sup>102</sup> oraz cukrzyca typu II.<sup>103</sup> Badanie przeprowadzone na związkach takich jak  $Ap_{5p}CH_2p$ ,  $Ap_{5p}CCl_2p$  oraz  $ApCH_2p_5$  pokazały, że są one jednymi z najsilniejszych znanych inhibitorów tego enzymu.<sup>68</sup>

Wykazano też, że analogi ADP, ATP oraz  $Ap_5A$  posiadających modyfikacje boranofosforanowe w pozycji Pa mogą mieć potencjalne zastosowanie w jako neuroprotektory chroniące tkankę nerwową przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Związki te były badane *in vitro* oraz *in celluo* gdzie pokazano, że redukują one stres oksydacyjny. Ponadto są one stabilne w ludzkim osoczu.<sup>86</sup> Szereg tiofosforanów nukleozydów także wykazuje właściwości

ochronne przed stresem oksydacyjnym. Do tej pory przebadano pod tym względem związki takie jak A(G)ppp<sub>s</sub>, A(G)pp<sub>s</sub> oraz 2',5' i 3',5' bis(tiofosforany) adenozyne i guanozyne. Badania biologiczne pokazały, że większość z tych związków działa jako efektywne chelatory kationów Cu<sup>+</sup> oraz Fe<sup>2+</sup>, których aktywność fizjologiczna jest powiązana z generowaniem reaktywnych form tlenu uszkadzających komórki.<sup>62, 86, 104</sup> Ponadto, szereg boranofosforanowych analogów nukleotydów to potencjalne leki antywirusowe, które mogą być inhibitorami odwrotnej transkryptazy wirusa HIV<sup>85, 105</sup> a także obniżać jego odporność na działanie inhibitorów polimerazy RNA<sup>36</sup>

#### 1.2.5.5.3. Modyfikowane kwasy nukleinowe

Zarówno modyfikacje tio- jak i boranofosforanowe mogą zostać wprowadzone do kwasów nukleinowych. Można w tym celu wykorzystać albo polimerazy zdolne do inkorporacji modyfikowanych NTP do kwasów nukleinowych albo też wykorzystać zmodyfikowane protokoły syntezy DNA i RNA na podłożu stałym. Szereg prac opisuje metody syntezy tiofosforanowych oraz boranofosforanowych pochodnych DNA, niektóre z nich są także stereoselektywne.<sup>19, 21, 106, 107</sup> Badania biologiczne tak zmodyfikowanych nukleotydów wskazały na ich większą stabilność *in vivo* i/lub powinowactwo do ich celów molekularnych. Dlatego też tak modyfikowane kwasy nukleinowe są rozważane jako narzędzia w terapii genowej (antysensowne oligonukleotydy, korekcja zaburzeń splicingu stabilizacja mRNA)<sup>108, 109</sup> lub badaniach biochemicznych.<sup>19, 110</sup> Nowe doniesienia na temat boranofosforanowych analogów DNA sugeruje, że z uwagi na swoje właściwości redukujące względem kationów metali mogą być przydatne w nanotechnologii.<sup>111, 112</sup>

### 1.3. Fluorescencja i znaczniki fluorescencyjne

Jednym z części projektu doktoranckiego była synteza i zbadanie właściwości fizykochemicznych analogów kapu znakowanych fluorescencyjnie. Dlatego też w niniejszym rozdziale przedstawiono podstawowe informacje na temat fluorescencji oraz technik mających związek z badaniami prowadzonymi podczas doktoratu. Ponadto dokonano krótkiego przeglądu znaczników fluorescencyjnych, znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów oraz znakowania mRNA w komórkach. Ponieważ otrzymane przez Autora analogi kapu są znakowane grupą antranoilową lub mantranoilową to końcu rozdziału opisano dokładnie właściwości oraz zastosowania tak modyfikowanych nukleotydów.

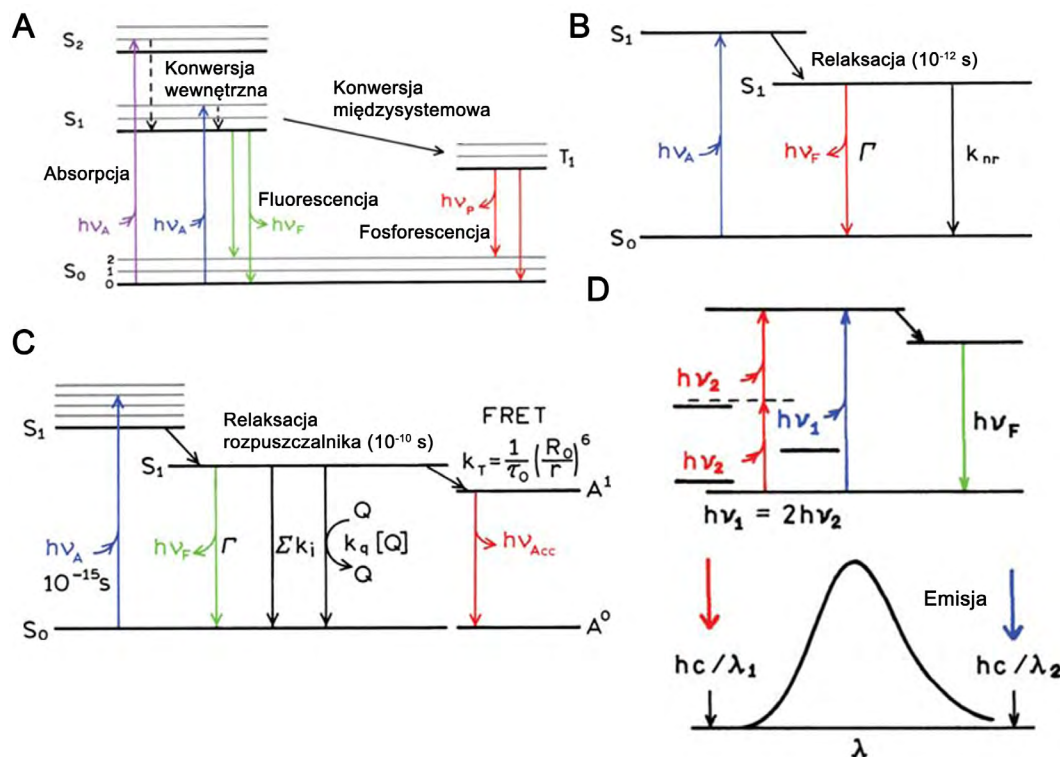
#### 1.3.1. Podstawy technik fluorescencyjnych

##### 1.3.1.1. Fizyka procesu wzbudzenia i emisji

Luminescencja to proces emisji fotonów przez cząsteczki na wzbudzonych poziomach elektronowych. Ze względu na naturę stanu wzbudzonego można ją formalnie podzielić na fluorescencję oraz fosforescencję. W stanie singletowym elektron na wzbudzonym orbitalu jest spinowo sparowany do drugiego elektronu na orbitalu w stanie podstawowym przez co powrót do stanu podstawowego jest spinowo dozwolony i zachodzi bardzo szybko (szybkość emisji wynosi ok 10<sup>8</sup> s<sup>-1</sup>). Natomiast w przypadku fosforescencji emisja zachodzi ze wzbudzonego stanu trypletowego, gdzie elektrony na orbitalu wzbudzonym oraz podstawowym mają taką samą orientację spinu. Przejście do stanu podstawowego jest zabronione a szybkości emisji są znacznie wolniejsze (10<sup>3</sup> do 10<sup>0</sup> s<sup>-1</sup>). Z uwagi na zachodzenie wielu procesów konkurujących z emisją, fosforescencja jest rzadko obserwowana w roztworach w temperaturze pokojowej. Procesy zachodzące pomiędzy absorpcją a emisją światła są zwykle obrazowane za pomocą diagramu Jabłońskiego. Typowy diagram został ukazany na **Rys. 1.10**.

Ważną cechą fluorescencji jest to, że emisja zawsze zachodzi przy długości fali o niższej energii a różnica w długości fali dla maksimum absorpcji i emisji nazywana jest przesunięciem Stokesa i jest zależna od środowiska. Ponadto kształt widma emisyjnego jest zasadniczo niezależny od długości fali wzbudzenia. Po wzbudzeniu do wyższego stanu elektronowego i oscylacyjnego nadmiarowa energia ulega szybkiej dyssypacji pozostawiając

fluorofor w stanie  $S_1$  przez co struktura widma emisyjnego nie ulega zmianie. Wyjątkiem są fluorofory istniejące w równowadze pomiędzy dwoma lub więcej stanami jonowymi z których każdy posiada inne widma absorpcji i emisji.<sup>113</sup>



**Rys. 1.10.** Diagram Jabłońskiego. (A) Stany elektronowe podstawowy  $S_0$  oraz wzbudzone  $S_1$  oraz  $S_2$  posiadają szereg poziomów oscylacyjnych oznaczonych jako 0, 1, 2 etc. Przejścia pomiędzy stanami oznaczono jako linie pionowe, zachodzą one w czasie około  $10^{-15}$  s przez co można założyć, że pozycja jąder atomowych nie ulegnie zmianie. Absorpcja i emisja zachodzą prawie zawsze dla cząsteczek o najniższym poziomie oscylacyjnym. Fluorofor jest zwykle wzbudzany do jednego z wyższych stanów  $S_1$  lub  $S_2$  jednakże ulega on szybkiej ( $10^{-12}$  s) relaksacji do najniższego stanu a proces ten nazywany jest konwersją wewnętrzną. Emisja zachodzi zawsze przy dłuższej długości fali niż absorpcja co związane jest ze częściowym rozpraszaniem energii pomiędzy tymi zdarzeniami. Cząsteczki w stanie  $S_1$  mogą też podlegać konwersji spinowej do stanu trypletowego  $T_1$ . Emisja z takiego stanu to fosforescencja i zazwyczaj jest przesunięta do fal o większej długości w stosunku do fluorescencji. (B) Uproszczony diagram Jabłońskiego ilustrujący znaczenie wydajności kwantowej oraz czas życia fluorescencji. Po relaksacji fluorofor może podlegać emisji, opisywanej stałą emisyjną ( $\Gamma$ ) lub też ulec przejściu bezpromienistemu opisywanego stałą  $k_{nr}$ . Wzajemny stosunek tych dwóch wielkości ma wpływ na wydajność fluorescencji oraz czas jej życia (patrz tekst) (C) Diagram uwzględniający wygaszanie kolizyjne oraz rezonansowy transfer energii Förstera (FRET). Czynniki  $\sum k_i$  oznacza ogół procesów prowadzących do przejścia bezpromienistego innych niż wygaszanie kolizyjne. (D) Diagram dla wzbudzenia dwufotonowego. Przy odpowiedniej mocy lasera fluorofor absorbuje dwa fotony o niższej energii, których sumaryczna energia jest tożsama z energią fotonu potrzebnego do klasycznego wzbudzenia, czego efektem jest przejście do stanu wzbudzonego. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2007.

### 1.3.1.2. Wydajności kwantowe i czas życia fluorescencji

Wielkości te są bardzo istotne w opisie danego fluorofora. Wydajność kwantowa ( $Q$ ) to stosunek wyemitowanych fotonów do ilości absorbowanych fotonów. Substancje o wysokich wydajnościach kwantowych mają intensywną emisję. Czas życia fluorescencji ( $\tau$ ) oznacza uśredniony czas trwania cząsteczki w stanie wzbudzonym. Znaczenie tych wielkości zilustrowano na **Rys. 10B**. Procesy odpowiedzialne za przejście do stanu podstawowego to stała emisji fluoroforu ( $\Gamma$ ) oraz szybkość zaniku bezpromienistego ( $k_{nr}$ ). Ponieważ  $Q$  stanowi stosunek fotonów wyemitowanych do zaabsorbowanych to można zapisać:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad \text{Rów. 1.1}$$

Natomiast czas życia fluorescencji jest określany przez uśredniony czas spędzony w stanie wzbudzonej przed powrotem do stanu podstawowego. Można zatem zapisać:

$$\tau = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad \text{Rów. 1.2}$$

Zwykle czasy życia fluorescencji wynoszą  $\sim 10$  ns należy jednak pamiętać, że emisja jest procesem losowym i bardzo niewiele poszczególnych cząsteczek wyemituje foton dokładnie dla  $t = \tau$ .<sup>113</sup>

### 1.3.1.3. Rezonansowy transfer energii (RET)

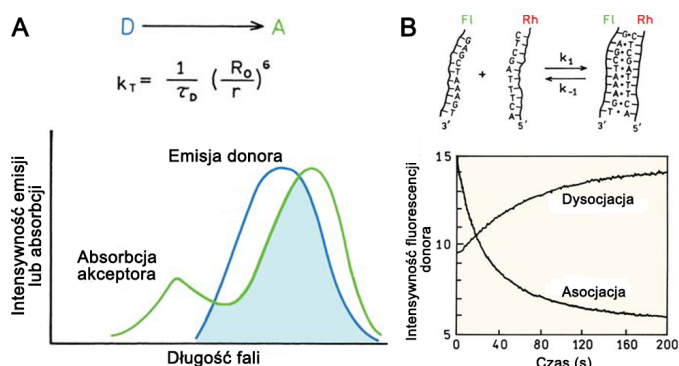
Wspomniane zjawisko ma miejsce gdy widmo emisyjne fluoroforu (donora) częściowo pokrywa się z widmem absorpcyjnym innej cząsteczki (akceptora), który nie musi być fluoroforem (**Rys. 1.10C**). Proces RET nie wiąże się z absorpcją światła emitowanego przez donora dokonywaną przez akceptor. Takie procesy emisji-absorpcji są obserwowane ale są zależne od stężenia akceptora oraz inne czynniki niezwiązane z oddziaływaniem molekuł. W istocie oddziaływanie donora-akceptora opiera się na bezpromienistym sprzężeniu dipol-dipol i jest zależne od odległości oraz wzajemnego ułożenia obydwu dipoli.<sup>113</sup> Istnieje kilka mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko, jednak najpowszechniejszym i mającym największe znaczenie jest FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*). Fizyczne podłoże tego procesu jest skomplikowane, zakłada się, że donor emituje wirtualny foton, który ulega natychmiastowej absorpcji przez akceptor. Ponieważ wirtualny foton nie jest obserwowalny to opisany mechanizm jest bezpromienisty. Prace teoretyczne wykazały też, że FRET oraz promienisty transfer energii są skrajnymi aspektami jednego ogólnego procesu.<sup>114, 115</sup> Celem uproszczenia nakładanie spektralne jest opisane przy użyciu odległości Förstera ( $R_0$ ), można wtedy zdefiniować stałą transferu energii  $k_T(r)$  jako:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Rów. 1.3}$$

gdzie  $r$  jest odległością pomiędzy donorem (D) i akceptorem (A) a  $\tau_D$  jest czasem życia fluorescencji donora pod nieobecność transferu energii. Wydajność transferu energii ( $E$ ) dla określonego dystansu może być zapisana jako:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Rów. 1.4}$$

Wydajność transferu jest silnie zależna od odległości, zwykle wartości  $R_0$  zawarte są w przedziale 30 do 60 Å dzięki czemu RET może być wykorzystywany w badaniach biocząsteczek. Obecnie jest on jedną z najczęściej wykorzystywanych technik zarówno w badaniach interakcji biocząsteczek<sup>116</sup> jak i poznawaniu ich struktury oraz dynamiki<sup>117</sup> oraz budowania sensorów molekularnych<sup>118</sup>.



**Rys. 1.11.** Rezonansowy transfer energii. (A) W procesie ma miejsce transfer energii z donora (D) do akceptora (A) poprzez oddziaływanie dipoli elektromagnetycznych. Stała transferu energii  $k_T(r)$  może zostać zdefiniowana poprzez odległość Förstera i jest skalowana od odległości ( $r$ ) pomiędzy A i D zgodnie z  $(1/r)^6$ . (B) Przykładowe zastosowanie zjawiska w badaniach biochemicznych. W celu monitorowania hybrydyzacji DNA jeden jednoniciowy fragment został wyznakowany fluorescencyjnie rodaminą a nić komplementarną wyznakowano fluoresceiną. Pomiar FRET pozwolił na pomiar tworzenia się (lub) rozpadu dupleksu DNA w funkcji czasu.<sup>123</sup> Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2007

Technika ta znalazła bardzo wiele zastosowań w biochemii<sup>119</sup>, biologii komórki<sup>120, 121</sup> oraz biofizyce<sup>117, 122</sup>, co zostało opisane w szeregu prac przeglądowych i monografi. Przykładowe zastosowanie do badania hybrydyzacji kwasów nukleinowych zostało zobrazowane na **Rys. 1.11**.

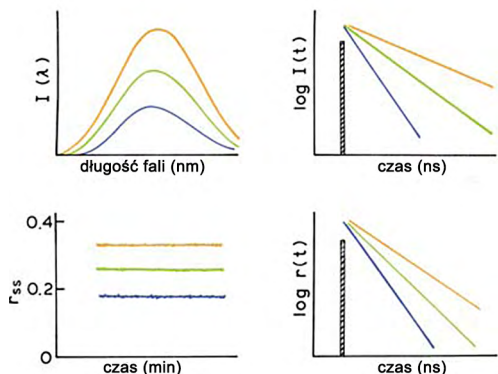
### 1.3.1.4. Spektroskopia czasowo-rozdzielcza

W ogólności pomiary fluorescencyjne mogą zostać zaklasyfikowane jako niezależne od czasu lub czasowo-rozdzielcze. Najczęściej spotykane są pomiary niezależne od czasu, wykonywane przy ciągłym naświetlaniu i obserwacji – próbka jest eksponowana na wiązkę światła a jej widmo jest wtedy rejestrowane. Można wtedy zapisać następujące wyrażenia na zanik intensywności:

$$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)} \quad \text{Rów. 1.5} \quad r(t) = r_0 e^{(-t/\theta)} \quad \text{Rów. 1.6}$$

Odmiernym typem obserwacji jest pomiar czasowo-rozdzielczy, stosowany do pomiaru czasu zaniku intensywności. W takim pomiarze na próbkę pada krótki impuls światła (zwykle krótszy niż czas zaniku fluorescencji) a zanik wybranego parametru jest rejestrowany przez odpowiedni system detekcji zdolny do rejestracji zmian intensywności w skalach czasowych  $10^{-9}$  s.

Należy pamiętać, że w pomiarze niezależnym od czasu można uzyskać jedynie wiedzę o uśrednionej wartości danej wielkości (jest ona niezależna od czasu) przez co wiele subtelnych informacji o właściwościach fluorofora jest utraconych (**Rys. 1.12**). Przykładowo zanik intensywności fluorescencji często nie może być adekwatnie opisany za pomocą pojedynczej funkcji wykładniczej. Dokładne informacje na temat tych parametrów są pomocne w zrozumieniu zachowania się fluoroforu w danym środowisku, jednak są one tracone w pomiarze niezależnym od czasu. Przykładowo obecność więcej niż jednego czasu życia fluorescencji świadczy o istnieniu różnych konformacji w roztworze. Udziały poszczególnych czasów zanika przekładają się na udziały tych konformacji w populacji.<sup>113</sup>



**Rys. 1.12.** Porównanie pomiarów niezależnych od czasu (górną) lub czasowo-rozdzielczych (dół). Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2007

### 1.3.2. Znaczniki fluorescencyjne

#### 1.3.2.1. Naturalnie występujące fluorofory

W przyrodzie istnieje ogromna liczba związków wykazujących zdolność do fluorescencji. Przykładami mogą być aromatyczne reszty aminokwasowe oraz kofaktory enzymów. Naturalna fluorescencja białek wynika z obecności aromatycznych aminokwasów, tryptofanu (Trp, W), tyrozyny (Tyr, Y) oraz fenyloalaniny (Phe, F). Z punktu widzenia badań biochemicznych i biofizycznych największe znaczenie ma fluorescencja Tyr oraz Trp. Dokładniejsze informacje na temat fluorescencji białek zawarte są w rozdziale *Fluorescencja białek*.

Wiele kofaktorów enzymów także wykazuje właściwości fluorescencyjne. NADH wykazuje silną fluorescencję, z maksimami absorpcji i emisji wynoszącymi odpowiednio 340 nm i 460 nm natomiast utleniona forma  $\text{NAD}^+$  nie jest fluorescencyjna. Fluoroforem w tym związku jest zredukowany pierścień nikotynoamidowy. Innym fluorescencyjnym kofaktorem jest fosforan pirydoksalu, jego widma absorpcyjne i emisyjne są zależne od otoczenia chemicznego (miejsca w którym jest on dołączony do struktury białka). Ryboflawina, FMN oraz



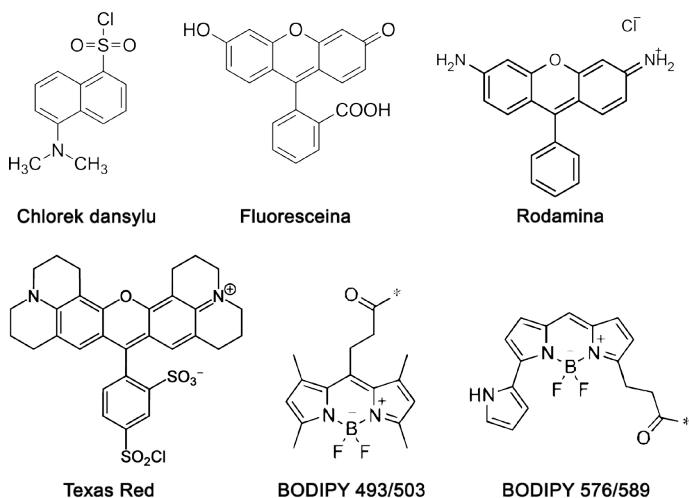
FAD także absorbują i emitują w zakresie światła widzialnego jednakże w odróżnieniu od NADH fluorescencję wykazują ich utlenione formy.<sup>1</sup>

### 1.3.2.2. Syntetyczne fluorofory

Ponieważ w bardzo wielu przypadkach związki będące obiektami badań nie są fluorescencyjne (lub też ich fluorescencja nie spełnia określonych wymagań) to zachodzi potrzeba wprowadzania syntetycznych fluoroforów. Obecnie istnieje bardzo wiele związków, które mogą być użyte w tym celu, dużo informacji na ich temat można znaleźć w szeregu prac przeglądowych oraz katalogach Molecular Probes.<sup>124-128</sup> Z tego względu poniżej zostaną omówione tylko wybrane przykłady.

#### 1.3.2.2.1. Związki stosowane do kowalencyjnego znakowania makrocząsteczek

Znaczniki fluorescencyjne mogą zostać podzielone na kowalencyjne oraz niekowalencyjne. Pierwsza grupa posiada reaktywną grupę, która może reagować z grupami funkcyjnymi makrocząsteczek (aminowa, sulfhydrylowa) tworząc wiązanie kowalencyjne. Przykładowe związki stosowane do takiego znakowania przedstawiono na **Rys 1.13**. Jednym z pierwszych znaczników tego rodzaju był chlorek dansylu (DNS-Cl) zastosowany po raz pierwszy na początku lat 50'.<sup>129</sup> Jest on nadal stosowany do znakowania białek, kwasów nukleinowych oraz związków małowcząsteczkowych. Jedną z zalet tego znacznika jest długi czas życia ( $\sim 10^{-8}$  s), ponadto jest on wzbudzany przy długościach fali 350 nm gdzie nie absorbują białka ani kwasy nukleinowe.<sup>113</sup>



**Rys 1.13.** Wybrane znaczniki kowalencyjne stosowane w badaniach biomolekuł.

Innymi powszechnie stosowanymi znacznikami są pochodne fluoresceiny oraz rodaminy (**Rys. 1.13**). Mają one także dogodne pasmo zarówno absorpcji (odpowiednio 480 nm i 600 nm) jak i emisji (510 nm i 615 nm) oraz bardzo wysoki molarny współczynnik ekstynkcji ( $\sim 80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). W porównaniu do chlorku dansylu nie są wrażliwe na polarność rozpuszczalnika co może być zaletą w określonych zastosowaniach. Z uwagi na silny sygnał fluorescencyjny jednym z częstych komercyjnych zastosowań fluoresceiny oraz rodaminy jest znakowanie przeciwciał stosowanych w immunocytochemii oraz mikroskopii fluorescencyjnej. Obecnie dostępnych jest bardzo wiele modyfikacji i aktywnych pochodnych wliczając w to jodoacetamidy, izotiocyjaniiny, maleimidy, chlorki sulfonylowe oraz azydki.<sup>130, 131</sup> Pomimo niewątpliwych zalet opisane znaczniki posiadają także pewne wady. Jedną z nich jest tendencja do samowygaszania, przeprowadzone badania nad białkami znakowanymi tymi związkami wskazały, że jasność fluorescencji nie wzrasta liniowo z przyrostem ilości znaczników na cząsteczkę.<sup>128</sup> Fluoresceina posiada nieduże przesunięcie Stokesa i możliwy jest rezonansowy transfer energii pomiędzy dwoma znacznikami przyłączonymi do jednej cząsteczki białka. Innym problemem jest stosunkowo niska fotostabilność fluoresceiny.<sup>113</sup>

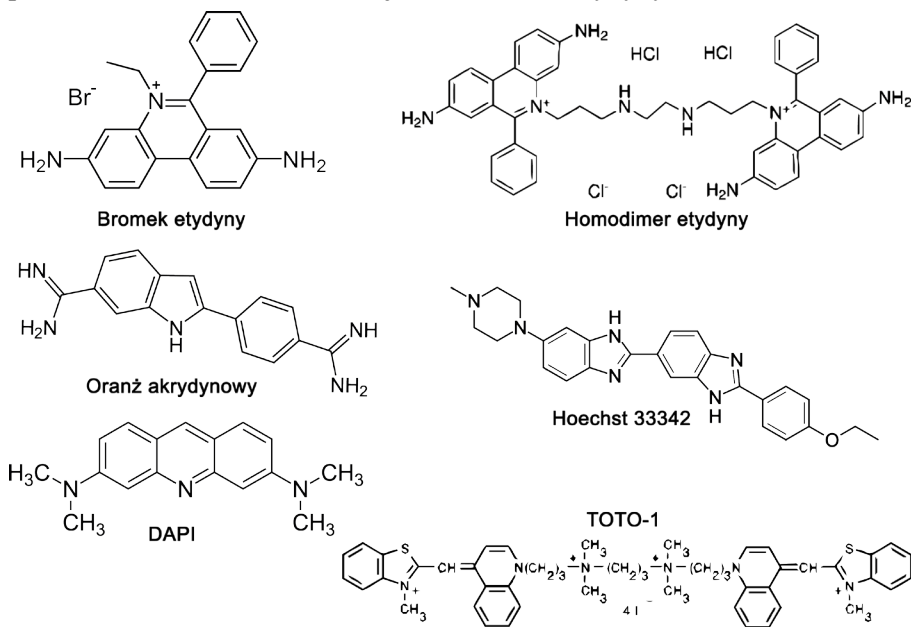
Inną rodziną znaczników fluorescencyjnych są, oparte na nietypowym fluoroforze zawierającym atom boru, barwniki BODIPY. W zależności od wprowadzonych modyfikacji strukturalnych możliwe jest osiągnięcie szerokiego zakresu emisji (od 510 nm do 675 nm). Do niewątpliwych zalet tych znaczników należy wąskie pasmo

emisji, odporność na zmiany polarności i pH oraz wysokie wartości molarnego współczynnika ekstynkcji ( $\sim 80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>113</sup>

Obecnie coraz większe znaczenie odgrywiają znaczniki emitujące w zakresie czerwieni oraz bliskiej podczerwieni (NIR). Posiadają one szereg zalet i) Długa fala wzbudzenia pozwala na redukcję szumu tła pochodzącego od autofluorescencji materiału biologicznego, co ma szczególne znaczenie w przypadku mikroskopii fluorescencyjnej. ii) Związki te mogą być wzbudzone diodami laserowymi iii) Większość znaczników tego rodzaju (takich jak cyjaniny) posiadają bardzo dobre właściwości spektralne oraz wąskie pasma emisji.<sup>113, 126</sup>

### 1.3.2.2.2. Znaczniki DNA i RNA

Kwasy nukleinowe nie wykazują naturalnej fluorescencji, stąd też potrzeba użycia zewnętrznych znaczników do ich wizualizacji. Poza opisanymi wcześniej kowalencyjnie przyłączanymi znacznikami w badaniach kwasów nukleinowych wykorzystuje się szereg związków oddziałujących niekowalencyjnie (**Rys. 1.14**). Wiele z nich wykazuje wzmocnienie emisji po związaniu się z DNA. Jednym z przykładów jest bromek etydyny, który jest słabo fluorescencyjny w roztworze wodnym ale po przyłączeniu do dwuniciowego DNA (dsDNA) jego siła emisji zwiększa się około 30-krotnie.<sup>113</sup> Wiele z tych związków (bromek etydyny, oranż akrydynowy) to interkalatory wnikające pomiędzy pary zasad w dsDNA,<sup>132</sup> inne przyłączają się do mniejszego rowka w DNA (DAPI, Hoechst 33342).<sup>133, 134</sup> Ponadto na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat wprowadzono szereg nowych znaczników o dużym powinowactwie do DNA takich jak homodimer etydyny<sup>135</sup> lub TOTO-1.<sup>136</sup>



**Rys. 1.14.** Barwniki i znaczniki fluorescencyjne stosowane w badaniach nad DNA.

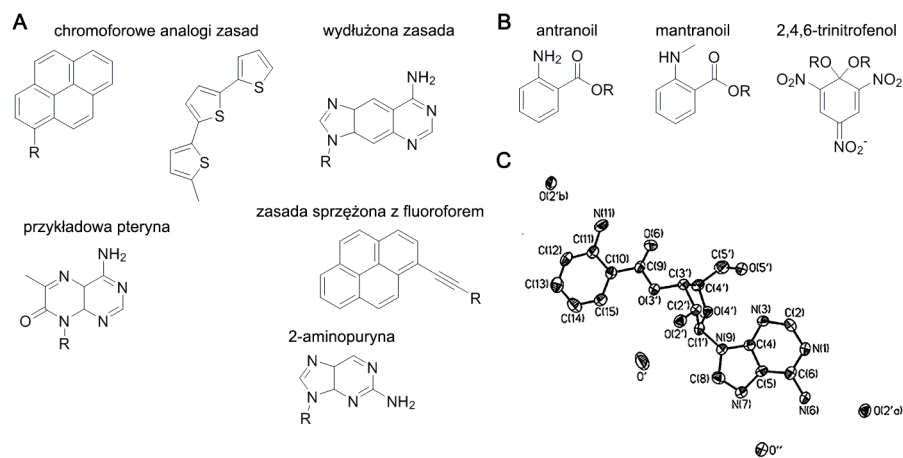
### 1.3.2.2.3. Fluorescencyjne analogi nukleozydów i nukleotydów

Poza zastosowaniem klasycznych fluoroforów, które zwykle wprowadzają dużą zawadę steryczną podejmuje się wiele badań nad opracowaniem fluorescencyjnych bloków budulcowych do syntezy kwasów nukleinowych, których właściwości fizykochemiczne będą zmienione jedynie w niewielkim stopniu. Najwięcej badań podjęto nad modyfikacjami zasad azotowych ponieważ ten fragment struktury może, kosztem minimalnych zmian strukturalnych i elektronowych, uzyskać zdolność do fluorescencji (**Rys. 1.15A**). Jednym z prostych przykładów może być wprowadzenie węglowodoru poliaromatycznego.<sup>137</sup> Pomimo, że akurat taka modyfikacja w istotny sposób zaburza strukturę kwasu nukleinowego (brak wiązań Watsona-Cricka) to dzięki tej właściwości może ona dobrze symulować miejsca pozbawione zasady (ang. *abasic site*) lub być wykorzystana do badań transferu elektronów w DNA.<sup>138</sup>

Naturalnie występujące związki heterocykliczne takie jak pterydyny także znajdują zastosowanie w otrzymywaniu fluorescencyjnych bloków budulcowych. Wspomniane związki charakteryzują się intensywną fluorescencją oraz

długim czasem wzbudzenia a z uwagi na podobieństwo strukturalne do naturalnych zasad ich inkorporacja do DNA ma nieduży wpływ na jego właściwości fizykochemiczne.<sup>127-139</sup> Stosunkowo dużo uwagi poświęcono na otrzymywanie związków posiadających zasady azotowe wydłużone o jeden pierścień aromatyczny. Przykładem takiej zasady może być eteno-A ( $\epsilon$ A), uzyskane w latach 70<sup>tych</sup>, i posiadające zadowalające właściwości spektralne w paśmie światła widzialnego.  $\epsilon$ ATP jest rozpoznawane przez enzymy wiążące ATP i może stanowić funkcjonalny odpowiednik adenozy. <sup>140</sup> W późniejszych czasach opracowano podobne odpowiedniki innych zasad azotowych występujących w kwasach nukleinowych.<sup>127</sup> Innymi modyfikacjami zasad azotowych jest dołączenie do nich (zazwyczaj za pomocą sztywnego łącznika) niedużego fluorofora. Jeżeli zasada przyłączona jest do fluorofora za pomocą łącznika ze sprzężonym układem wiązań podwójnych to zwykle prowadzi to do powstania nowego fluorofora o unikatowych właściwościach spektralnych. Jednym z przykładów może być przyłączenie pirenu za pomocą łącznika etynylowego w pozycję 5 dU.<sup>141</sup> Taka modyfikacja znalazła wiele zastosowań w badaniach biofizycznych kwasów nukleinowych.<sup>142</sup> Innym przykładem jest wprowadzanie do zasady sprzężonych reszt bipyridyny lub fenantroliny.<sup>143</sup> Modyfikacjami fluorescencyjnymi najbardziej przypominającymi naturalne zasady są tzw. zasady izomorficzne. Posiadają one zbliżony rozmiar, układ wiązań wodorowych, zdolność do parowania w dupleksach kwasów nukleinowych oraz właściwości biologiczne. Do tej pory zaproponowano szereg izomorficznych analogów każdej z naturalnie występujących zasad azotowych. Jednymi z najwcześniej wprowadzonych były 2-aminopuryna (2-AP) będąca analogiem adeniny oraz izoksantopteryna (IXP) będąca analogiem guanozyny. Fluorescencja 2-AP wykazuje znaczną zależność od lokalnego środowiska co czyni ten związek użyteczną sondą do badań nad dynamiką konformacyjną DNA.<sup>127</sup> Niektóre z izomorficznych zasad posłużyły także do opracowania sztucznych par zasad azotowych wykazujących inny sposób parowania niż klasycznie występujące w naturze pary A-T i G-C.<sup>127, 144</sup>

Innymi często stosowanymi znacznikami fluorescencyjnymi są nieduże (pojedynczy pierścień aromatyczny) znaczniki fluorescencyjne takie jak grupa antranoilowa (Ant), N-metyloantranoilowa (mantranoilowa, Mant) oraz trinitrofenylowa (TNP). Zaletami tych fluoroforów jest nieduży rozmiar, dzięki czemu ich właściwości biologiczne takie jak powinowactwo do białek wiążących nukleotydy ulegają tylko nieznacznej zmianie (**Rys. 1.15B**). Ponadto grupy takie są łatwe do wprowadzenia, zwykle znakowane są grupy hydroksylowe w pierścieniu rybozy a sam proces znakowania przebiega jednoetapowo.<sup>145, 146</sup> Więcej informacji o nukleotydach znakowanych grupami Ant i Mant znajduje się w rozdziale 1.3.2.3 *Nukleotydy znakowane grupą antranoilową i mantranoilową*.



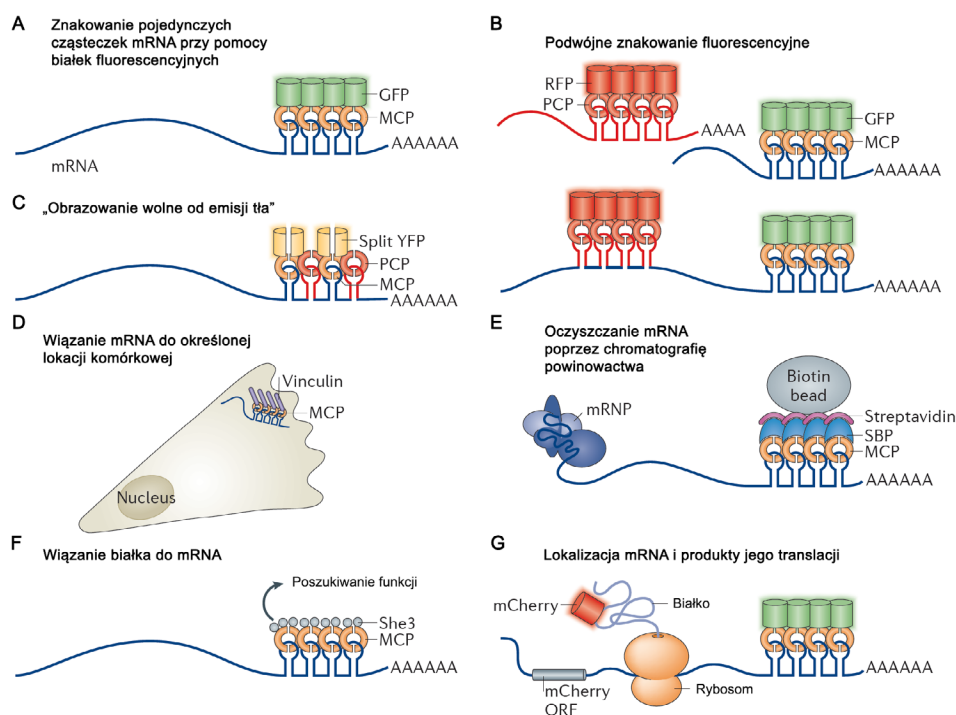
**Rys. 1.15.** Fluorescencyjne analogi nukleotydów oraz nukleozydów. **(A)** Struktura wybranych modyfikacji zasady azotowej zapewniających fluorescencję. **(B)** Struktury wybranych fluoroforów przyłączanych do pierścienia rybozy w nukleozydach i nukleotydach. **(C)** Struktura krystalograficzna adenozy znakowanej grupą antranoilową. Częściowo zaczerpnięto z *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 948-954.

Istnieje kilka metod inkorporacji modyfikowanych nukleozydów i nukleotydów do kwasów nukleinowych, takie jak różne warianty syntezy na podłożu stałym, enzymatyczne przyłączanie oraz modyfikacje postsyntetyczne. Największą popularnością cieszy się synteza modyfikowanych oligonukleotydów na podłożu stałym, do niedawna jedynym ograniczeniem był długość pojedynczego oligonukleotydu (< 200). Jednakże obecnie techniki syntezy oparte o ligację krótszych fragmentów pozwalają na uzyskiwanie fragmentów DNA o długości kilku tysięcy par zasad<sup>77, 127</sup>. Z drugiej strony metody enzymatyczne pozwalają na tanią syntezę długich fragmentów DNA oraz RNA, którego synteza metodami chemicznymi jest znacznie bardziej kłopotliwa. Przy użyciu obydwu strategii można uzyskać modyfikowane kwasy nukleinowe, które mogą być dalej modyfikowane postsyntetycznie np. przy wykorzystaniu podejścia *click-chemistry* lub metod chemii bioortogonalnej.<sup>147-149</sup>

### 1.3.2.2.4. Metody fluorescencyjnego obrazowania RNA w komórkach

Badania nad przestrzenną i czasową dynamiką rozmieszczenia mRNA w komórce (ang. *mRNA localization*) mają duże znaczenie w zrozumieniu ekspresji informacji genetycznej i procesach takich jak różnicowanie i rozwój komórek oraz ich komunikacja. Stąd też od ostatnich kilkunastu lat kładzie się duży nacisk na opracowanie technik wizualizacji mRNA w komórkach oraz całych organizmach.<sup>150, 151</sup> Pierwsze badania nad tymi metodami pozwoliły na wizualizację poszczególnych cząsteczek mRNA w układach takich jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*<sup>152</sup> lub neurony.<sup>153</sup>

Do osiągnięcia tych rezultatów często wykorzystuje się techniki oparte na fluorescencji. Jedną z pierwszych była fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*, FISH) wykorzystujące krótkie znakowane fluorescencyjnie oligonukleotydy komplementarne do określonych sekwencji DNA lub RNA.<sup>3</sup> Bardziej zaawansowana metoda smFISH (ang. *single molecule FISH*) pozwala na detekcję poszczególnych cząsteczek mRNA, nawet bez potrzeby użycia zaawansowanych instrumentów optycznych,<sup>154, 155</sup> co więcej usprawnienia tej metody pozwalają na obserwację ponad 100 różnych rodzajów mRNA w tym samym czasie.<sup>156</sup>



**Rys. 1.16.** Znakowanie cząsteczek mRNA *in vivo* z wykorzystaniem systemów opartych o MS2. (A) Lokalizacja pojedynczych cząsteczek z użyciem białek fluorescencyjnych. Wykorzystywana jest fuzyja białka wiążącego się do pętli RNA z białkiem fluorescencyjnym. (B) W podwójnym znakowaniu dwa różne mRNA lub dwa fragmenty jednego mRNA są znakowane przy pomocy różnych systemów MS2. (C) W celu redukcji tła fluorescencyjnego wykorzystuje się dwie różne sekwencje pętli RNA wiążące inne białka połączone z fragmentami wybranego białka fluorescencyjnego. Jedynie gdy obydwa białka przyłączą się do mRNA nastąpi utworzenie funkcjonalnego białka fluorescencyjnego. (D) wiązanie mRNA do określonej lokalizacji komórkowej za pomocą fuzji białka MCP do białka charakterystycznego dla danej struktury w komórce. (E) Wykorzystanie systemu MS2 do izolacji kompleksów mRNA i białek. (F) Specyficzne białko może zostać dołączone do mRNA, co pozwala na badanie jego wpływu na badane mRNA lub jego kompleks z innymi białkami. (G) Badanie jednoczesnej lokalizacji mRNA oraz produktu jego translacji z użyciem dwóch różnych białek fluorescencyjnych. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2014.

Dużym postępowaniem w obrazowaniu mRNA było opracowanie systemu bezpośredniego znakowania fluorescencyjnego z użyciem wirusowego systemu MS2, w którym białko osłonowe bakteriofaga MS2 (MCP) wiąże się do unikatowej sekwencji w RNA (MBS), która może zostać wprowadzona do wybranego mRNA (Rys. 1.16). Powielenie tej sekwencji oraz wykorzystanie fuzji MCP z białkiem fluorescencyjnym pozwala na czasowo-rozdzielcze pomiary lokalizacji wybranego mRNA w komórkach lub *in vivo*.<sup>151, 157</sup> Alternatywne rozwiązania polegają na wykorzystaniu

egzogennych znaczników wprowadzanych do RNA. Zaletą jest to, że takie znaczniki mogą dawać silniejszy sygnał niż białka i mają większą fotostabilność, natomiast dużym ograniczeniem jest konieczność wprowadzania takich związków do komórek co może mieć negatywny wpływ na ich funkcjonowanie oraz przyczynić się do większej fluorescencji tła.<sup>158, 159</sup>

Dogodną techniką pomiarową do takich obserwacji jest korelacyjna spektroskopia fluorescencyjna i jej warianty pozwalające na wyznaczenie parametrów fizykochemicznych (współczynnik dyfuzji, stężenie lokalne etc.) znakowanych mRNA co wnosi dodatkowe informacje na temat ich dynamiki.<sup>160</sup>

Dużym ułatwieniem w badaniach nad lokalizacją mRNA jest wykorzystanie organizmów transgenicznych, co pozwala na lepszy wgląd w rzeczywisty metabolizm mRNA. Pierwotnie systemy znakowania endogenicznego mRNA opracowano w drożdżach, będących łatwym obiektem dla manipulacji genetycznych.<sup>151</sup> Następnie wprowadzono je do bardziej złożonych układów takich jak oocyty<sup>161</sup>, embriony<sup>162</sup> oraz całe zwierzęta.<sup>163</sup> Znaczne zasługi w rozwoju tych technik ma system CRISPR-Cas9 pozwalający na łatwe edytowanie dużych genomów eukariotycznych.<sup>164</sup>

### 1.3.2.3. Nukleotydy znakowane grupą antranoilową i mantranoilową

#### 1.3.2.3.1. Wprowadzanie znacznika

Prosta metoda wprowadzania grupy antranoilowej i jej pochodnych do pierścienia cukrowego w nukleotydach została opracowana w latach 80' i charakteryzuje się zadowalającą wydajnością (25-60%). Polega ona na reakcji mieszanego bezwodnika kwasu antranoilowego z grupą 2' (lub 3') OH w pierścieniu rybozy w środowisku wodnym i zasadowym (pH 9,5).<sup>165, 166</sup> Do czasów obecnych technika ta stosowana jest bez większych modyfikacji. W przypadku związków posiadających dwie grupy hydroksylowe w pierścieniu reakcja nie jest regioselektywna i obydwie pozycje ulegają podstawieniu. Regioizomer 3' jest bardziej stabilny termodynamicznie i dominuje w roztworze. Natomiast z uwagi na to, że regioizomery 2' i 3' pozostają w równowadze dynamicznej to nie jest możliwe ich rozdzielenie preparatywnie i uzyskanie czystych izomerów.

Przykładowo wprowadzanie grupy Ant do cząsteczki adenozynej prowadzi do powstania regioizomeru 3' w znacznej przewadze (~70%), który może zostać wyizolowany na drodze krystalizacji. W roztworze, podobnie jak w przypadku nukleotydowych pochodnych (M)Ant związek ten ulega konwersji do równowagowej mieszaniny obydwu regioizomerów.<sup>167</sup>

#### 1.3.2.3.1. Struktura i właściwości

Wiele informacji na temat struktury nukleotydów znakowanych grupą Ant zawdzięcza się badaniom strukturalnym nad 3'-*O*-antranoiloadenozynie (Ant(3')-Ade). Ant(3')-Ade krystalizuje jako dihydrat tworząc szereg wiązań wodorowych zarówno z cząsteczkami rozpuszczalnika jak i intramolekularnych (**Rys. 1.15C**). Pierścień cukrowy występuje w konformacji 2'-*endo* natomiast konformacja w obrębie węgli C4'-C5' została ustalona jako *gauche-gauche*. Zasada azotowa w Ant(3')-Ade występuje w konformacji *syn*, która jest stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie wodorowe pomiędzy H5' a N3. Ponadto zaobserwowano silne wiązania warstwowe pomiędzy pierścieniem benzenowym a adenozynej sąsiedniej cząsteczki.<sup>167</sup>

Pomiary NMR pokazały, że nukleotydy i nukleozydy znakowane grupą M(Ant) występują jako mieszanina regioizomerów 2'(M)Ant oraz 3'(M)Ant a drugi z nich występuje w przewadze. Dla szeregu pochodnych 3' aminoadenozyny wykazano że stosunek izomerów 2' i 3' w zależności od wartości pH i temperatury waha się w zakresie 0,36-0,47<sup>168</sup>, podobne rezultaty uzyskano dla 3'Ant(3')-Ade. Dominująca konformacja pierścienia cukrowego dla tego związku w roztworze to 2'-*endo* (78% dla regioizomeru 2' i 90% dla regioizomeru 3'). Wprowadzenie grupy fosforanowej w pozycję 5' ma znikomy wpływ na równowagę regioizomerów oraz konformację pierścienia rybozy.<sup>167</sup> Prowadzono także badania nad kinetyką szybkości transacetylacji pomiędzy regioizomerami. Wykazano, że stała szybkości tej reakcji jest znacznie niższa niż dla takiej samej reakcji 2'(3')-*O*-fenyloalanyloadenozyny.<sup>167, 168</sup>

Badania spektroskopowe pozwoliły także na poznanie termodynamiki pseudorotacji 2(3')-antranoiloadenozyny oraz czynników stereoelektronowych wpływających na konformację tego związku. Wykazano m.in., że udział konformery S (2'-endo) maleje ze wzrostem temperatury, zidentyfikowano efekty *gauche* wpływające na strukturę pierścienia cukrowego oraz zaobserwowano korelację pomiędzy ułamkiem molowym izomerów 2' i 3' a równowagą konformacyjną rybozy w funkcji temperatury.<sup>169</sup>

### 1.3.2.3.2. Zastosowania w badaniach biochemicznych i biofizycznych

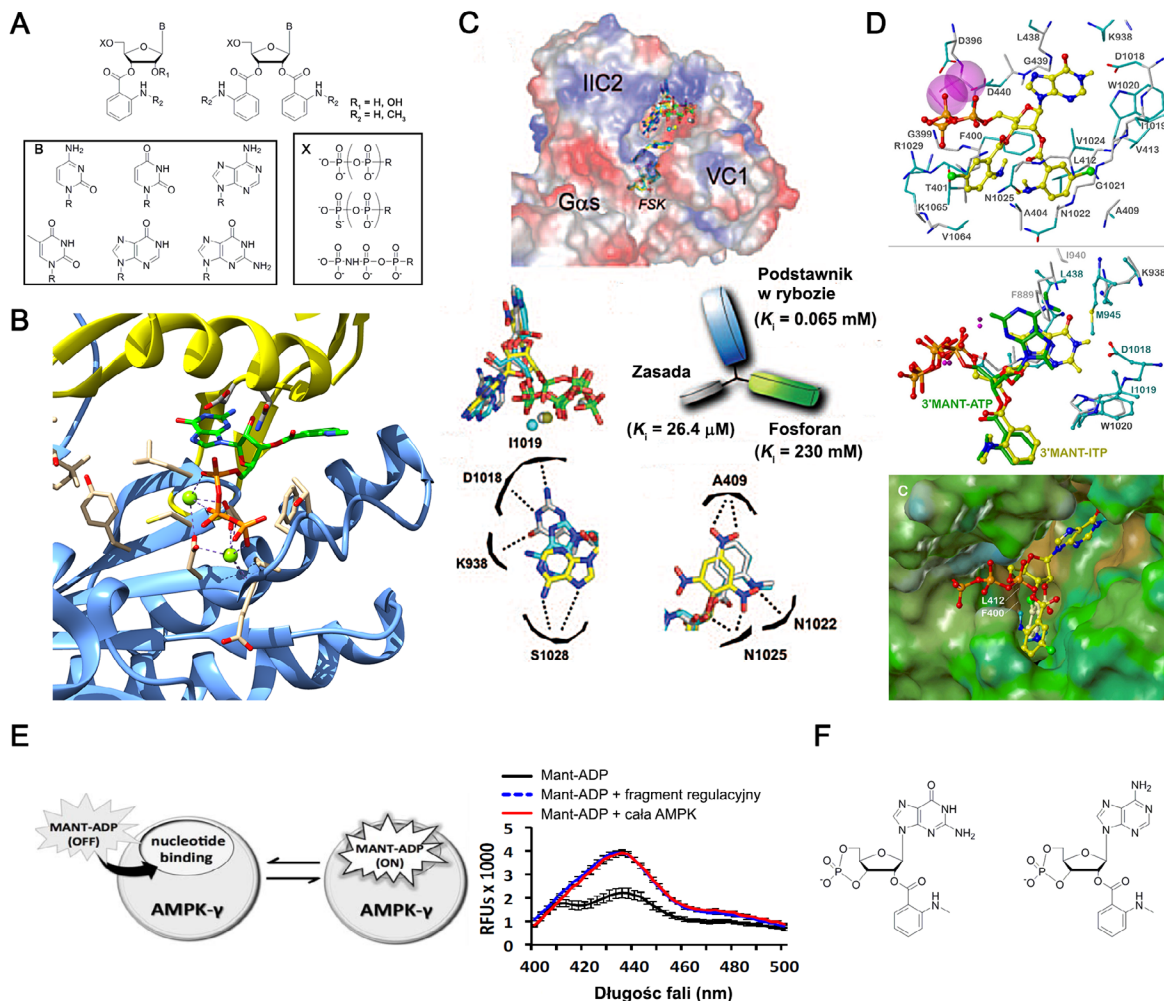
Grupy antranilowa i mantranilowa znalazły dość szerokie zastosowanie w znakowaniu nukleotydów. Tak zmodyfikowane związki są wykorzystywane w badaniach biologicznych i biofizycznych nad szeregiem białek wiążących nukleotydy (**Rys. 1.17**). Jednym z pierwszych opisanych zastosowań było badanie wiązania się Ant-ATP do zależnej od kalmoduliny cyklazy adenylowej. Związek ten wiązał się specyficznym z centrum katalitycznym (inhibicja współzawodnicząca) a siła oddziaływania była większa pod obecność kalmoduliny.<sup>170</sup> Pozytywne wyniki badań zachęciły do dalszego wykorzystania nukleotydów znakowanych grupami Mant i Ant w badaniach białek.

Jednym z ciekawych zastosowań były badania strukturalne oraz spektroskopowe nad fragmentami miozyny pochodzącymi z różnych organizmów (królik, *Dictiostellum* sp.) z wykorzystaniem analogów ADP oraz ATP. Uzyskane wyniki przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmu wiązania nukleotydów przez miozynę oraz różnice w sposobie ich wiązania pomiędzy ortologami miozyny.<sup>171-173</sup> W innym badaniu Ant-dADP posłużył do pomiarów mechanizmu wiązania ATP przez bakteryjną kinazę CMP za pomocą czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej.<sup>174</sup> Fluorescencyjny transfer energii pomiędzy grupą Mant a tyrozyną znalazł zastosowanie do wyznaczania stałych wiązania nukleotydów do białek wiążących ATP.<sup>175</sup> Niedawno zaproponowano też metodę wysokoprzepustową do poszukiwania inhibitorów zależnej od AMP kinazy białkowej, która opiera się na wykorzystaniu Mant-ADP (**Rys. 1.17E**). W technice tej potencjalne inhibitory tego białka wypierają Mant-ADP z miejsca wiążącego, co może być łatwo monitorowane fluorescencyjnie.<sup>176</sup>

Nukleotydy znakowane (M)Ant zastosowano w badaniach nad białkami zaangażowanymi w metabolizm cyklicznych 3'-5' fosforanów nukleotydów (cNMP). Białka te odgrywają duże znaczenie w ścieżkach przekazywania sygnału w komórce, dlatego też poświęcono dużo wysiłku nad opracowaniem narzędzi badawczych (takich jak znakowane nukleotydy) przydatnych w pracy nad nimi.<sup>1</sup> W celu badań białek zaangażowanych w hydrolizę tych związków opracowano szereg pochodnych (M)Ant-cNMP (**Rys. 1.17F**). Wykazano, że takie związki mogą być substratami wspomnianych enzymów oraz zaproponowano metody ich badań przy użyciu prostych pomiarów fluorescencji.<sup>177</sup> Przykładowo 2'-O-antranoil-cGMP użyto do badania fosfordiesterazy rozkładającej cGMP (PDE5). Wykazano, że cGMP jest samo w sobie allosterycznym regulatorem PDE5 i ten mechanizm regulacji może mieć znaczenie fizjologiczne dla funkcjonowania komórek nerwowych.<sup>178, 179</sup>

Inną grupą białek związanych z cNMP są cyklazy adenylowe (CA), syntetyzujące cAMP, ważny przekaźnik sygnału w komórkach eukariotycznych. Ponadto wiele białek o takiej aktywności to egzotoksyny bakteryjne odpowiedzialne za objawy schorzeń takich jak wąglik czy krztusiec. Analogi nukleotydów znakowane (M)Ant wykorzystano do badań strukturalnych oraz biochemicznych nad tymi enzymami.<sup>180</sup> W ich wyniku odkryto, że szereg modyfikowanych chemicznie nukleotydów znakowanych tymi grupami, takich jak Mant-GppNHp lub Mant-Gppp<sub>s</sub> stanowi silne inhibitory współzawodniczące ssaczycy cyklazy adenylowej (mCA). Związki te wykazują też słabe powinowactwo do niektórych izoform białek G jednak wykazano, że efekt inhibitorowy na CA nie jest związany z tworzeniem kompleksów z białkami G aktywującymi mCA.<sup>181</sup> Dalsze badania CA oraz rozpuszczalnymi formami cyklazy guanylowej (sGC) pokazały, że enzymy te wiążą w inny sposób nukleotydy purynowe i pirymidynowe w związku z czym możliwe jest uzyskanie selektywnych inhibitorów tych białek opartych o struktury Ant-NTP. Przykładowo Mant-Ippp<sub>s</sub> stanowi silny inhibitor CA podczas gdy efekt inhibitorowy względem sGC jest nieznaczący.<sup>182</sup> Poznanie struktur krystalicznych kompleksów domeny wiążącej nukleotydy CA związanej z białkiem G oraz Mant-GTP pomogło w zrozumieniu mechanizmu wiązania inhibitorów. Są one związane w bardzo podobny sposób jak substraty jednakże pierścień aromatyczny grupy Mant wnika w kieszeń hydrofobową pomiędzy dwoma domenami mCA blokując przejście z konformacji otwartej do zamkniętej.<sup>183</sup> Prowadzono także dalsze badania krystalograficzne z użyciem innych pochodnych NTP z podstawnikiem

aromatycznym w pozycjach 2' i 3', dzięki czemu zidentyfikowano farmakofory występujące w tych związkach i podjęto poszukiwania dalszych inhibitorów.<sup>184</sup> Skrupulatne badania wpływu struktury na aktywność nukleotydów znakowanych Mant pokazały, że możliwe jest uzyskanie związków wykazujących aktywność przynajmniej w pewien sposób selektywnych względem określonych izoform CA, natomiast lepsze poznanie mechanizmów wiązania może być pomocne w opracowaniu nie-nukleotydowych inhibitorów tych enzymów.<sup>185</sup> W podobny sposób zidentyfikowano potencjalne inhibitory sGC, które mogą być pomocne w badaniach enzymatycznych i strukturalnych nad tymi białkami.<sup>186</sup>



**Rys. 1.17.** Nukleotydy znakowane grupami (M)Ant i ich wybrane zastosowania w badaniach biochemicznych (A) Struktura wybranych inhibitorów cyklaz adenylovych opartych na pochodnych (M)Ant nukleotydów. (B) Struktura krystalograficzna kompleksu mAC z Mant-GTP. Grupa Mant wnika pomiędzy dwie podjednostki enzymu blokując przejście do katalitycznie aktywnej konformacji. (C) Ogólny model inhibicji mAC. Widok na kompleks inhibitora z nukleotydem (góra) oraz nałożone na siebie konformacje wybranych inhibitorów występujące po związaniu z białkiem. Schemat farmakofora z wyróżnionym podstawnikiem w rybozie, zasadą oraz fosforanem oraz obliczonymi częściowymi udziałami poszczególnych grup wyznaczonymi na podstawie analizy SVD danych biochemicznych (dół). Schemat kieszeni hydrofobowych wiążących różne inhibitory mAC (pochodne Mant oraz TNP). (D) Model wiązania się podwójnie podstawionych analogów Mant-NTP do mAC. Sugerowany sposób wiązania się bis-Br-Ant-ITP (góra), porównanie wiązania się 3'-Mant-ITP (żółty) oraz 3'-Mant-ATP (zielony) w oparciu o struktury krystalograficzne (środek). Model komputerowy wiązania się bis-Br-Ant-ITP, zaznaczono powierzchnię białka (dół). (E) Schemat metody poszukiwania inhibitorów AMPK z użyciem Mant-ADP wiążącego się z białkiem. Fluorescencja sondy zwiększa się po związaniu z białkiem. Dodatek inhibitora o większym powinowactwie wypiera sondę i fluorescencja ulega osłabieniu. (F) Struktura znakowanych fluorescencyjnie pochodnych cyklicznym NMP stosowanych w badaniach nad metabolizmem tych związków. Na podstawie ref. 176, 183, 187, 188.

W przypadku bakteryjnych cyklaz adenylovych takich jak egzotoksyna z *Bordetella pertussis* pomiary z wykorzystaniem szeregu 2',3' znakowanych nukleotydów pokazały, że w ich przypadku mechanizm wiązania nukleotydu jest odmienny niż w przypadku białek ssaczych. Odkryto, że miejsce wiążące jest konformacyjnie

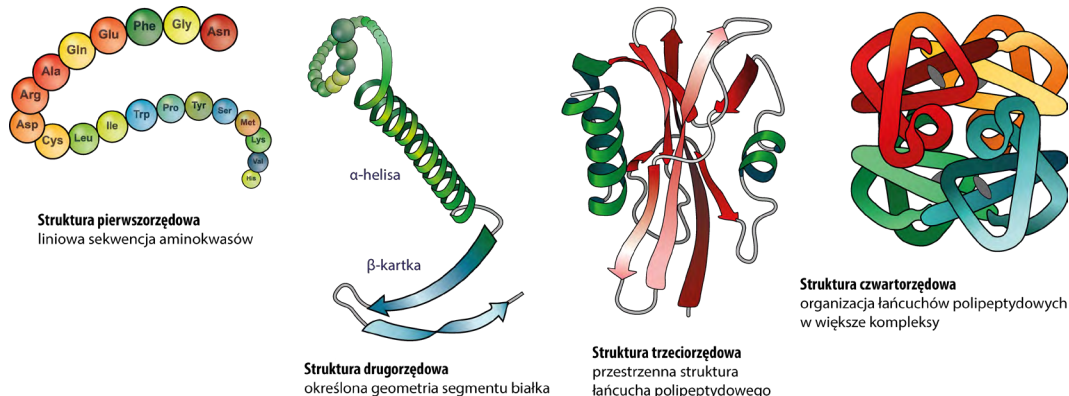
giętkie przez co nawet podwójnie podstawione nukleotydy są wiązane przez białko.<sup>187</sup> Dalsze badania wykazały, że właśnie podwójnie podstawione nukleotydy posiadające grupy Mant w pozycji 2' i 3' są efektywnymi inhibitorami toksyn białkowych. Ponieważ takie związki nie wykazują znaczących interakcji z sCA to mogą być wykorzystane jako potencjalne leki antybakteryjne niezaburzające działania komórkowych szlaków sygnałowych.<sup>188</sup> Innym ciekawym odkryciem było to, że analogi CTP, takie jak Mant-CTP są specyficznymi i silnymi inhibitorami toksyny z *Bacillus anthracis*, będącej zależną od kalmoduliny cyklazą adenylową.<sup>189, 190</sup> Innym bakteryjnym białkiem w którego badaniach wykorzystano nukleotydy pochodne Ant jest kinaza UMP z bakterii *Bacillus subtilis*.<sup>191</sup> Stosunkowo niedawno odkryto, że cykliczny di-GMP, rozpowszechniona bakteryjna cząsteczka sygnałowa ma kluczowe znaczenie dla wielu procesów metabolicznych.<sup>192</sup> W związku z tym opracowano także fluorescencyjny analog c-diGMP znakowany Mant. Autorzy pracy wykazali, że taki związek jest inhibitorem cyklazy diguanylowej oraz może być wykorzystany w badaniach biofizycznych nad białkami wiążącymi c-di-GMP.<sup>193</sup>

## 1.4. Dynamika białek i wiązanie ligandów

Ponieważ znaczna część badań prowadzonych podczas realizacji projektu doktoranckiego związana jest z oddziaływaniami białko-ligand oraz poszukiwaniami inhibitorów enzymów to rozdział ten zawiera podstawowe informacje na temat właściwości białek. Białko Dcp2 będące przedmiotem większości z tych badań charakteryzuje się dużą dynamiką konformacyjną. Dlatego też duży nacisk położono na opis dynamicznego zachowania się białek oraz metody badania ich dynamiki. Na początku rozdziału przedstawiono kluczowe wiadomości na temat budowy, fałdowania i dynamiki białek oraz opisano termodynamikę wiązania ligandów i zjawisko allosterii. W dalszej części przedstawiono procesy katalizy enzymatycznej ze szczególnym uwzględnieniem roli zmian konformacyjnych. Na końcu podano informacje na temat kinetyki reakcji enzymatycznych oraz zjawiska inhibicji.

### 1.4.1. Struktura białek

Pionierskie badania nad krystalizacją białek globularnych przeprowadzone ponad 50 lat temu ustanowiły fundamenty biologii strukturalnej zmieniając na stałe sposób myślenia o budowie i funkcjonowaniu makrocząsteczek biologicznych<sup>194, 195</sup>. Od tego czasu wiedza na temat struktury białek uległa znacznemu powiększeniu. Ustalono, że ze względu na budowę większość białek można zgrubnie zaklasyfikować jako białka globularne, błonowe (zakotwiczone w błonach biologicznych) oraz strukturalne. Ponadto w znacznej większości białka posiadają w roztworze stabilną strukturę<sup>1</sup> (wyjątkiem są białka natywnie nieustrukturyzowane, stanowiące w przypadku organizmów eukariotycznych do 33% wszystkich białek globularnych<sup>196</sup>) konieczną do pełnienia funkcji fizjologicznych. Cząsteczki białka są silnie solwatowane, ponieważ obecność cząsteczek wody jest konieczna dla zachowania struktury a stopień upakowania atomów w samej cząsteczce jest na tyle wysoki, że białka są uznawane za „kryształy molekularne”. W ogólności białka posiadają kilka stopni hierarchii strukturalnej (**Rys. 1.18**), jednak do tej pory najwięcej wiedzy zgromadzono na temat białek globularnych<sup>1</sup>, którym zostanie poświęcone większość uwagi.



**Rys. 1.18.** Poziomy organizacji przestrzennej białek. Zaczerpnięte i zmodyfikowane z WikiCommons.



## 1.4.2. Dynamika konformacyjna białek

### 1.4.2.1. Przyjmowanie struktur przestrzennych przez białka

Procesy przyjmowania przez białko natywnej struktury, nazywane fałdowaniem się (ang. *folding*) są bardzo skomplikowane i jeszcze nie do końca poznane. W ogólności można postawić kilka podstawowych pytań. i) W jaki sposób trójwymiarowa struktura białka jest zdeterminowana przez sekwencję aminokwasów? ii) W jaki sposób białka osiągają stabilną strukturę w krótkich, z punktu widzenia biologii skalach czasowych biorąc pod uwagę, że nawet mały polipeptyd może przyjąć ogromną ilość konformacji<sup>197</sup> ( $>10^{142}$  dla 150 aminokwasowego polipeptydu)? iii) Czy możliwe jest stworzenie algorytmu przewidującego natywną strukturę białka na podstawie samej sekwencji aminokwasowej? W dalszej części dwa pierwsze pytania zostaną poglądowo przedstawione.

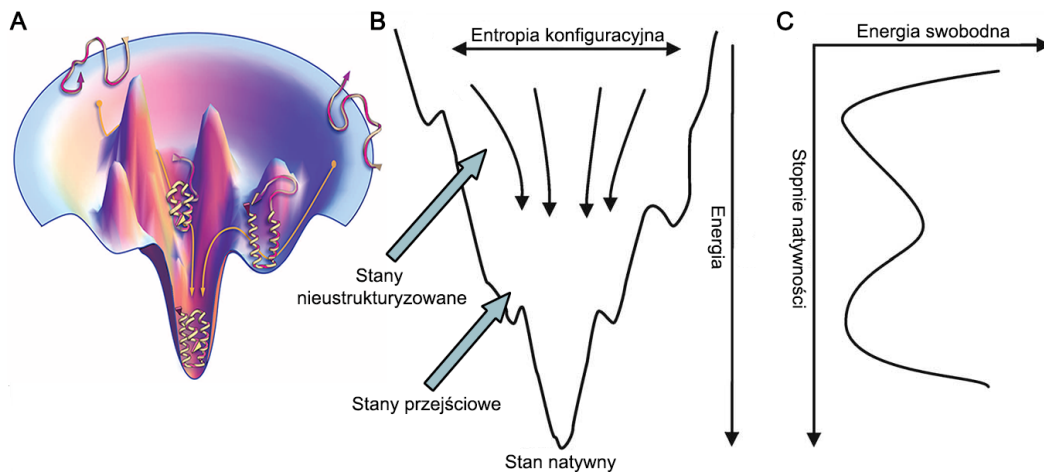
Długoletnie badania strukturalne zaowocowały zgromadzeniem ponad  $10^4$  struktur przestrzennych makrocząsteczek zdeponowanych w bazie PDB (ang. *Protein Data Bank*). Ich analiza pozwoliła na wyłonienie następujących czynników stabilizujących strukturę: i) Wiązania wodorowe – cząsteczki białek są zbudowane głównie ze struktur 2-rzędowych, których geometrie są zdeterminowane przez układ wiązań wodorowych.<sup>198</sup> ii) Oddziaływania van der Waalsa – atomy we wnętrzu cząsteczki białka są ściśle upakowane przez co oddziaływania bliskiego rzędu mają znaczący wpływ na stabilizację struktury. iii) Preferencje kątów  $\phi$  i  $\psi$  we wiązaniu peptydowym – jedynie wąski przedział wartości tych kątów jest obserwowany w białkach, inne geometrie wiązania peptydowego prowadzą do powstania licznych naprężeń sterycznych. iv) Oddziaływania elektrostatyczne – niektóre reszty aminokwasowe wzajemnie się przyciągają lub odpychają ze względu na obecność ładunku elektrycznego. v) Efekt hydrofobowy – aminokwasy hydrofobowe eksponowane do roztworu wodnego zaburzają jego układ wiązań wodorowych a tendencja do redukcji takiego kontaktu prowadzi do ich ukrycia wewnątrz cząsteczki (efekt entropowy)<sup>199</sup>. vi) Entropia konformacyjna – czynnikiem przeciwnym do formowania się stabilnej struktury natywnej jest znaczący spadek entropii łańcucha polipeptydowego<sup>200</sup>.

W celu lepszego opisu fałdowania się białek wprowadzono termin „krajobrazu energetycznego” (ang. *energy landscape*), który jest statystycznym opisem powierzchni energii potencjalnej danego białka. Zakłada się, że fałdowanie zachodzi poprzez złożony układ ewoluujących w czasie i przechodzących w siebie struktur a nie przez kilka unikalnych intermediatów. Pozwala to na wygodny opis cząsteczek białka oraz ich dynamiki i przejść fazowych przy pomocy narzędzi mechaniki statystycznej.<sup>201</sup> Dzięki temu ustalono, że proces fałdowania zachodzi przez wiele następczych zmian konformacji napędzanych przypadkowymi ruchami termicznymi.<sup>202, 203</sup>

Badania nad entropią łańcuchów polimerowych wykazały istnienie mniejszej ilości konformacji dla struktur niskoenergetycznych przez co są one bardziej skłonne do dalszego zwijania się do struktury natywnej<sup>204, 205</sup>. Z tego powodu zaproponowano termin „lejka zwijania” (ang. *folding funnel*, patrz **Rys. 1.19**). Białko zmienia swoją strukturę w czasie obniżając swoją energię potencjalną „zapadając” się w lejek, który ostatecznie prowadzi do relatywnie małego zbioru podobnych do siebie konformacji składających się na natywną strukturę białka.<sup>206</sup>

W ramach prawidłowego zwijania się do struktury natywnej jej uśredniona energia będzie się stopniowo zmniejszać a krajobraz energetyczny białka będzie „lejkowaty” (ang. *funneled*).<sup>205, 207</sup> Taka architektura krajobrazu energetycznego ma dominujący wpływ na kinetykę zwijania i wynikają z niej następujące spostrzeżenia: i) proces zwijania jest trudny do zaburzenia przez mutację reszt aminokwasowych, dopóki tylko uda się zachować stabilność końcowej struktury ii) zwijanie wymaga istnienia szeregu zbiorów stanów przejściowych o wzrastającej stabilności na skutek tworzenia się interakcji obecnych w końcowej strukturze białka iii) w niektórych białkach występują „pułapki kinetyczne” prowadzące do uwięzienia białka w jednym z lokalnych minimów energetycznych co może blokować osiągnięcie termodynamicznego minimum globalnego. Pomimo presji ewolucyjnej działającej przeciwko takim układom są one z różnych przyczyn obserwowane w naturze.<sup>203, 208</sup>

Obecnie wiedza na temat biofizyki białek jest znacząco poszerzona a dyscyplina się dynamicznie rozwija. Jednakże nadal nie udało się opracować jednolitej teorii tłumaczącej mechanizm fałdowania się białek tak aby na podstawie jego sekwencji i warunków środowiskowych przewidzieć jaka struktura będzie dominować w roztworze.



**Rys. 1.19.** Krajobraz energetyczny fałdowania się białka. Trójwymiarowa (A) oraz dwuwymiarowa (B) reprezentacja graficzna lejka zwijania. Zbiór nieustrukturyzowanych konformacji zajmuje górę lejka. Gdy białko zaczyna bardziej przypominać strukturę natywną entropia konfiguracyjna (szerokość lejka) ulega zmniejszeniu na skutek tworzenia się stabilizujących interakcji. Jednakże nie istnieje jedna uprzywilejowana ścieżka kinetyczna określająca przebieg procesu a jedynie zbiór możliwych dróg prowadzących do stanu natywnego. Ewolucja białek prowadziła do wygładzenia krajobrazu energetycznego co minimalizuje ilość lokalnych minimów energetycznych mogących stanowić pułapkę uniemożliwiającą uzyskanie minimum globalnego. Ponadto naturalne białka charakteryzują się stabilnością strukturalną pozwalającą na zachowanie konformacji natywnej w środowisku o dużym zatłoczeniu molekularnym. (C) Uproszczony schemat krajobrazu energetycznego dla dwustopniowego fałdowania białka. Dwa minima, jedno dla stanu natywnego a drugie dla nieustrukturyzowanego są rozdzielone barierą energetyczną stanu przejściowego. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Science*, 2012, 338, 1042-1046 oraz *Current Opinion in Pharmacology*, 2010, 10, 709-714.

#### 1.4.2.2. Dynamika konformacyjna białek

Współczesne badania biochemiczne pokazały, że białka nie są układami statycznymi. W rzeczywistości wszystkie biomakromolekuły występują pod postacią szeregu różnych konformacji przechodzących płynnie jedna w drugą na skutek ruchów cieplnych. Jedynie podzbiór tych konformacji jest zdolny do pełnienia ról biologicznych takich jak wiązanie ligandów czy kataliza enzymatyczna. Dlatego też obserwowalne własności danego białka stanowią zbiorczy efekt wynikły z właściwości biologicznych każdego funkcjonalnego stanu, jego udziału w populacji oraz szybkości wzajemnej interkonwersji tych stanów. Dynamika (ruchy molekularne) cząsteczki to w istocie proces przechodzenia pomiędzy dozwolonymi stanami konformacyjnymi. Jednakże udział danego stanu nie jest zależny jedynie od wysokości bariery energetycznej, która musi zostać pokonana ale także od początkowego udziału startowej konformacji. Dlatego też badania nad dynamiką konformacyjną pozwalają na poznanie zarówno skali czasowych jak i rozpowszechnienia poszczególnych konformacji. Wysokość bariery energetycznej rozgraniczającej różne konformacje cząsteczki może wykazywać istotne różnice dlatego też szybkość przechodzenia jednego stanu w drugi może wahać się od  $10^{-12}$  do  $10^1$  s. Równowagi konformacyjne białek mogą być modyfikowane przez wiele czynników takich jak napięcia steryczne, wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne oraz efekty hydrofobowe<sup>209</sup>. Dodatkowym czynnikiem mającym istotne znaczenie jest wewnętrzna entropia konformacyjna,  $S_c$  reprezentująca rozkład stanów konformacyjnych białka. Wysoka wartość  $S_c$  wskazuje na dużą ilość stanów konformacyjnych bądź ich równomierny rozkład w populacji, podczas gdy niska wartość oznacza małą ilość stanów konformacyjnych lub ich nierównomierny rozkład w populacji.<sup>210, 211</sup> Entropia konformacyjna może mieć znaczący przyczynek do stabilności białka lub siły wiązania liganda.<sup>210</sup>

W wielu przypadkach zmiana konformacji danej reszty aminokwasowej pociąga zsynchronizowane ze sobą zmiany strukturalne w innych resztach. Większość białek to układy stosunkowo nietrwałe, różnica pomiędzy stanem zdenaturowanym a natywnym wynosi zwykle  $\sim 20-60 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .<sup>212</sup> Mimo, że zdenaturowane białka także posiadają do pewnego stopnia wewnętrzną organizację to można założyć brak oddziaływań dalszego zasięgu pomiędzy resztami aminokwasowymi.<sup>213, 214</sup> Utworzenie stanu natywnego prowadzi do utraty wielu stopni swobody a wprowadzenie złożonych ruchów konformacyjnych prowadzi do dodatkowej redukcji entropii takiego

układu. Taka sytuacja może faworyzować stan zdenaturowany nad funkcjonalną cząsteczką białka. Dlatego też presja ewolucyjna może preferować białka o relatywnie małej ilości konformacyjnych ruchów złożonych.<sup>210</sup>

Ruchy konformacyjne białek mogą zostać opisane jako przejścia pomiędzy stanami konformacyjnymi białek wykazującymi odmienne wartości energii potencjalnej,  $E_c$ .<sup>215</sup> Ogólne zasady opisu tych procesów są takie same dla wszystkich białek.<sup>215, 216</sup> Odpowiedni aparat pojęciowy stworzono w oparciu o szkła spinowe, będące nieuporządkowanymi magnesami. Powoduje to, że spiny budujących je atomów nie są ułożone w jednolity wzór (przykładem może być stop złota zawierający niewielką zawartość żelaza). Takie „rozcieńczenie” spinów powoduje, że oddziałują ze sobą w nieprzewidywalny sposób co utrudnia wyznaczenie konfiguracji o minimalnej energii.<sup>217</sup> Stan taki jest podobny do białek gdzie na skutek dużej ilości interakcji pomiędzy resztami aminokwasowymi prowadzi do skomplikowanego krajobrazu energetycznego.<sup>218</sup>

W danym momencie czasowym cząsteczka białka istnieje w jednym zdefiniowanym stanie konformacyjnym. Takie mikrostan nazywane są podstanami konformacyjnymi (ang. *conformational substates*, CS).<sup>219</sup> Po krótkim czasie jeden mikrostan przechodzi do innego mikrostanu a szybkość tych zmian jest zależna od temperatury układu. W niskich temperaturach ( $\ll 300$  K) czas przebywania w jednym CS przez cząsteczkę białka jest wydłużony, jednak w temperaturach fizjologicznych jest on bardzo krótki.<sup>215</sup> Wyróżnić można dwa podstawowe typy przeciwnych ruchów – procesy relaksacyjne oraz fluktuacje równowagowe. W procesach relaksacyjnych system przechodzi ze stanu nierównowagowego, wywołanego przez zaburzenie równowagi termodynamicznej (np. przez skok temperatury lub ciśnienia) do swojego stanu równowagowego. W najprostszym ujęciu procesów relaksacyjnych zakłada się, że powrót układu do stanu równowagowego może zostać opisany za pomocą prostej funkcji wykładniczej. Jednak w przypadku białek zarówno zależności czasowe jak i temperaturowe są bardziej skomplikowane.<sup>220</sup> W większości przypadków ruchy relaksacyjne są procesami zbiorczymi angażującymi jednocześnie zmiany położenia wielu atomów w cząsteczce.<sup>215</sup>

Natomiast fluktuacje równowagowe występują nawet w stanie równowagi termodynamicznej na skutek losowych ruchów cieplnych i mogą prowadzić do przechodzenia cząsteczki białka z jednego CS do innego.<sup>215</sup>

### 1.4.3. Wiązanie ligandów przez białka

#### 1.4.3.1. Termodynamika

W przeważającej części przypadków tworzenie kompleksu białko-ligand opiera się na wiązaniach niekowalencyjnych i jest procesem odwracalnym w warunkach fizjologicznych. W ogólności można zapisać następujące równanie na entalpię swobodną wiązania ligandu:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H_{\text{bind}} - T(\Delta S_{\text{prot}} + \Delta S_{\text{ligand}} + \Delta S_{\text{solv}}) \quad \text{Rów. 1.7}$$

Bezpośredni pomiar doświadczalny entalpii swobodnej wiązania ligandu ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) jest w większości przypadków niemożliwy. Wielkość ta jest wyznaczana albo z pomiarów stałej wiązania albo poprzez pomiary kalorymetryczne lub termoforezę w mikroskali. Zarówno entalpia wiązania,  $\Delta H_{\text{bind}}$  jak i entropia wiązania  $\Delta S_{\text{bind}}$  mogą mieć wkład do tworzenia stabilnego kompleksu białko-ligand. W zależności od tego, która funkcja termodynamiczna ma większy wkład do tego procesu tworzenie kompleksu może być napędzane entropowo lub entalpowo. Efekt energetyczny związany z wiązaniem ligandu ( $\Delta H_{\text{bind}}$ ) zwykle jest wyznaczany bezpośrednio z danych kalorymetrycznych albo uzyskiwany pośrednio (przy wykorzystaniu odpowiednich przybliżeń) z pomiarów stałych wiązania ligandu do makromolekuły. Pomiary termochemiczne pozwalają także na łatwe wyznaczenie całkowitego wkładu entropowego do wiązania, jednakże wyznaczenie poszczególnych wkładów do entropii (od białka, ligandu i rozpuszczalnika) jest znacznie trudniejsze. Metody spektroskopowe takie jak NMR pozwalają w pewnych przypadkach na ich zbadanie jednak nadal jest to poważny problem badawczy do rozwiązania.



Na podstawie powinowactwa fragmentów cząsteczki liganda do białka wyróżnić można dwa typy atomów w cząsteczce liganda, sterowniki (ang. *drivers*) i kotwice (ang. *anchors*). Podczas wiązania liganda kotwice są odpowiedzialne za formowanie się stabilnego kompleksu podczas gdy sterowniki indukują zmianę konformacyjną białka. Z tego powodu kotwice mają taką samą geometrię oddziaływań z formą aktywną i nieaktywną białka a sterowniki wykazują silniejsze powinowactwo względem jednej z tych form.<sup>223</sup> Tłumaczy to dlaczego czasem bardzo subtelna zmiana struktury liganda (podstawienie jednego atomu) może mieć diametralny wpływ na jego działanie. Jeżeli struktury obydwu stanów (aktywnego i nieaktywnego) białka są znane to proste porównanie struktur centrów allosterycznych może być wystarczające do identyfikacji kotwic i sterowników w cząsteczce liganda. Techniki relaksacyjne NMR mogą być bardzo pomocne w badaniach aktywnych stanów konformacyjnych. Natomiast do identyfikacji istotnych atomów w cząsteczce liganda (kotwice oraz sterowniki) potrzebne są struktury krystalograficzne o wysokiej rozdzielczości.

#### 1.4.4. Metody badań dynamiki konformacyjnej

##### 1.4.4.1. Wprowadzenie

Wczesne metody stosowane do próbkowania dynamiki konformacyjnej białek opierały się głównie na lokalnych sondach optycznych, wymianę izotopową H/D<sup>229</sup> oraz jednowymiarową spektroskopię NMR.<sup>230, 231</sup> Obecnie coraz częściej wykorzystywane są metody takie jak SAXS/SANS<sup>232</sup>, wielowymiarowa spektroskopia NMR<sup>233, 234</sup>, spektroskopia Mössbauera<sup>235</sup> a także krystalografia rentgenowska<sup>236</sup>. Techniki relaksacyjne oparte na skokach temperatury (ang. *laser temperature-jump*, *T-jump*) także są często wykorzystywane. W dalszej części zostaną szerzej przedstawione wybrane techniki z dużym naciskiem na spektroskopię NMR. Ponadto, więcej technicznych informacji na temat spektroskopii NMR przedstawiono w rozdziale 1.7. *Metody stosowane w pracy doktorskiej*.

##### 1.4.4.2. Spektroskopia NMR

We współczesnych eksperymentach NMR zbiorcza magnetyzacja próbki jest przesuwana ze stanu równowagowego (wzdłuż osi równoległej do stałego pola magnetycznego) a sygnał jest emitowany gdy próbka powraca do stanu równowagowego (lub *quasi*-równowagowego) co określa się mianem relaksacji. Z uwagi na istnienie wielu stanów odległych od równowagi wyróżnić można szereg procesów relaksacyjnych, które można obserwować za pomocą NMR. Zwykle są one rejestrowane przy pomocy dwuwymiarowych eksperymentów korelacyjnych typu HSQC (ang. *Hetero Single Quantum Correlation*), gdzie intensywności pików są modulowane jako funkcje czasu ewolucji sygnału w sekwencji pulsów NMR.<sup>210</sup>

Mimo, że pierwotnie techniki relaksacyjne NMR nie były efektywnymi narzędziami w badaniach konformacyjnych to dokonane w przeciągu kilkunastu ostatnich lat postępy teoretyczne<sup>237, 238</sup> i doświadczalne<sup>239, 240</sup> umożliwiły efektywne badania dynamiki makrocząstek. Próbkowanie relaksacji w dwóch wymiarach znacznie poszerzyło możliwości stojące przed tymi technikami. Eksperymenty tego rodzaju mogą zostać wykorzystane do badań dynamiki konformacyjnej w skalach czasowych poniżej nanosekund. Obserwowalne parametry NMR takie jak czasy relaksacji  $T_1$  (spin-sieć),  $T_2$  (spin-spin) czy też jądrowy efekt Overhausera (NOE) są bezpośrednio związane z funkcją gęstości spektralnej  $J(\omega)$  opisującej ruch wektorów wiązań chemicznych.<sup>210</sup> Odpowiednie procedury matematyczne pozwalają na wyznaczenie z funkcji gęstości spektralnej tzw. uogólnionego parametru uporządkowania  $S^2$ , będącego miarą amplitudy przemieszczenia wektora opisującego przemieszczenia wiązań w odpowiednio zdefiniowanym układzie współrzędnych,<sup>233</sup> co po dalszej obróbce danych pozwala zobrazować ruchliwość konformacyjną określonych fragmentów białka.

Jednym z bardziej spektakularnych możliwości jakie niesie ze sobą spektroskopia NMR to próbkowanie rzadkich stanów konformacyjnych (o udziale w populacji < 5%) niedostępnych dla większości metod badawczych. Niedawne badania nad mutantami lizozymu pozwoliły, przy wykorzystaniu technik relaksacyjnych NMR oraz modelowania molekularnego uzyskać informacje na temat struktury tych konformacji co może być pomocne w inżynierii białek oraz projektowania nowych związków wpływających na aktywność biologiczną białek.<sup>241</sup>

Jednym z ciekawych zastosowań eksperymentów relaksacyjnych NMR, rozwiniętych na przestrzeni ostatnich

kilku lat są ilościowe badania entropii konformacyjnej. Zastosowanie eksperymentów NMR funkcjonujących w skalach czasowych poniżej  $10^{-9}$  s pozwoliło na sprawne wyznaczenie i ocenę jej roli w wiązaniu ligandów przez makrocząsteczki.<sup>242-244</sup> Uzyskane wyniki uwiarydliły jak zmiany entropii konformacyjnej (szybka dynamika reszt aminokwasowych) oraz relatywnie wolne ruchy większych fragmentów białka (wzbudzone energetycznie stany konformacyjne) mogą regulować wiązanie ligandów na drodze, która obecnie nie jest możliwa do przewidzenia jedynie na badaniach podstawowej struktury białka.<sup>224, 227, 245-248</sup>

## 1.4.5. Kinetyka enzymatyczna

### 1.4.5.1. Podstawowe informacje o enzymach

Enzymy są makrocząsteczkami (białkami lub kwasami nukleinowymi) będących katalizatorami różnorodnych reakcji chemicznych. Pomimo odkrycia w przyrodzie katalitycznych cząsteczek RNA oraz otrzymania szeregu sztucznych, aktywnych katalitycznie kwasów nukleinowych to dalsza dyskusja zostanie ograniczona do enzymów białkowych. Białka enzymatyczne są bardzo wydajnymi katalizatorami; oszacowano, że obecność enzymu może przyspieszyć zajście reakcji chemicznych takich jak hydroliza estrów fosforanowych od  $10^{15}$  do  $10^{17}$  razy.<sup>249</sup> Każda reakcja enzymatyczna składa się z minimum dwóch podstawowych etapów: i) odwracalnego wiązania substratu do miejsca katalitycznego enzymu oraz ii) procesu katalitycznego prowadzącego do powstania produktu<sup>1</sup>. Szybkość powstawania produktu, nazywana także obiegiem enzymu może być mierzona jako funkcja stężenia substratu, co zwykle prowadzi do uzyskania zależności hiperbolicznej. Jednym z najprostszych a zarazem najczęściej stosowanych przybliżeń procesów enzymatycznych jest model Michaelisa-Menten (M-M), szczegółowo opisany w następnych rozdziałach.

Różne badania prowadzone nad katalizą enzymatyczną pozwoliły wysunąć kilka ogólnych cech charakterystycznych tego procesu. i) Efektywna kataliza wymaga obecności makromolekuły o masie większej niż 5kDa. ii) W przypadku większości enzymów obserwuje się istnienie produktów przejściowych reakcji, która sama składa się z szeregu procesów elementarnych. Podział reakcji na szereg etapów o relatywnie niskiej energii aktywacji prowadzi do zwiększenia szybkości reakcji. iii) Zmiany konformacji białka mają istotny wkład do mechanizmów reakcji enzymatycznych.<sup>250</sup>

### 1.4.5.2. Proste modele kinetyczne

Jednym z pierwszych modeli opisujących kinetykę reakcji enzymatycznych jest model Michaelisa-Menten (M-M), który jest z dużym sukcesem stosowany do opisu procesów enzymatycznych od ponad 100 lat<sup>251</sup>. Pomimo użycia w nim szeregu uproszczeń wykazuje on bardzo duże spektrum użyteczności, w większości przypadków znajdując potwierdzenie w danych eksperymentalnych (**Rys. 1.21**). W najprostszej postaci zakłada się, że substrat  $S$  jest odwracalnie wiązany przez enzym  $E$  co prowadzi do powstania kompleksu  $ES$ . Następnie substrat może ulec przekształceniu do produktu  $P$  lub kompleks może ulec rozpadowi do  $E$  i  $S$  (**Rów. 8**). Proces konwersji  $E$  do  $S$  stanowi sedno katalizy enzymatycznej.<sup>1</sup> Niezależnie od wybranej ścieżki reakcji cząsteczka enzymu jest gotowa do wiązania następnej cząsteczki substratu. Model ten może zostać schematycznie opisany w poniższy sposób:

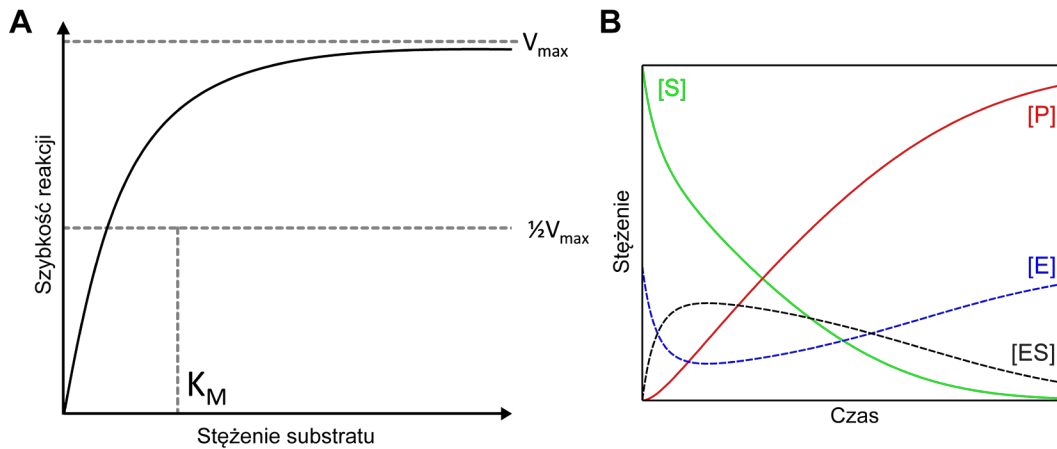


gdzie  $k_{\text{on}}$  oraz  $k_{\text{off}}$  są odpowiednio stałymi szybkości wiązania i uwalniania substratu a  $k_{\text{cat}}$  jest szybkością etapu katalitycznego. Na podstawie powyższego modelu można łatwo wyprowadzić kanoniczne równanie M-M opisujące zależność szybkości reakcji  $v = d[P]/dt$  od stężenia substratu  $[S]$ .

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Rów. 1.9}$$

W tym przypadku  $V_{\text{max}}$  tożsame z  $k_{\text{cat}}[E]_{\text{T}}$  jest szybkością maksymalną obserwowalną przy dużym nadmiarze substratu a  $[E]_{\text{T}} \equiv [ES] + [E]$  jest całkowitym stężeniem wszystkich form enzymu. Natomiast stała Michaelisa  $K_M$

$= (k_{\text{off}} + k_{\text{cat}})/k_{\text{on}}$  jest interpretowana jako stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej wynosi  $V_{\text{max}}/2$ . Początkowo zamiast stałej  $K_M$  w **Rów. 9** pojawiała się stała dysocjacji,  $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  natomiast stała  $K_M$  została wprowadzona później na podstawie przybliżenia stanu pseudostacjonarnego<sup>252</sup>. Zakłada ono, że stężenie produktów przejściowych (tutaj kompleksu  $ES$ ) jest stałe w skalach czasowych potrzebnych do zajścia procesu katalitycznego. Modele oparte na równaniu M-M są także wykorzystywane w opisie oddziaływań białko-białko, hybrydyzacji DNA czy też absorpcji biocząsteczek.<sup>1</sup>



**Rys. 1.21.** Model kinetyczny Michaelisa-Menten. **(A)** Krzywa obrazująca zmianę szybkości reakcji enzymatycznej  $V$  w funkcji stężenia substratu  $[S]$ . **(B)** Zmiany stężenia substratu  $[S]$ , produktu  $[P]$ , enzymu  $[E]$  oraz kompleksu enzym-substrat  $[ES]$  w miarę postępu reakcji. Dla zwiększenia czytelności wykresu stężenia  $E$  oraz  $ES$  są znacznie zawyżone względem  $S$  i  $P$  niż miałyby to miejsce w rzeczywistości. Zaczerpnięto i zmodyfikowano z WikiCommons.

Co ciekawe mimo swojej pozornej prostoty podstawowe modele kinetyczne nadal są rozwijane i badane w sposób typowo analityczny. Przykładowo w niedawnej pracy wykazano że relacje pomiędzy przebiegiem katalitycznym enzymu a uwalnianiem substratu mogą być bardziej złożone niż pierwotnie sądzono. Wykazano, że szybkość procesu katalitycznego może być przyspieszona poprzez zwiększenie szybkości uwalniania substratu w przypadkach takich jak wysokie stężenie substratu czy wyjściowo niska szybkość uwalniania substratu.<sup>253</sup>

### 1.4.5.3. Opis fizyczny procesu katalizy

Enzymy są bardzo wydajnymi katalizatorami a w celu wyjaśnienia przyczyn ich efektywności zaproponowano szereg teorii.<sup>254, 255</sup> Od ponad stulecia w enzymologii są znane, wcześniej omówione teorie „klucza i zamka” oraz „dopasowania indukcyjnego” sugerujące, że funkcja enzymu jest bezpośrednio zależna od jego strukturalnych interakcji enzymu z substratem. Prowadzone od drugiej połowy XX wieku badania strukturalne pozwoliły uzyskać dane doświadczalne potwierdzające teorie indukcyjnego dopasowania. Struktura enzymu może dostosowywać się do danego etapu elementarnej reakcji na skutek zmian konformacji prowadzących do odpowiedniego ułożenia substratu w miejscu katalitycznym. Innymi często obserwowanymi zmianami jest usunięcie cząsteczek rozpuszczalnika z miejsca katalitycznego co ma wpływ na wartość stałe dysocjacji kwasowych i zasadowych reszt aminokwasowych.<sup>250</sup>

Dalszym rozwinięciem prostych modeli kinetycznych było stworzenie ogólnej teorii kompleksu aktywnego, która w uproszczony sposób zakładała, że powstający w wyniku reorganizacji wiązań chemicznych substratu kompleks aktywny występuje w równowadze termodynamicznej z pozostałymi reagentami. Na tej podstawie założono, że enzymy wykazują daleko posuniętą specyficzność względem tego właśnie stanu przejściowego.<sup>256</sup> Hipoteza ta została wzmocniona przez odkrycie w latach 60’ pierwszych analogów stanu przejściowego (związków mających podobną geometrię do hipotetycznego stanu przejściowego).<sup>254</sup> Zaobserwowano wtedy, że takie związki wykazują silne powinowactwo do miejsca wiążącego enzymu. Badania krystalograficzne nad strukturami kompleksów lizozymu z różnymi analogami stanu przejściowego pokazały, że w miejscu wiążącym enzymu związki te wykazują przestrzenny układ atomów oczekiwany dla hipotetycznego stanu przejściowego substratu.<sup>257, 258</sup> Zgodnie z tymi

założeniami enzym jest giętkim molekularnym „rusztowaniem”, komplementarnym geometrycznie do stanu przejściowego katalizowanej przez siebie reakcji (może ona być znacząco inna od geometrii stanu podstawowego). Taki opis fenomenologiczny katalizy enzymatycznej został określany mianem stabilizacji stanu przejściowego.<sup>254</sup>

#### 1.4.5.3.1. Procesy elementarne w katalizie enzymatycznej

Graniczną szybkością zachodzenia procesów elementarnych (tworzenia i rozpadu wiązań chemicznych) jest czas trwania pojedynczej wibracji cząsteczki ( $\sim 10^{-12}$  s) jednak jest to dość nieprecyzyjna granica ponieważ zmiany strukturalne zachodzące w cząsteczce enzymu obejmuje takie procesy jak zmiany geometrii wiązań wodorowych, migracje cząsteczek rozpuszczalnika oraz oddziaływania elektrostatyczne (**Tab.1**).<sup>259</sup> Stałe szybkości tworzenia się wiązań wodorowych wynoszą  $10^{11} - 10^{12}$  s<sup>-1</sup>, powstawanie par jonowych i inne oddziaływania elektrostatyczne charakteryzują się podobną szybkością.<sup>250</sup> Zmiany konformacyjne istotne dla katalizy często zachodzą wolniej, przykładowo zmiany struktury 2-rzędowej często zachodzą ze stałymi szybkościami na poziomie  $10^7 - 10^8$  s<sup>-1</sup> natomiast tworzenie się oddziaływań warstwowych w kwasach nukleinowych ma stałe szybkości w zakresie  $10^6 - 10^7$  s<sup>-1</sup>. Z tego powodu w większości przypadków zmiany konformacyjne są etapem limitującym w kinetyce enzymatycznej. Przykładowo szybkość transferu protonu może wynieść  $10^{12}$  s<sup>-1</sup> ale reakcja chemiczna wymaga powrotu białka do poprzedniego stanu protonacyjnego co jest znacznie powolniejszym procesem i większość katalizowanych enzymatycznie reakcji nie ma stałych szybkości wyższych niż  $\sim 10^6$  s<sup>-1</sup>.<sup>250, 260</sup>

**Tab.1.1** Skale czasowe procesów dynamicznych zachodzących w układach enzymatycznych.<sup>250, 259</sup>

Proces	Szacunkowa skala czasowa – log <sub>10</sub> (s)
Oscylacja wiązania	-14 do -13
Transfer protonu	-12
Tworzenie wiązania wodorowego	-12 do -11
Oscylacje regionów globularnych	-12 do -11
Pseudorotacja pierścienia cukrowego	-12 do -9
Rotacja reszty aminokwasowej na powierzchni białka	-11 do -10
Ruchy torsyjne reszt aminokwasowych we wnętrzu białka	-11 do -9
Ruchy zawiasowe domen białkowych	-11 do -7
Reorganizacja cząsteczek wodu	-8
Przejścia helisa-kartka	-8 do -7
Zmiany allosteryczne	-5 do 0
Lokalna denaturacja	-5 do 1
Rotacje średniej wielkości łańcuchów białkowych	-4 do 0

#### 1.4.5.4. Teoria stanu przejściowego

Teoria stanu przejściowego opiera się na kilku założeniach i uproszczeniach. i) szybkość reakcji jest kontrolowana przez rozpad stanu przejściowego (kompleksu aktywnego) ii) w układzie istnieje równowaga termodynamiczna pomiędzy kompleksu aktywnego a reagentami. Podstawowym równaniem w hipotezie jest,

$$k = \kappa \nu K^\ddagger \quad \text{Rów. 1.10}$$

gdzie  $k$  jest obserwowalną doświadczalnie szybkością reakcji,  $\kappa$  jest współczynnikiem transmisji,  $\nu$  jest częstotliwością oscylacji modu normalnego stanu przejściowego wzdłuż arbitralnej współrzędnej reakcji (dokładniej jest to uśredniona częstotliwość przekraczania bariery energetycznej na hiperpowierzchni energii potencjalnej kompleksu aktywnego) a  $K^\ddagger$  jest stałą równowagową powstawania kompleksu aktywnego z substratów (**Rys. 1.22**). Dokładna fizyczna natura współczynnika przejścia jest dyskutowana w szeregu artykułów<sup>261-263</sup>, jednakże na potrzeby tej pracy nie będzie omawiana. W sposób przybliżony oznacza on współczynnik sukcesu w przekroczeniu bariery energetycznej co pozwala na utworzenie kompleksu aktywnego.<sup>264</sup> W większości przypadków jego wartość zawiera się w przedziale 0,1 do 1,0 dla reakcji w fazie ciekłej w temperaturze pokojowej.

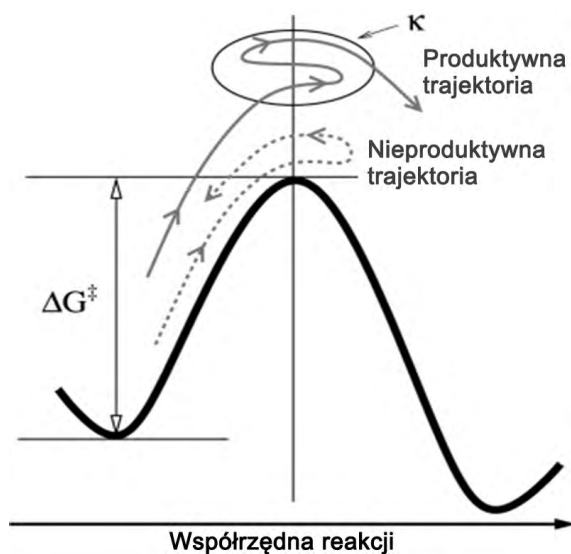


$K^\ddagger$  może zostać zapisywana przy pomocy funkcji rozkładu a czynnik  $\nu$  przybliżony poprzez wyrażenie  $k_B T/h\nu$ , gdzie  $k_B$  to stała Boltzmana,  $T$  to temperatura absolutna a  $h$  to stała Plancka. Pozwala to na następujący zapis równania Eyringa:

$$k = \kappa(k_B T/h)K^\ddagger \quad \text{Rów. 1.11}$$

Formalna analiza procesu enzymatycznego przy pomocy **Rów. 11** połączona ze obserwacjami eksperymentalnymi wskazuje, że stan przejściowy wykazuje znacznie silniejsze powinowactwo do enzymu niż substrat w stanie podstawowym a różnica w energii wiązania jest skorelowana ze stosunkiem stałych szybkości reakcji w obecności i pod nieobecność enzymu<sup>254</sup>. Jak wspomniano wcześniej związki wykazujące podobieństwo strukturalne do stanu przejściowego wykazują silne powinowactwo do danego enzymu.<sup>254</sup> Trzeba jednakże wziąć pod uwagę, że takie związki nie wiążą się z enzymem tak silnie jak stan przejściowy ponieważ ich geometria tylko w pewnym stopniu odzwierciedla prawdziwą strukturę stanu przejściowego. Ponadto późniejsze badania biofizyczne wskazują na to, że przynajmniej w części przypadków działanie enzymów polega raczej na wstępnej organizacji przestrzennej środowiska reakcji ze szczególnym uwzględnieniem cząsteczek rozpuszczalnika. Dzięki temu do zajścia procesu katalitycznego nie jest konieczne bardzo silne oddziaływania pomiędzy centrum aktywnym enzymu a stanem przejściowym.<sup>265</sup>

Enzymy ewoluowały w kierunku maksymalizacji ilości obrotów na cząsteczkę co prowadzi do wartości  $K_M$  znacznie wyższych niż wewnątrzkomórkowe stężenia substratów. W większości przypadków wartości  $K_M$  zawierają się w przedziale 1-10 [S]. Innym istotnym odkryciem podpartym badaniami biochemicznymi z wykorzystaniem mutagenyzy punktowej było potwierdzenie tego, że optymalne tworzenie kompleksu aktywnego jest procesem kooperacyjnym wymagającym wielu słabych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami enzymu oraz substratu<sup>266</sup>. Rozwiązanie takie poprawia specyficzność enzymu, nawet niewielkie zaburzenie struktury substratu może prowadzić do znaczących zmian w jego powinowactwie do enzymu.



$$k_{TST} = \left( \frac{k_B T}{h} \right) \exp\left( \frac{-\Delta G^\ddagger}{k_B T} \right)$$

$$k = \kappa k_{TST}$$

**Rys. 1.22.** Schematyczne przedstawienie profilu energetycznego dla reakcji enzymatycznej. Dynamika białka może wpłynąć na przebieg reakcji na dwa sposoby: przez zmianę wysokości bariery energetycznej ( $\Delta G^\ddagger$ ) oraz wartość współczynnika przejścia ( $\kappa$ ). Cząsteczka enzymu jest układem dynamicznym i może mieć wpływ na szybkość reakcji przez zmianę otoczenia miejsca katalitycznego tak, że więcej trajektorii reakcji będzie prowadziło do powstania stabilnego kompleksu aktywnego. Przedstawiono zachowanie dwóch różnych trajektorii. Jedna z nich przechodzi przez stan przejściowy ale powraca na stronę substratów (trajektoria nieprodukcyjna). Druga trajektoria przekracza kilkakrotnie stan przejściowy zanim doprowadzi do powstania produktów (trajektoria produkcyjna). W modelu tym  $\kappa$  stanowi czynnik przedwykładniczy korygujący poziom sukcesu w przekraczaniu bariery aktywacji. Zaczerpnięte i zmodyfikowane na podstawie *Journal of American Chemical Society*, 2005, 127, 15248-15256.

Początkowo zastanawiano się czy stabilizacja stanu przejściowego może prowadzić do jakichkolwiek informacji związanych z dynamiką konformacyjną enzymów. Można założyć, że maksymalnie efektywna cząsteczka enzymu jest sztywnym układem o jednej predefiniowanej konformacji wiążącej stan przejściowy. Jednakże prowadzi ono do wniosku, że wymaga ona aby enzym występował cały czas w mniej stabilnej energetycznie konformacji wymaganej dla wiązania stanu przejściowego. Ponadto szybka dyfuzja (zarówno substratu jak i produktu) do centrum katalitycznego wymaga bardziej otwartej konformacji. Hipoteza indukcyjnego dopasowania stanowi

pewien kompromis, w którym cząsteczka enzymu występuje w stabilnej energetycznie konformacji a interakcja z substratem powoduje relatywnie niewielkie zmiany strukturalne potrzebne do efektywnej katalizy reakcji. Innym argumentem wskazującym na zmiany konformacyjne po wiązaniu substratu jest fakt istnienia więcej niż jednego stanu przejściowego dla wielu reakcji enzymatycznych. Każdy z nich ma odmienną geometrię co wymusza dostosowanie się centrum aktywnego.<sup>254</sup>

Dokładniejszy opis teoretyczny katalizy enzymatycznej, zwłaszcza opisu transferu wodoru, wymaga zastosowania pełnego formalizmu chemii kwantowej i nie będzie tutaj dokładnie omawiany.<sup>262, 263, 267, 268</sup> Innymi efektami kwantowymi, mającymi duży wpływ na działanie enzymów jest dynamika wiązań wodorowych. Delokalizacja protonów w sieci wiązań wodorowych może znacząco zmodyfikować stałe dysocjacji reszt aminokwasowych w centrum katalitycznym co przekłada się na wydajność enzymu.<sup>269, 270</sup>

#### 1.4.5.5. Wyjście poza model indukcyjnego dopasowania

Pierwotnie uważano, że hipoteza indukcyjnego dopasowania jest wystarczająca do opisu białek enzymatycznych a zmiany konformacji zachodzą dopiero po interakcji z substratem (lub w ogólności ligandem w przypadku białek allosterycznych). Jednak obecnie model ten zaczyna być krytykowany jako niekompletny. Liczne badania eksperymentalne i teoretyczne uwidoczniły, że białka mogą przyjmować dużą ilość konformacji o zbliżonej energii a ich ruchy konformacyjne mogą zostać opisane ilościowo. Jednakże przez długi czas rola dynamiki konformacyjnej w wiązaniu ligandów i procesach katalitycznych była słabo poznana i często ignorowana w opisie tych procesów. Dynamika konformacyjna w procesie katalitycznym może być rozpatrywana z perspektywy teorii kompleksu aktywnego gdzie rolę odgrywa wysokość bariery energetycznej oraz wielkość współczynnika przejścia. Uważa się, że największy wkład w proces katalityczny mają procesy obniżające wysokość bariery energetycznej natomiast efekty dynamiczne związane z współczynnikiem przejścia mają znaczenie drugorzędne<sup>263</sup>. Ruchy konformacyjne obniżające barierę energetyczną reakcji są termicznie uśrednionymi wkładami w równowagę termodynamiczną (zmiany na poziomie  $10^{-12}$  s) systemu. Obliczenia teoretyczne potwierdziły te założenia – uśrednione ruchy równowagowe mają znaczny wpływ na stałe szybkości reakcji. Relację pomiędzy dynamiką konformacyjną a współczynnikiem przejścia także były badane teoretycznie<sup>263, 264</sup>, wykazano, że nawet niewielki wkład energii kinetycznej od zmiany konformacyjnej (skala  $10^{-6}$  s) może znacznie zwiększyć odsetek produktywnych trajektorii reakcji<sup>264</sup>. Takie zmiany strukturalne mogą stabilizować tworzenie się kompleksu aktywnego przez zwiększenie efektywności przekraczania bariery, podczas gdy szybkie ruchy termiczne mają wkład głównie do obniżenia bariery aktywacji. Pomimo uzyskania tych wyników dokładne zrozumienie roli tych ruchów na wysokość bariery energetycznej ( $\Delta G^\ddagger$ ) oraz współczynnika transmisji ( $\kappa$ ) nie zostało osiągnięte.

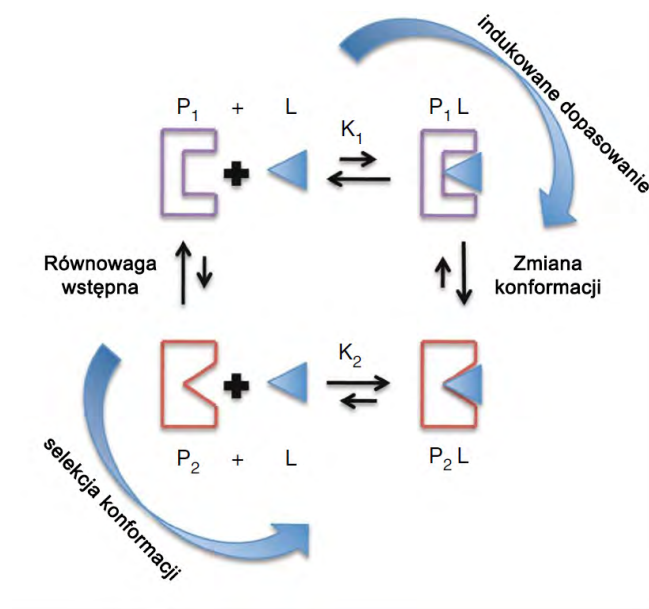
Ponieważ skale czasowe zdarzeń dynamicznych zachodzących w kompleksie *ES* i skale czasowe procesów katalitycznych są zbliżone to można zapytać czy są one w pewien sposób związane ze sobą.<sup>259</sup> Dynamika białek jest zaangażowana w wiele aspektów działania enzymów wliczając wiązanie substratów/kofaktorów oraz ich uwalnianie co opisano w szeregi prac.<sup>229, 233, 264</sup> Nawet ruchy konformacyjne w skali czasowych  $10^{-12}$  s do  $10^{-9}$  s mogą wpływać na procesy katalityczne zachodzące zazwyczaj z szybkościami  $10^{-6}$  s.<sup>259</sup> Dlatego też wprowadzono teorię „konformacji bliskich aktywnej” (ang. *near-active conformations*, NAC) postulującą, że stała opisująca szybkość aktu katalitycznego  $k_{cat}$  jest związana z częstotliwością (lub prawdopodobieństwem) z którą cząsteczki enzymu znajdują w jednej z NAC zdolnych do katalizy.<sup>271</sup> Ponieważ proces wiązania substratu obejmują wiele typów zdarzeń dynamicznych (także dyfuzję liganda) to zaproponowano szereg uproszczeń, w jednym z najpowszechniejszych modeli zmiana konformacji enzymu jest traktowana w ten sam sposób jak stałe szybkości w reakcji chemicznej (ang. *gating*), z założeniem, że oddziaływanie białko-ligand nie ma wpływu na szybkość zmian konformacji. Bardziej zaawansowana wersja bierze pod uwagę efekty wiązania ligandu i została nazwana modelem podwójnego przejścia (ang. *dual transition model*).<sup>272</sup>

Pomimo, że do badań dynamiki konformacyjnej podczas katalizy można wykorzystać wiele technik takich jak rezonansowy transfer fluorescencji, mikroskopia sił atomowych czy techniki przepływowe to prawdopodobnie najbardziej efektywna jest spektroskopia NMR ponieważ pozwala na globalne badanie ruchów konformacyjnych.<sup>210</sup> Większość badań strukturalnych nad katalizą enzymatyczną wykonano na kilku białkach modelowych takich jak cyklofilina A, należąca do rodziny izomeraz peptydylo-prolinowych katalizujących izomerizację cis-trans wiązania

peptydowego pomiędzy proliną a inną resztą aminokwasową.<sup>273</sup> Badania relaksacji spinowej w różnych skalach czasowych ( $10^{-12}$  do  $10^{-6}$  s) pokazały, że enzym wykazuje szereg ruchów konformacyjnych w skalach od piko- ( $10^{-12}$ ) do mikrosekund ( $10^{-6}$ ), które zostały powiązane ze stałymi szybkości poszczególnych elementarnych etapów procesu katalitycznego.<sup>234</sup> Ponadto badania genomowe i strukturalne wskazały, że zarówno reszty aminokwasowe jak i geometria wiązań wodorowych w sieci ruchów dynamicznych są zachowawcze ewolucyjnie.<sup>234</sup>

#### 1.4.5.6. Dyskusja nad ogólnym mechanizmem działania enzymów

Na podstawie omawianych wcześniej rozważań, zaproponowano model działania enzymów alternatywny do IF, nazwany modelem selekcji konformacyjnej (ang. *conformational-selection*, CS). Zakłada on że białko istnieje w równowadze szeregu wysokoenergetycznych, aktywnych katalitycznie stanów konformacyjnych, których udział w populacji jest niewielki (**Rys. 1.23**).<sup>274</sup> Badania pokazujące istnienie aktywnych konformacji bez związanego liganda wspierają poprawność modelu CS.<sup>275, 276</sup> Z uwagi na to, że mechanizm CS nie jest możliwy dla białka, którego aktywna konformacja jest zupełnie zamknięta dla liganda, to wprowadzono jego zmodyfikowaną wersję gdzie ligand wiąże się do częściowo zamkniętej konformacji. Indukuje to dalsze zmiany konformacyjne w kierunku aktywnej katalitycznej struktury. Przyjęcie takiego założenia sprawia, że różnica pomiędzy modelami IF i CS jest dość płynna (**Rys. 1.23**) i można spodziewać się, że różne enzymy mogą wykazywać częściowe preferencję względem jednego z dwóch modeli.<sup>272</sup> Przedstawiono hipotezy, mówiące że zwiększenie stężenia ligandu prowadzi może do przejścia mechanizmu z CS do IF ponieważ duże stężenie liganda czyni wiązanie go przez białko bardziej prawdopodobnym.<sup>277, 278</sup> W jednej z niedawnych prac teoretycznych pokazano, że zarówno zwiększenie szybkości zmian konformacyjnych jak i przyrost stężenia substratu ma wpływ na dominację mechanizmu IF.<sup>272</sup>



**Rys. 1.23.** Uproszczony cykl termodynamiczny dla procesu rozpoznania molekularnego uwzględniającego zarówno indukowane dopasowanie (IF) jak i wstępną równowagę konformacyjną (CS). Obydwa modele są skrajnymi wersjami mechanizmu rozpoznania liganda, kluczową różnicą pomiędzy nimi jest to, że w przypadku dopasowania indukcyjnego konformacja wiążąca ligand powstaje dopiero po jego wiązaniu przez białko. Natomiast w przypadku selekcji konformacyjnej, struktura zdolna do wiązania liganda (czerwona,  $P_2$ ) istnieje w środowisku przed dodaniem liganda (L). Kinetyczne stałe szybkości oraz parametry termodynamiczne mają wpływ na to, który mechanizm będzie dominował. Jeżeli stężenie formy  $P_2$  jest większe niż indukcyjnego związku przejściowego  $P_1L$  selekcja konformacyjna będzie preferowaną ścieżką reakcji. Oznacza to, że by ścieżka IF była preferowana konieczna jest wysoka wartość stałej reakcji  $K_1$  lub duże stężenie początkowe liganda. W przypadku modelu CS szybkość powstawania kompleksu  $P_2L$  jest liniową funkcją stężenia  $P_2$  jednak zależność od całkowitego stężenia białka ma charakter nieliniowy. Jeżeli udział konformacji  $P_2$  jest niski ( $< 5\%$ ) to badania kinetyczne mogą nie dać odpowiedzi z jaki mechanizm ma przeważający udział. Zaczerpnięte i zmodyfikowane na podstawie *Nature Chemical Biology*, 2009, 5, 789-796.

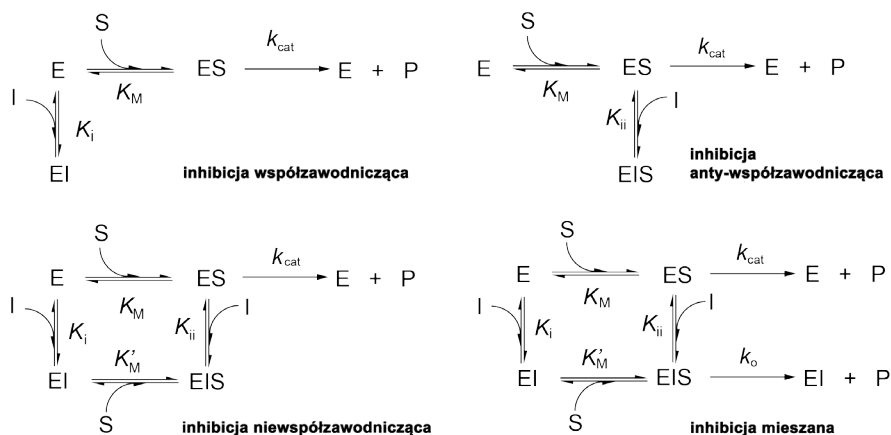
#### 1.4.5.7. Inhibicja enzymów

Inhibitor to cząsteczka zdolna do wiązania się z enzymem lub białkiem receptorowym i obniżenia jego aktywności biologicznej. Hamowanie aktywności tych białek może prowadzić do znacznych zmian w metabolizmie komórki, które mogą mieć zarówno pozytywne jak i negatywne skutki dla całego organizmu. Dlatego też wiele substancji toksycznych oraz leków to inhibitory. Dla większej przejrzystości w dalszej części tekstu termin inhibitor będzie wiązany z cząsteczką wiążącą się do enzymu, jednakże zbliżone mechanizmy odnoszą się też do cząsteczek wiążących się z białkami receptorowymi i przenośnikami sygnału.

Można zaproponować różne sposoby klasyfikacji inhibitorów, jednak najczęściej dzieli się je ze względu na mechanizm działania. W pierwszym przybliżeniu wyróżnia się inhibitory odwracalne i nieodwracalne, kategorie te dzieli się dalej na kilka opisanych poniżej podkategorii. W dalszej części zostaną przedstawione tylko podstawowe informacje na temat inhibitorów monomerycznych enzymów o prostym mechanizmie działania, które mogą zostać w zadowalający sposób opisane za pomocą modelu Michaelisa-Menten. Mimo pozornej prostoty, z uwagi na skomplikowaną naturę oddziaływań białko-ligand, kwestia jednoznacznej klasyfikacji inhibitorów w oparciu o mechanizm działania nie została zamknięta. Do tej pory pojawiają się głosy, że należy się przywrócić temu zagadnieniu dokładniej i zaproponować bardziej przemyślany sposób klasyfikacji inhibitorów w oparciu o równania kinetyczne.<sup>279</sup>

#### 1.4.5.7.1. Inhibicja odwracalna

Inhibitory odwracalne łączą się z enzymami niekowalencyjnie, najczęściej poprzez wiązania wodorowe oraz efekty hydrofobowe. Mimo, że wspomniane oddziaływania są relatywnie słabe to cząsteczki inhibitora tworzą często złożoną sieć interakcji z powierzchnią białka co zapewnia specyficzne rozpoznanie i silne wiązanie do enzymu. Inhibicja odwracalna może zostać opisana ilościowo poprzez siłę wiązania inhibitora oraz jego wpływu na stałe kinetyczne opisujące mechanizm procesu katalitycznego. Zazwyczaj wykorzystuje się do tego opisaną wcześniej kinetykę M-M, w szczególnych przypadkach opis ten jednak może być niewystarczający. W zależności od mechanizmu wiązania się z białkiem wyróżnia się kilka typów inhibicji odwracalnej (**Rys. 1.24**).<sup>1</sup>



**Rys. 1.24.** Klasyfikacja typów inhibicji odwracalnej w przybliżeniu Michaelisa-Menten. Zaczerpnięte i zmodyfikowane z WikiCommons.

##### 1.4.5.7.1.1 Inhibicja współzawodnicząca

Jest to typ inhibicji w którym inhibitor współzawodniczy z substratem o dostęp do miejsca wiążącego w cząsteczce enzymu lub receptora. W danym punkcie czasowym enzym może występować w formie *apo*, albo wiązać substrat lub inhibitor (nie może jednak jednocześnie wiązać inhibitora i substratu). Zwykle inhibitory współzawodniczące wiążą się z centrum katalitycznym jednakże konkurencja z substratem o dostęp do miejsca allosterycznego też jest teoretycznie możliwa w ramach tego modelu (jeżeli substrat nie jest jednocześnie wiązany przez miejsce katalityczne, wtedy mamy do czynienia z regulacją allosteryczną). Przykładem opisanej sytuacji jest działanie strychniny będącej allosterycznym inhibitorem receptorów glicynowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Wiąże się ona z alternatywnym miejscem wiązania glicyny redukując powinowactwo receptora do cząsteczki efektorowej.<sup>280</sup> W przypadku inhibicji współzawodniczącej  $V_{max}$  nie ulega zmianie natomiast obserwowalna stała Michaelisa,  $K_M^{app}$  ma wyższą wartość co jest związane ze słabszym wiązaniem substratu przez enzym. Efekt inhibitorowy może zostać zredukowany przez zwiększenie stężenia substratu w środowisku przez co będzie on skuteczniej konkurował z inhibitorem o dostęp do enzymu. W przybliżeniu M-M kinetyka inhibicji może zostać opisana następującym równaniem:<sup>1</sup>

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M^{app} + [S]} \quad \text{Rów. 1.12, gdzie } K_M^{app} = K_M(1 + [I]/K_I)$$

#### 1.4.5.7.1.2. Inhibicja niewspółzawodnicząca

W odróżnieniu od inhibicji współzawodniczącej wiązanie inhibitora zachodzi w innym miejscu niż centrum katalityczne i nie jest ono zależne od interakcji enzymu z substratem. Inhibitor może być wiązany zarówno przez enzym  $E$ , kompleks  $ES$  lub obydwie formy. Z punktu widzenia kinetyki prowadzi to do obniżenia wartości  $V_{\max}$  ale ponieważ wiązanie substratu nie ulega zmianie to wartość  $K_M$  nie zmienia się. Makroskopowy efekt inhibicji współzawodniczącej to zmniejszenie stężenia aktywnego katalitycznie enzymu, które nie może zostać zniwelowane przez zwiększenie stężenia substratu. W przybliżeniu M-M kinetyka inhibicji niewspółzawodniczącej jest opisana następującym równaniem:<sup>281</sup>

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{Rów. 1.13}$$

Pomimo, że wszystkie inhibitory niewspółzawodniczące wiążą się z białkiem w miejscu allosterycznym to nie wszystkie inhibitory wiążące się w tym miejscu są niewspółzawodniczące. W ogólności inhibitory allosteryczne mogą mieć dowolny charakter (współzawodniczący, niewspółzawodniczący, anty-współzawodniczący oraz mieszany).

#### 1.4.5.7.1.3. Inhibicja mieszana

Ten typ inhibicji ma wpływ zarówno na wiązanie substratu ( $K_M$ ) jak i szybkość reakcji ( $V_{\max}$ ). Inhibitor może wiązać się zarówno do formy *apo* jak i kompleksu  $ES$  jednakże jego powinowactwo do tych form jest odmienne. W opisie ilościowym tego zjawiska wyróżnia się dwie stałe dysocjacji  $K_I$  oraz  $K_I'$  opisujące odpowiednio rozpad kompleksów  $EI$  oraz  $EIS$ . Wielu autorów uważa, że w istocie inhibicja mieszana jest procesem ogólnym natomiast klasycznie rozumiana inhibicja niewspółzawodnicząca jest tylko specjalnym przypadkiem tego procesu gdzie  $K_I = K_I'$ .<sup>281</sup>

#### 1.4.5.7.1.4. Inhibicja anty-współzawodnicząca

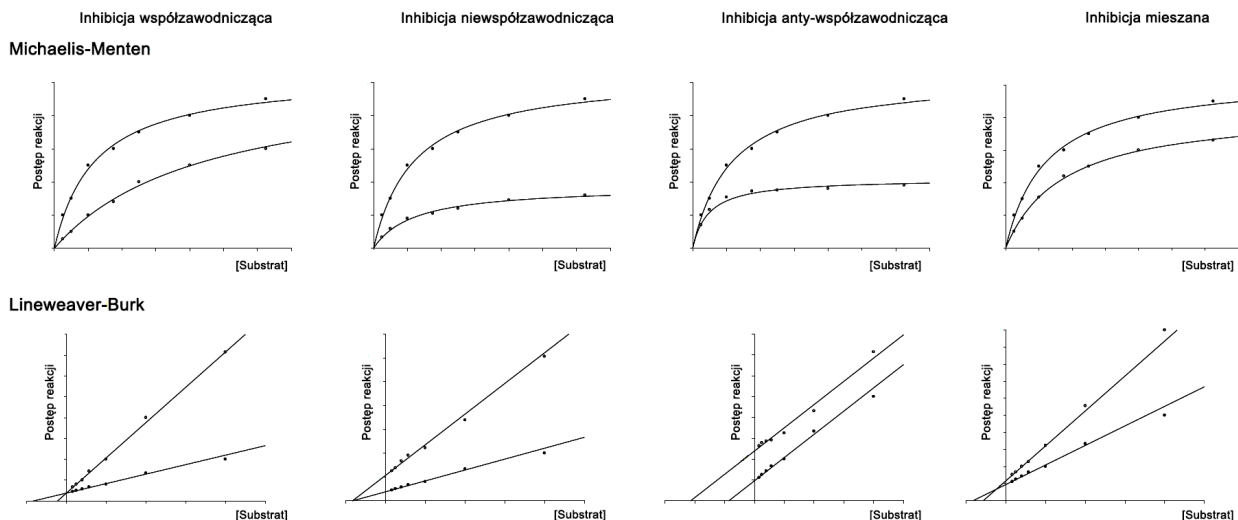
Inhibitory anty-współzawodniczące (ang. *uncompetitive inhibitors*) wykazują powinowactwo jedynie do kompleksu  $ES$  i nie wiążą się z wolnym enzymem. Działanie takich związków prowadzi do spadku wartości  $V_{\max}$ . Zmniejszenie stężenia aktywnych kompleksów  $ES$  w układzie prowadzi do spadku obserwowalnej wartości  $K_M$ . Równanie kinetyczne dla tej inhibicji ma następującą postać:<sup>281</sup>

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_M}{[S]} + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{Rów. 1.14}$$

#### 1.4.5.7.1.5. Przypadki specjalne

Mechanizm częściowej inhibicji współzawodniczej jest podobny do inhibicji niewspółzawodniczącej. Jednakże w opisywanym przypadku kompleks  $EIS$  wykazuje aktywność katalityczną, która może być nawet wyższa niż wolnego kompleksu  $ES$ . Kinetyka takiej inhibicji charakteryzuje się niższą wartością  $V_{\max}$  i niezaburzoną wartością  $K_M$ .<sup>282</sup> Innym ciekawym mechanizmem jest inhibicja substratem i produktem (ang. *substrate and product inhibition*) zachodząca gdy zarówno substrat jak i produkt mogą hamować aktywność enzymu. Taka inhibicja może przebiegać według różnych mechanizmów i zazwyczaj jest ona związana z występowaniem dodatkowego miejsca wiązania substratu o mniejszym powinowactwie. Przy niskim stężeniu substratu jedynie pierwsze miejsce jest aktywne i obserwuje się klasyczną kinetykę enzymatyczną. Jednakże gdy stężenie substratu jest większe to drugie miejsce wiązania substratu jest stopniowo wysycane obniżając aktywność enzymu.<sup>283</sup> W innym poznanym mechanizmie inhibicji dochodzi do izomeryzacji początkowo powstałego „otwartego” kompleksu  $EI$  do „zamkniętego” kompleksu  $EI^*$  jednakże proces ten jest odwracalny. Z punktu widzenia kinetyki obserwuje się stopniowo narastający efekt inhibitorowy a przybliżenie M-M prowadzi do nieprawidłowej wartości  $K_p$ , (w opisywanym modelu  $K_I$  ewoluuje w czasie podczas gdy w modelu M-M jest ona parametrem niezależnym

od czasu). Dopiero bardziej złożone pomiary stałych szybkości reakcji pozwalają na wyznaczenie prawdziwej wartości  $K_i$ .<sup>284</sup>



**Rys. 1.25.** Wpływ typu inhibicji na postęp reakcji enzymatycznej na wykresach Michaelisa-Menten oraz Lineweavera-Burka. Zaczerpnięto i zmodyfikowano z *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism*, Humana Press, 2014.

#### 1.4.5.7.2. Inhibicja nieodwracalna

Inhibitory nieodwracalne zwykle tworzą wiązania kowalencyjne z cząsteczką enzymu co trwale zaburza działanie cząsteczki prowadząc do powstania nieaktywnych kompleksów *EI* lub *EIS*. Do dobrze opisanych inhibitorów nieodwracalnych można zaliczyć iperyty azotowe, aromatyczne związki sulfonowe oraz fluorofosforany. Grupy elektrofilowe w tych związkach reagują z resztami aminokwasowymi takimi jak Ser, Tyr i Thr tworząc kowalencyjne addukty. W większości przypadków inhibitory nieodwracalne mają powinowactwo jedynie do określonej kategorii enzymów oraz są specyficznie związane przez dany fragment powierzchni białka.<sup>1</sup>

Ważną grupą inhibitorów nieodwracalnych są inhibitory samobójcze (ang. *suicide inhibitors*), które są analogami substratów rozpoznawanymi przez centrum katalityczne enzymu. Po ich związaniu enzym rozpoczyna proces katalityczny jednakże w czasie jego przebiegu inhibitor tworzy wiązanie kowalencyjne z białkiem, które ulega inaktywacji. W większości przypadków dochodzi do tego gdyż na jednym z pierwszych etapów reakcji enzymatycznej w cząsteczce inhibitora powstaje wysoce reaktywna grupa, która była wcześniej zamaskowana (np. grupą acetylową) tak aby sam inhibitor nie był reaktywny i mógł być specyficznie związany przez docelowy enzym. Takie inhibitory znalazły duże zastosowanie w farmakologii, przykładowo aspiryna, penicylina, 5-fluorouracyl czy też allopurynol są lekami działającymi na zasadzie inhibicji samobójczej.<sup>1, 285</sup>

Warto nadmienić, że nie wszystkie nieodwracalne inhibitory tworzą wiązania kowalencyjne z enzymem. Niektóre inhibitory wiążą się niekowalencyjnie tworząc bardzo stabilny kompleks *EI* blokując prawie całkowicie aktywność enzymu, czego przykładem może być metotreksat.<sup>286</sup>

#### 1.4.5.7.3. Metody poszukiwania nowych inhibitorów

Powszechnie stosowane podejścia opierają się zazwyczaj na wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych.<sup>287, 288</sup> Metody te opierają się na automatyzacji i rygorystycznym stosowaniu protokołów doświadczalnych, co pozwala na sprawne przeszukiwanie dużych bibliotek (nawet powyżej  $10^6$  związków). Automatyzacja analizy uzyskiwanych danych biochemicznych oraz ich następcza analiza statystyczna pozwala na prowadzenie takich badań relatywnie niewielkim nakładem pracy ludzkiej co znacznie usprawniło proces odkrywania nowych związków o aktywności biologicznej.<sup>289, 290</sup>

Jednakże częstym problemem są wyniki fałszywie negatywne, czego powodem jest słabe wiązanie testowanego związku do dominującej konformacji białka.<sup>291</sup> Badania strukturalne z wykorzystaniem NMR i krystalografii

rentgenowskiej mogą pokonać te ograniczenia jednakże z uwagi na koszty i ograniczenia czasowe nie są dobrze dostosowane do badań wysokoprzepustowych.<sup>242, 292</sup> Z tego powodu pojawiło się także dużo metod teoretycznych wykrywania centrów allosterycznych.<sup>293-295</sup> Ponadto z uwagi na duże znaczenie allosterii w projektowaniu nowych leków jest duże zapotrzebowanie na metody pozwalające na poszukiwanie ukrytych centrów allosterycznych w białkach (miejsca wiązania ligandu, które nie są widoczne w strukturze krystalograficznej białka, dostępne dla liganda jedynie gdy białko podlega fluktuacjom enzymatycznym w roztworze).<sup>296</sup> Do wykrywania takich centrów zaadaptowano szereg metod teoretycznych. Są one jednak stosowalne głównie do małych białek i krótkich skal czasowych symulacji co stanowi ich główne ograniczenie. Jedną z niedawnych prac pokazała, że połączenie metod teoretycznych (modele Markova) i eksperymentalnych (ukierunkowana mutageniza i pomiary kinetyczne) może dać dobre efekty w odkrywaniu nowych miejsc allosterycznych.<sup>297</sup>

## 1.5 Struktura kapu i jej rola w komórce

### 1.5.1 Budowa i właściwości

#### 1.5.1.1. Struktura i właściwości spektralne

Kap jest specyficznym zmodyfikowanym nukleotydem występującym na końcu 5' transkryptów syntezowanych przez polimerazę II RNA (mRNA oraz kilka typów niekodujących RNA). Struktura ta jest typowa dla organizmów eukariotycznych i niektórych wirusów, nie ma informacji na temat jej obecności w komórkach bakterii i archeonów.<sup>1</sup> Jednakże ostatnie doniesienie literaturowe wskazuje, że niektóre mRNA bakteryjne posiadają swoim końcu 5' resztę NAD, działającą jako funkcjonalny analog kapu chroniący mRNA przed degradacją.<sup>298</sup>

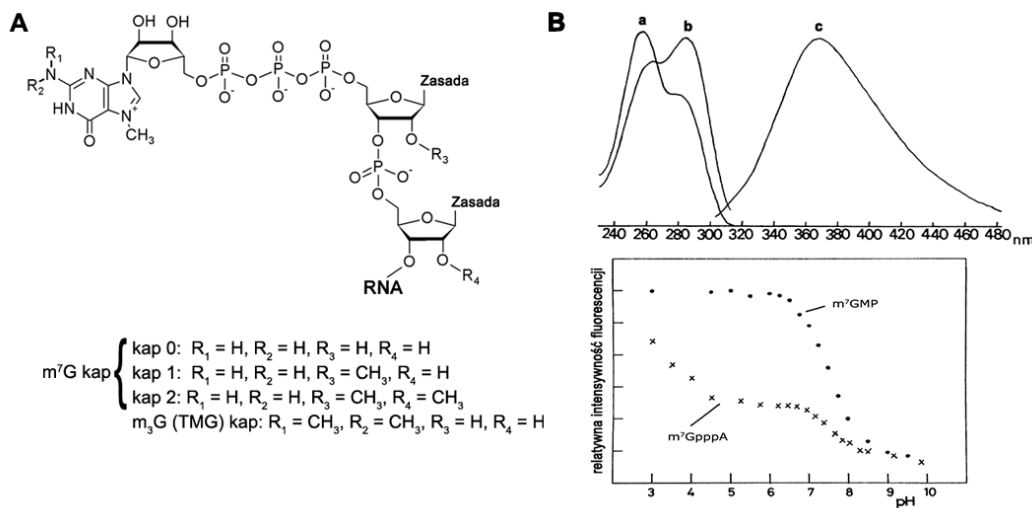
Kap zawiera specyficzny nukleotyd, 7-metyloguanozynę dołączoną do mRNA za pomocą mostka 5'-5' trifosforanowego (**Rys. 1.26**). Modyfikacja ta jest wymagana do oddziaływań kapu z jego białkowymi celami molekularnymi w komórce. Taka podstawowa struktura kapu, nazywana kapem 0 (albo MMG, monometylowany kap) jest typowa dla niższych eukariotów natomiast bardziej złożone organizmy posiadają dodatkową modyfikację pod postacią metylacji grupy 2' hydroksylowej w pierścieniach rybozy jednego lub dwóch pierwszych transkrybowanych nukleotydów (nazywane odpowiednio kapem 1 i kapem 2).<sup>1</sup>

Wprowadzenie 7-metyloguanozyny ma istotny wpływ na właściwości spektralne nukleotydu. Związek ten posiada dwa maksima absorpcji przy 257 nm i przy 280 nm. Jeśli cząsteczka jest zdeprotonowana w alkalicznym pH to obserwuje się niższą wartość absorbancji przy 257 nm natomiast wyższą przy 280 nm względem widma wykonanego w pH obojętnym (**Rys. 1.26**). Z kolei w bardzo zasadowym środowisku dochodzi do otwarcia pierścienia purynowego na skutek ataku nukleofilowego jonu hydroksylowego, czego efektem jest powstanie intensywnego piku przy 265 nm. Po wzbudzeniu falą o długości 280 nm m<sup>7</sup>G wykazuje fluorescencję z maksimum przy 370 nm. Po deprotonacji intensywność tego piku maleje, pojawia się za to kolejny pik o niskiej intensywności przy 400 nm. Z powodu rozpadu pierścienia aromatycznego w alkalicznych roztworach nie obserwuje się widma emisyjnego. Mononukleotydy zawierające m<sup>7</sup>G posiadają bardzo podobne widma, natomiast dinukleotydy takie jak m<sup>7</sup>GpppG mają widmo o zbliżonej strukturze. Jednakże z powodu oddziaływań warstwowych pomiędzy obydwooma układami aromatycznymi intensywność maksimów jest znacznie niższa.<sup>299</sup> W przypadku widma emisyjnego m<sup>7</sup>G obserwuje się taką samą zależność od pH jak w przypadku widma absorpcyjnego (fluorescencja m<sup>7</sup>G jest związana ze stanem podstawowym) dlatego też możliwe jest wyznaczenie pK<sub>a</sub> dla protonu przy azocie N1 przez pomiar zmian fluorescencji w funkcji pH zaniedbując udział stanu wzbudzonego. Wyznaczone na tej podstawie wartości pK<sub>a</sub> mogą zostać uszeregowane w następującym szeregu, zaczynając od najmniejszej: m<sup>7</sup>G > m<sup>7</sup>Gp > m<sup>7</sup>Gpp > m<sup>7</sup>Gppp > m<sup>7</sup>GpppN. Wartość pK<sub>a</sub> dobrze koreluje z ilością ujemnych ładunków w cząsteczce oraz są zgodne z wynikami uzyskanymi przy użyciu spektroskopii absorpcyjnej.<sup>299-301</sup>

Ogrzewanie wodnego roztworu zawierającego analogi kapu w zakresie 20-60 °C w pH neutralnym nie powoduje znacznych zmian w widmie emisyjnym. Jednakże podczas takiego samego ogrzewania w pH 4,5 intensywność widma się zwiększa co jest spowodowane rozpadem oddziaływań warstwowych na skutek podwyższonej temperatury, przez co intensywność emisji rośnie. W pH neutralnym efekt ten jest kompensowany przez

deprotonację prowadzącą do spadku intensywności widma. Badano także efekt różnych wartości pH na równowagę konformacyjną m<sup>7</sup>GpppA i wykazano, że obniżenie pH z 3,0 do 4,5 powoduje ciągły przyrost intensywności fluorescencji co przypisywane jest uprotonowaniem pierścienia adenozy w m<sup>7</sup>GpppA prowadzące ostatecznie do całkowitego zaniku oddziaływań warstwowych (czego powodem jest elektrostatyczne odpychanie się obydwu dodatnio naładowanych pierścieni). Dokładne pomiary wykazały, że w pH 4,5 około 70% cząsteczek m<sup>7</sup>GpppA występuje w formie warstwowej. Natomiast zwiększenie wartości pH z 7,0 do 9,0 także prowadzi do przyrostu fluorescencji na skutek rozpadu oddziaływań warstwowych.<sup>299, 302</sup>

Gdy liczba atomów fosforu w analogu kapu jest zredukowana z trzech do dwóch (związki takie jak m<sup>7</sup>GppG) to cała struktura staje się bardziej usztywniona i konformacja warstwowa jest preferowana. Innym powodem dla zwiększenia preferencji formy warstwowej jest zastąpienie adenozy przez guanozynę lub 2'-O-metylourydyne. Ponadto udział poszczególnych konformacji może być zależny od zmiany efektywnego pK<sub>a</sub> dla m<sup>7</sup>G, co ma przykładowo miejsce podczas interakcji z białkami wiążącymi kap.<sup>302</sup>



**Rys. 1.26.** Struktura kapu oraz jego właściwości spektralne. **(A)** Typowe struktury MMG oraz TMG kapu. **(B)** Właściwości m<sup>7</sup>Guo spektralne w zakresie UV-VIS. Na lewo: widmo absorpcji (a), widmo wzbudzenia (b) oraz widmo emisji (c). Na prawo: względna intensywność fluorescencji dla m<sup>7</sup>GMP oraz m<sup>7</sup>GpppA w funkcji pH. Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nucleic Acids Research*, 1980, 8, 1107-1119 oraz *Future Medicinal Chemistry*, 2013, 5, 1141-1172.

### 1.5.1.2. Białka wiążące kap

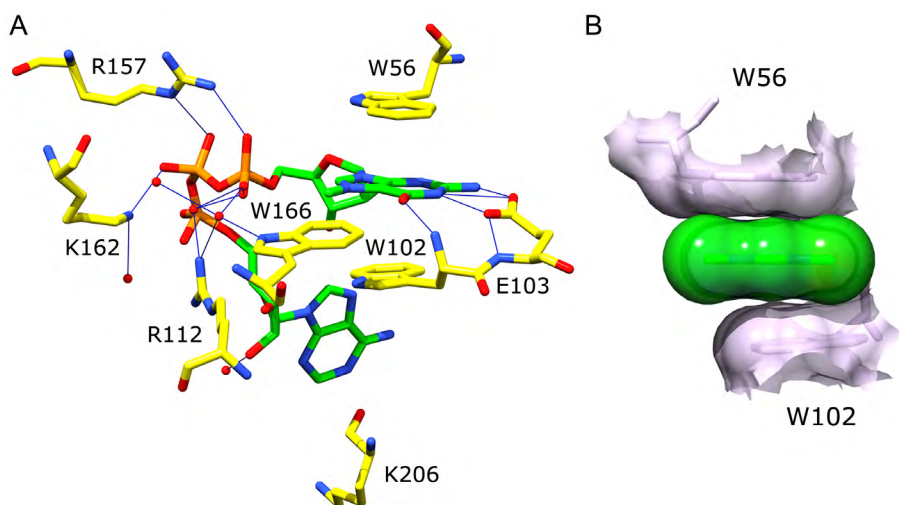
Do tej pory opisano szereg eukariotycznych oraz wirusowych białek wiążących strukturę kapu, dzięki badaniom strukturalnym uzyskano wiele informacji na temat wiązania kapu.<sup>303</sup> Trzy eukariotyczne białka wiążące kap zostały szczególnie dobrze poznane: CBC (ang. *Cap Binding Complex*), eIF4E oraz DcpS (ang. *Scavenger decapping enzyme*). CBC jest zbudowanym z dwóch podjednostek (wiążące kap CBC20 oraz CBC80, będące białkiem pomocniczym) kompleksem białkowym ulokowanym w jądrze komórkowym odpowiedzialnym za wiązanie pre-mRNA podczas kolejnych etapów jego dojrzewania.<sup>304</sup> Białko eIF4E odpowiada za inicjację translacji i jest ono zasocjowane z kilkoma innymi białkami tworząc kompleks eIF4F ułatwiający wiązanie się mRNA z rybosomem i inicjację translacji.<sup>305</sup> Natomiast białko DcpS jest odpowiedzialne m.in. za usuwanie kapu z krótkich oligonukleotydów, będących pozostałościami po degradacji transkryptów mRNA w ścieżce 3'-5' (patrz rozdział 1.5.3. *Regulacja stabilności mRNA w komórkach eukariotycznych*).<sup>306</sup>

Dobrym przykładem wirusowego białka oddziałującego z kapem jest VP39 z wirusa *Vaccinia*, zdolne do rozpoznania swojego własnego kapowanego mRNA. Po związaniu się do kapu, enzym ten wykazuje aktywność 2'-O-metylotransferazy wprowadzając metylację w grupie 2' hydroksylowej rybozy pierwszego transkrybowanego nukleotydu.<sup>307</sup>



### 1.5.1.3. Mechanizm wiązania kapu

Istotnym pytaniem jest to w jaki sposób białka wiążące kap są w stanie dokonać rozróżnienia pomiędzy kapowanym transkryptami a cząsteczkami RNA pozbawionymi tej struktury. Badania krystalograficzne nad kompleksami analogów kapu ( $m^7GDP$ ,  $m^7GpppG$  i  $m^7GpppA$ ) i dwóch białek wiążących kap, eIF-4E oraz VP39 pomogły znaleźć odpowiedź na to pytanie (**Rys. 1.27**).<sup>308-311</sup> Mimo, że białka te nie są spokrewnione ewolucyjnie to z uwagi na obecność podobnych reszt aromatycznych w centrach wiążących kap pojawiły się sugestie o zajściu pomiędzy nimi ewolucji konwergentnej (zachodzącej pomiędzy niespokrewnionymi filogenetycznie organizmami). Ponadto struktury krystalograficzne kompleksu  $m^7GpppG$  z CBC oraz innymi białkami wykazały podobną budowę miejsca wiążącego co stanowiło dodatkowe wsparcie dla hipotezy ewolucji konwergentnej.<sup>303, 304, 312, 313</sup>



**Rys. 1.27.** Wiązanie kapu przez eIF4E (nr PDB: 1IPC). (A) Oddziaływania pomiędzy strukturą kapu a resztami aminokwasowymi w eIF4E. Specyficzność dla reszty 7-metyloguanozyny jest uzyskiwana głównie przez tworzenie się kompleksu kation- $\pi$  na skutek oddziaływań warstwowych z zachowawczymi ewolucyjnie resztami W56 oraz W102 a także wiązaniami wodorowymi (jedno dla W102 z atomem O6  $m^7Gu$  oraz dwa dla atomu N2  $m^7Guo$  z grupą karbonylową E103). (B) Oddziaływania warstwowe pomiędzy resztą  $m^7Guo$  oraz resztami W56 oraz W102. Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Future Medicinal Chemistry*, 2013, 5, 1141-1172.

Jednak pomimo pozornie zbliżonej struktury miejsca wiążącego z kapem, zaobserwowano zauważalne różnice, wynikłe z odrębnych ścieżek ewolucyjnych organizmów, w których białka te występują. Poza obecnością dwóch reszt aromatycznych, w kieszeni wiążącej znajdują się także reszty kwasowe neutralizujące dodatni ładunek ulokowany w pierścieniu  $m^7Guo$  oraz reszty zasadowe neutralizujące ujemny ładunek łańcucha fosforanowego. Na podstawie zdobytych danych strukturalnych można wyróżnić pięć elementów składowych mających wpływ na wiązanie kap-białko. Pierwszą są silne interakcje warstwowe zachodzące pomiędzy  $m^7Guo$  a dwoma resztami aromatycznymi, których istnienie zostało wcześniej zasugerowane z danych spektroskopowych oraz obliczeń teoretycznych.<sup>301,302</sup> Wzajemne położenie aromatycznej zasady w kapie oraz reszt aminokwasowych białka zapewnia optymalny dystans pomiędzy płaszczyznami pierścieni. Dodatkowa delokalizacja ładunku dodatniego wywołana przez grupę metylową w  $m^7Guo$  znacząco wzmacniającą energię oddziaływania. Wykazano, że różnica pomiędzy powinowactwem nukleotydów z 7-metyloguanozyną a guanozyną jest około 100 razy większa. Wprowadzenie na drodze mutacji reszt Arg lub Lys w miejsce reszt aromatycznych zaburza tworzenie się oddziaływań warstwowych przez co powinowactwo i selektywność względem struktury kapu gwałtownie spada.<sup>311</sup> Drugim istotnym wkładem do wiązania jest obecność zdelokalizowanego ładunku dodatniego w pierścieniu purynowym  $m^7G$ . Uważa się, że ułatwia on tworzenie się oddziaływań jonowych i wiązań wodorowych pomiędzy atomami N1 i N2 reszty  $m^7G$  a grupami karboksylowymi reszt asparaginy i glutaminianu w miejscu wiążącym kap.<sup>308</sup> Kieszeń ta w każdym przypadku posiada co najmniej jedną resztę kwasową a mutacje w tych resztach obniżają znacznie powinowactwo do struktury kapu. Obserwuje się także obecność dodatkowych interakcji pomiędzy atomami O6, N1 oraz N2 reszty  $m^7G$  a innymi resztami aminokwasowymi w miejscu wiązania. Trzecim elementem jest wiązanie mostka

trifosforanowego w kieszeni wiążącej poprzez powstawanie oddziaływań jonowych przez posiadające ładunek ujemny atomy tlenu grup fosforanowych z dodatnio naładowanymi zasadowymi resztami aminokwasowymi oraz obecnymi cząsteczkami wody.<sup>303</sup> Kolektywny wkład relatywnie słabych oddziaływań takich jak siły van der Waalsa stabilizujących grupę metylową m<sup>7</sup>G także ma znaczenie przy wiązaniu z białkiem. W przypadku eIF4E aminokwasem biorącym udział w tych oddziaływaniach jest W166<sup>314</sup> jednakże dla CBC20 nie stwierdzono takiego wkładu w energię stabilizacji. Ostatnim elementem są niespecyficzne interakcje z drugą zasadą azotową, co w przypadku niektórych białek pozwala na lepsze dopasowanie się nukleotydu do miejsca wiązania (dla eIF4E obserwuje się jednak destabilizację kompleksu przez obecność drugiej zasady).<sup>303</sup>

## 1.5.2. Biosynteza i rola w komórce

### 1.5.2.1. Biosynteza

Synteza kapu odbywa się kotranskrypcyjnie, zwykle jest on dodawany do syntezowanego łańcucha RNA podczas pierwszych etapów transkrypcji, niezależnie czy jest to mRNA czy inny typ RNA. Proces biosyntezy składa się z kilku zachodzących po sobie reakcji opisanych na **Rys. 1.28A**. W przypadku wyższych eukariontów można odnotować obecność dodatkowych modyfikacji pod postacią metylacji grup 2'hydroksylowych w pierwszym lub dwóch pierwszych transkrybowanych nukleotydach. Obecność tych dodatkowych grup metylowych przyczynia się do zwiększonej efektywności translacji mRNA podczas dojrzewania oocytów<sup>315</sup> oraz może ułatwiać splicing snRNA.<sup>316</sup> Ponadto szereg nowszych prac wskazuje na udział 2'-O metylacji w rozpoznaniu mRNA gospodarza przez układ odpornościowy i rozróżnienia ich od wirusowych mRNA w przypadku infekcji.<sup>317, 318</sup>

W komórkach wyższych eukariontów kap niektórych snRNA jest rozpoznawany jako znacznik kierujący do cytoplazmy gdzie powstają cząsteczki snRNP, zdolne do przeprowadzenia procesu splicingu (**Rys. 1.28B**).<sup>319, 320</sup> W cytoplazmie ma także miejsce podwójna metylacja w pozycji N2 m<sup>7</sup>Guo, w rezultacie czego powstaje 2,2,7-trimetylokap (TMG kap). Zmodyfikowane w ten sposób cząsteczki snRNP są następnie ponownie transportowane do jądra. Niektóre typy snRNP są w całości składane w jądrze i nie zachodzi konieczność ich transportu przez błonę jądrową.

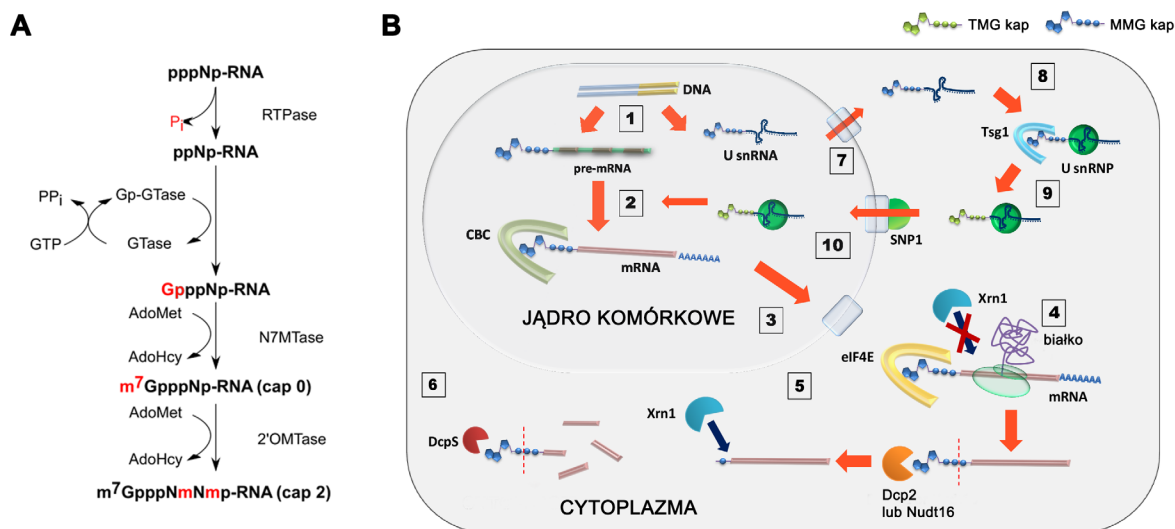
### 1.5.2.2. Splicing i transport mRNA do cytoplazmy

Przed eksportem do cytoplazmy pre-mRNA poddawany jest w jądrze kilkietapowej obróbce nazywanej dojrzewaniem mRNA. Obejmuje ono głównie wycinanie intronów oraz poliadenylację na końcu 3'. W procesy te zaangażowany jest kompleks CBC chroniący mRNA przed degradacją enzymatyczną od końca 5'. Ponadto pośredniczy m.in. w oddziaływaniu z U1 snRNP, umożliwiając prawidłowe rozpoznanie najbliższego końca 5' miejsca złączenia ekson-intron istotnie zwiększając wydajność i dokładność wycinania pierwszego intronu. Uważa się, że CBC bierze udział w endonukleolitycznym rozcięciu mRNA poprzedzającym poliadenylację. Kompleks CBC pozostaje związany z mRNA podczas jego eksportu do cytoplazmy gdzie jest usuwany z końca 5' mRNA i zastępowany przez czynnik inicjacji translacji eIF4E. CBC prawdopodobnie odgrywa również rolę czynnika translacyjnego w pierwszej rundzie translacji (ang. *pioneer round*), która ma na celu wyeliminowanie z puli translacyjnej mRNA zawierających przedwczesne kodony stop. Dokładny przebieg tego procesu nie został opisany, nie ustalono także czy przebiega on w cytoplazmie czy jądrze komórkowym.<sup>321</sup>

### 1.5.2.3. Inicjacja translacji

Synteza białka jest najbardziej kosztownym energetycznie procesem zachodzącym w komórce i ma znaczącą rolę w regulacji ekspresji genu. Dlatego też musi ona podlegać precyzyjnej kontroli.<sup>322, 323</sup> W komórkach eukariotycznych istnieją dwa mechanizmy translacji. Najważniejszy z nich jest zależny od rozpoznania 5' mRNA kapu będącej sygnałem dla inicjacji translacji. Mechanizmy niezależne od kapu takie jak translacja zależna od IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*) występują znacznie rzadziej i są mniej efektywne.<sup>324</sup> W dalszej części zostanie zarysowany proces zależny od kapu inicjacji translacji.

Translacja zachodzi w czterech fazach: inicjacji (składanie maszyny translacyjnej, pozycjonowanie rybosomu względem mRNA), elongacji (biosynteza łańcucha polipeptydowego), terminacji (uwolnienie łańcucha polipeptydowego z rybosomu) oraz recyklingu rybosomu (dysocjacja podjednostek oraz białkowych komponentów maszyny translacyjnej). Inicjacja translacji jest etapem limitującym, gdzie aktywnych jest najwięcej mechanizmów regulujących syntezę białka. Większość z nich jest aktywna na początkowym etapie składania kompleksu preinicjującego translację. Powstający wtedy kompleks 43S składa się z podjednostki 40S rybosomu oraz szeregu białek regulatorowych. Jego przyłączenie do mRNA jest ułatwiane przez kompleks eIF4F, złożony z białka wiążącego kap eIF4E, białka budującego rusztowanie kompleksu (eIF4G) oraz helikazy RNA eIF4A. Dzięki wiązaniu kapu przez eIF4E cały kompleks inicjujący translację wiąże mRNA tworząc kompleks 48S. Ponadto, eIF4G wiąże się z białkiem PABP prowadząc do cyrkularyzacji mRNA, stabilizując je i zwiększając efektywność translacji. Dołączenie dodatkowych białek oraz podjednostki 60S rybosomu skutkuje powstaniem funkcjonalnej maszyny translacyjnej i rozpoczęciem syntezy łańcucha polipeptydowego.<sup>323</sup>



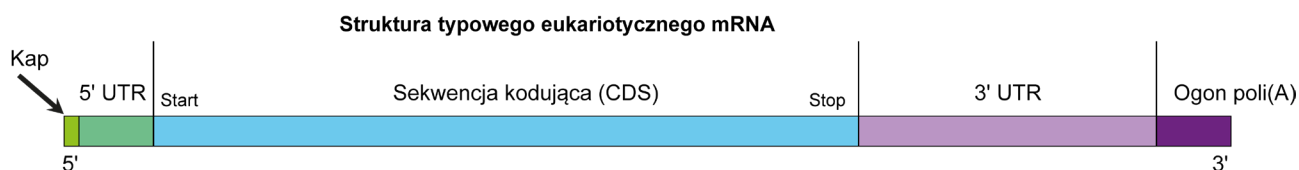
**Rys. 1.28. (A)** Biosynteza kanonicznej struktury kapu. MMG kap 0 powstaje ko-transkrypcyjnie na skutek sekwencyjnego działania trzech enzymów. W pierwszym etapie RTPaza hydrolizuje terminalną grupę fosforanową na 5' końcu RNA (pppNp-RNA) co prowadzi do powstania difosforanu RNA oraz nieorganicznego fosforanu (V). Następny etap polega na reakcji GTPazy z GTP, gdzie uwolniony zostaje pirofosforan a powstaje GMP kowalencyjnie związany z enzymem (Gp-GTPaza). Wtedy dochodzi do transferu GMP na difosforan RNA prowadząc do powstania GpppNp-RNA. W trzecim etapie dochodzi do metylacji terminalnej guanozyny w RNA (donorem grupy metylowej jest *S*-adenozyl-L-metionina) skutkującej powstaniem struktury kapu 0 ( $m^7GpppNp$ -RNA) i uwolnieniem *S*-adenozyl-L-homocysteiny. U wyższych eukariontów dodatkowym etapem jest wprowadzenie grupy metylowej do grup 2' OH rybozy w pierwszych (jednym lub dwóch) transkrybowanych nukleotydach co jest katalizowane przez AdoMet-zależną (nukleozydo-2'-*O*)-metylotransferazę co prowadzi do powstania struktur kapu 1 lub kapu 2 (odpowiednio  $m^7GpppN_mMp$ -RNA oraz  $m^7GpppN_mN_p$ -RNA). **(B)** Udział MMG oraz TMG kapu w procesach komórkowych. **(1)** Transkrypcja DNA w trakcie której zachodzi synteza kapu. **(2)** Dojrzwienie pre-mRNA gdzie kap jest rozpoznawany przez kompleks CBC co umożliwia jego splicing i eksport do cytoplazmy. **(3)** Eksport mRNA do cytoplazmy przez kompleks NPC (ang. *Nuclear pore complex*). **(4)** Translacja mRNA gdzie synteza łańcucha polipeptydowego jest inicjowana przez oddziaływanie pomiędzy kapem a czynnikiem inicjującym translację eIF4E co pozwala na utworzenie funkcjonalnego kompleksu translacyjnego. **(5)** Degradacja 5'-3' jest inicjowana przez usunięcie kapu, co jest z kolei prowadzone przez co najmniej dwa różne enzymy: Dcp2 lub Nudt16. **(6)** Aktywność egzozomu w ścieżce degradacji 3'-5' prowadzić może do powstania krótkich kapowanych oligonukleotydów, które są toksyczne dla komórki (inhibitory maszyny translacyjnej), dlatego też aktywność białka DcpS pozwala na usuwanie z nich struktury kapu. **(7)** Eksport do cytoplazmy niedojrzałych U snRNA zawierających MMG kap zachodzący przez kompleks NPC. **(8)** Dojrzwienie w cytoplazmie U snRNA gdzie dołącza się do nich kompleks SM prowadząc do powstania U snRNP. **(9)** Hipermetylacja kapu U snRNA przez enzym Tsg1 prowadzi do powstania TMG kapu. **(10)** Import dojrzałych snRNP do jądra komórkowego podczas którego TMG kap jest specyficznie rozpoznawany przez snurportynę 1 (SNRNP1) co umożliwia jego wejście do jądra komórkowego.

#### 1.5.2.4. Ochrona mRNA przed degradacją

Z uwagi na powszechną obecność egzonukleaz w komórkach jak i w przestrzeni międzykomórkowej mRNA pozbawione struktur kapu oraz ogona poli(A) ulega szybkiej degradacji. Mechanizmy degradacji mRNA oraz białka zaangażowane w ten proces zostaną dokładnie omówione w następnych rozdziałach.

### 1.5.3. Regulacja stabilności mRNA w komórkach eukariotycznych

#### 1.5.3.1. Budowa eukariotycznego mRNA



**Rys. 1.29.** Budowa eukariotycznego mRNA z naniesionymi typowymi elementami strukturalnymi. Zaczernięte i zmodyfikowane z WikiCommons.

##### 1.5.3.1.1. Sekwencja 5' UTR

Region 5' UTR (ang. *5' Untranslated region*) jest ulokowany na 5' końcu mRNA przed kodonem start sekwencji kodującej a jego długość może wynosić od ~100 nt do kilku tysięcy nt.<sup>3</sup> Pełni on istotne funkcje regulatorowe zarówno podczas translacji jak i transkrypcji oraz transportu mRNA do cytoplazmy.<sup>3, 325</sup> Jednym z często obserwowalnych elementów regulatorowych w 5' UTR są uORF (ang. *Upstream Open Reading Frame*), które mogą mieć hamujący wpływ na inicjację translacji z właściwej ORF w sekwencji kodującej.<sup>326</sup>

##### 1.5.3.1.2. Sekwencja kodująca

Jest to fragment mRNA zawierający informację na temat sekwencji aminokwasowej białka mającego powstać w wyniku translacji mRNA. Transkrypty organizmów eukariotycznych są w zdecydowanej większości monocystronowe (tzn. posiadają tylko jedną ORF i powstaje z nich jeden polipeptyd). Zasadniczo uważa się, że region ten nie posiada sekwencji regulujących stabilność mRNA w klasycznym rozumieniu tego słowa (specyficzna sekwencja mRNA regulująca poziom jego ekspresji). Jednakże w wielu przypadkach obserwuje się efekt mutacji synonimicznych (nie powodujących zmiany sekwencji aminokwasowej kodowanego polipeptydu) na szybkość translacji poszczególnych transkryptów.<sup>327</sup> Prowadzone od pewnego czasu badania z wykorzystaniem techniki profilowania rybosomów (ang. *ribosome profiling*) potwierdziły, że takie zmiany w sekwencji mogą mieć wpływ zarówno na stabilność transkryptów jak i wydajność ich translacji.<sup>328, 329</sup>

##### 1.5.3.1.3. Sekwencja 3' UTR

Region 3' UTR (ang. *3' Untranslated region*) jest ulokowany blisko końca 3' mRNA po kodonie stop w sekwencji kodującej a przed ogonem poli(A), długość tego obszaru może wynosić od 60 do 4000 nt.<sup>330</sup> Fragment ten odgrywa znaczącą rolę w regulacji ekspresji genu mając wpływ na lokalizację, eksport, stabilność oraz wydajność translacji transkryptu. Do elementów *cis*-regulatorowych tam występujących można zaliczyć sekwencje wiążące miRNA (MREs) oraz liczne miejsca wiązania białek rozpoznających mRNA.<sup>331</sup>

##### 1.5.3.1.4. Ogon poli(A)

O ile w organizmach prokariotycznych adenylacja mRNA inicjuje jego degradację to w eukariotyczne mRNA jest w ten sposób stabilizowane.<sup>332</sup> Proces poliadenylacji zachodzi w kilku etapach, najpierw kompleks CPSF dokonuje specyficznego sekwencyjnie cięcia w nowo powstałym transkrypcie<sup>333</sup> a sam proces dodawania poli(A) jest prowadzony przez grupę transferaz rybonukleotydylowych posiadających domenę nukleotydylotransferazy

typową dla  $\beta$ -polimeraz DNA.<sup>334</sup> Białka zaangażowane w ten proces są fizycznie związane z kompleksem polimerazy II RNA oraz spliceosomem.<sup>335</sup> Długość ogona poli(A) jest zależna od organizmu. Wielkoskalowe badania transkryptomu pokazały, że w przypadku niższych eukariontów, takich jak grzyby wynosi ona 20-30 nt, u roślin 50-60 nt natomiast u ssaków 60-100 nt.<sup>336</sup>

### 1.5.3.2. Ogólny zarys degradacji mRNA w komórkach eukariotycznych

Decydującą rolą mRNA jest umożliwienie syntezy białka przez maszynę translacyjną komórki, natomiast aktywność translacyjna i czas półtrwania danego mRNA może być regulowana za pomocą różnych procesów. Pomimo, że ogólny obraz regulacji stabilności mRNA jest uniwersalny dla wszystkich eukariontów to należy pamiętać o tym, że poszczególne mechanizmy degradacji mRNA oraz ich relatywny udział w całości tego procesu mogą się istotnie różnić pomiędzy organizmami. Zdecydowana część wiedzy zgromadzonej na temat mechanizmów regulacji stabilności oraz degradacji mRNA zawdzięczana jest badaniom na drożdżach, w szczególności *Saccharomyces cerevisiae*<sup>337, 338</sup> oraz komórek ssaczy i w dużej mierze te wyniki będą zaprezentowane w dalszej części rozdziału. Ścieżki degradacji u innych organizmów są gorzej poznane, jednakże przyjmuje się, że za wspomniane procesy odpowiadają homologiczne białka. Ponadto u wyższych eukariontów występuje więcej specyficznych mechanizmów regulacji stabilności mRNA opartych o elementy *cis*-regulatorowe a także RNAi. W ogólności rozkład mRNA ogólnie może zostać podzielony na dwie klasy: jądrowe mechanizmy kontroli jakości, które eliminują nieprawidłowe transkrypty, oraz cytoplazmatyczne mechanizmy wydłużające lub skracające czas półtrwania mRNA prowadzące do zmian w ilości danego białka w komórce.

Ponieważ zaburzenia w budowie mRNA mają przełożenie na syntezę nieprawidłowych białek, które często są нефункционалне a nawet toksyczne, to konieczne jest istnienie mechanizmów kontroli jakości transkryptów. Większość z nich jest zależna od pierwszej testowej rundy translacji, i pozwala na określenie czy dany transkrypt jest funkcjonalny.

Natomiast większość mechanizmów regulacji stabilności związanych jest z kontrolą okresu półtrwania prawidłowych transkryptów podlegających translacji w cytoplazmie, co może zachodzić na kilka możliwych sposobów i jest zależne zarówno od elementów *trans*-regulatorowych (białka oraz ncRNA) oraz *cis*-regulatorowych (specyficzne elementy sekwencyjne w mRNA).<sup>339</sup> Systemy te opierają się na pięciu różnych aktywnościach rybonukleolitycznych, którymi są: i) dekaping ii) 5'-3' rozkład egzonukleolityczny iii) deadenylacja iv) 3'-5' rozkład egzonukleolityczny v) deadenylacja.<sup>339</sup>

### 1.5.3.3. Główne mechanizmy degradacji cytoplazmatycznej

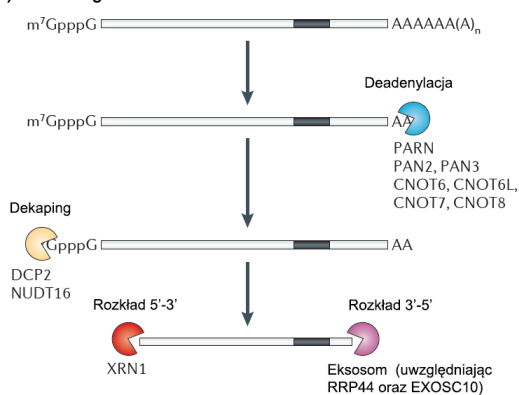
Podstawowe mechanizmy degradacji mRNA przedstawiono na **Rys. 1.30** natomiast białka biorące w nich udział w **Tab. 1.2** W większości przypadków prawidłowe transkrypty mRNA są degradowane egzonukleolitycznie od 3' lub 5' końca. Drożdże *S. cerevisiae* posiadają aktywne i wydajne ścieżki degradacji 5'-3' oraz 3'-5', które są mocno zbieżne; dopiero inaktywacja obydwu ścieżek jest letalna. W przypadku tego organizmu skrócenie ogona poli(A) jest procesem inicjującym degradację mRNA zarówno w ścieżce 5'-3' oraz 3'-5'. Znacznie skrócony poli(A) nie jest zdolny do wiązania się z PABP (ang. *Poli(A) Binding Protein*) stabilizującym mRNA. W ścieżce 5'-3' tak skrócony poli(A) wchodzi w interakcje z kompleksem Lsm1-7, który następnie rekrutuje kompleks dekapujący Dcp1/2 lub także (w przypadku wyższych eukariontów) enzym Nudt16. Deadenylacja także pełni istotną funkcję w degradacji mRNA u innych organizmów ale jej całościowy wpływ na ten proces jest ciągle przedmiotem dyskusji.<sup>337</sup>

Usunięcie kapu prowadzi do zahamowania translacji i umożliwia rozkład od 5' końca prowadzony przez egzonukleazę Xrn.<sup>340</sup> Uważa się, że rozpad mRNA w ścieżce 5'-3' zachodzi preferencyjnie na polisomach<sup>341</sup>, jednakże część badań pokazała, że nie podlegające w danej chwili translacji mRNA mogą agregować do cytoplazmatycznych granул nazwanych ciałkami P (ang. *P-bodies*, *Processing bodies*) oraz granул stresowych, gdzie mRNA są przechowywane i/lub ulegają degradacji.<sup>340, 342</sup> Wykazano, że czynniki odpowiedzialne za dekaping oraz degradację 5'-3' często są obecne w tych obiektach<sup>342, 343</sup>. Jednakże w standardowych warunkach ciałka P nie są konieczne do cytoplazmatycznej degradacji mRNA<sup>344</sup>, prawdopodobnie dlatego, że zarówno Dcp1/2 oraz Xrn1

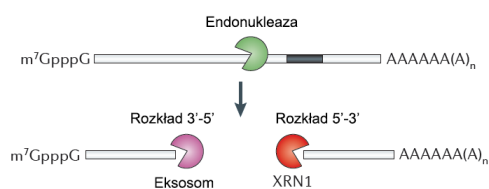
są też cały czas obecne na polisomach<sup>345</sup>. Dopiero w chwili gdy Dcp2 lub Xrn podlegają deplecji lub inaktywacji powstaje więcej ciałek P, co sugeruje, że w takiej sytuacji (zablokowanie głównej ścieżki degradacji) ma tam miejsce akumulacja transkryptów<sup>342, 343, 346</sup> (patrz także podrozdział *Budowa ciałek P i ich rola w degradacji mRNA*). Natomiast w ścieżce 3'-5' główną rolę w degradacji pełni kompleks egzozomu, zaangażowany w kontrolę jakości oraz degradację znacznej grupy cytoplazmatycznych RNA.<sup>347</sup> W drożdżach *S. cerevisiae* zbudowany jest on z dziewięciu podjednostek tworzących strukturę pierścienia oraz aktywnej egzozonukleazy Rrp44/Dis3.<sup>348</sup> Aktywność tego kompleksu prowadzi do powstania krótkiego kapowanego oligonukleotydu, będącego z kolei substratem dla enzymu dekapującego DcpS.

Przez długi czas panowały podzielone opinie na temat istotności ścieżek 3'-5' oraz 5'-3'. Pomimo, że część wcześniejszych prac zakładała, że degradacja 3'-5' ma przeważające znaczenie w przypadku ssaków<sup>349-351</sup> to do niedawna brakowało wiarygodnych danych na temat istotności tej ścieżki u wyższych eukariontów. Dlatego też wielu autorów wskazywało, że ścieżka 5'-3' ma jednak dominujące znaczenie.<sup>339, 352</sup> Dopiero kilka nowych prac wskazuje na to, że pierwotnie zarysowany obraz jest prawidłowy i degradacja od 3' końca ma duże znaczenie w obrocie mRNA (patrz rozdział *Urydylacja RNA*).

#### A) Ścieżki egzozonukleazowe



#### B) Ścieżki endonukleazowe



**Rys. 1.30.** Poglądowy schemat na podstawowe mechanizmy degradacji mRNA w komórkach eukariotycznych. **(A)** Ścieżki egzozonukleazowe. Większość RNA jest degradowana przez egzozonukleazy atakujące obydwa końce transkryptów. W wyniku skrócenia ogona poli(A) przez odpowiednie kompleksy białkowe (Pan2/3 lub Ccr4-Not, złożony z sześciu podjednostek) lub enzymem PARN. Elementem decydującym o tym, która deadenylaza będzie wybrana są białkowe składniki mRNP jednakże szczegóły tego procesu nie zostały poznane. W kolejnym kroku następuje hydroliza kapu, prowadzona przez kompleks Dcp1/2 lub białko Nudt16 i taki transkrypt jest degradowany od końca 5' (egzozonukleaza Xrn1) lub 3' końca (kompleks eksosomu). Ewentualnie, degradacja od 3' końca zachodzi z pominięciem hydrolizy kapu a powstały krótki kapowany oligonukleotyd jest substratem dla innego dekapującego enzymu, DcpS. **(B)** Ścieżki endonukleazowe. W niektórych przypadkach transkrypty mRNA są rozcinane przez endonukleazy a powstałe produkty są degradowane przez odpowiednie egzozonukleazy. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13, 246-259.

**Tab. 1.2.** Podstawowe białka zaangażowane w degradację mRNA.

Aktywność	Białko	Substrat
Dekaping (hydroliza kapu)	Dcp2 Nudt16	deadenylowany mRNA deadenylowany mRNA
Deadenylacja	Pan2 Cnot6 (Ccr4A) Cnot6L (Ccr4B) Cnot7 (Caf1A) Cnot8 (Caf1B lub Pop2) PARN	poli(A) <sup>+</sup> mRNA poli(A) <sup>+</sup> mRNA poli(A) <sup>+</sup> mRNA poli(A) <sup>+</sup> mRNA poli(A) <sup>+</sup> mRNA poli(A) <sup>+</sup> mRNA
Egzozonukleazowa 5'-3'	Xrn1	dekapowane mRNA, mRNA po cięciu endonukleolitycznym
Egzozonukleazowa 3'-5'	Dis3L (Rrp44)  Exosc (Rrp6 lub PM/Sc1-100)	deadenylowane mRNA, mRNA po cięciu endonukleolitycznym deadenylowane mRNA, mRNA po cięciu endonukleolitycznym
Endonukleazowa	Pmr1 ZC3H12A Ire1  Smg6	poli(A) <sup>+</sup> mRNA podczas translacji poli(A) <sup>+</sup> mRNA poli(A) <sup>+</sup> mRNA zasocjowane z retikulum endoplazmatycznym cele ścieżki NMD

### 1.5.3.3.1. Regulacja stabilności mRNA i metody badań

Białka oddziałujące z mRNA oraz ncRNA wpływają na szybkość rozpadu mRNA zarówno bezpośrednio (wiązanie lub blokowanie wiązania czynników inicjujących degradację) jak i pośrednio (zmiana lokalizacji komórkowej lub/i właściwości translacyjnych danego mRNA). Składniki mRNP mogą wpłynąć w rozmaity sposób na los mRNA przez odpowiedź na zmiany cyklu komórkowego lub bodźce zewnętrzne. Zmianie może ulec ilość, aktywność lub lokalizacja komórkowego danego składnika.

Oznacza to, że regulacja stabilności mRNA jest zależna od skomplikowanej sieci interakcji wewnątrz- i międzykomórkowej, której szczegóły nie zostały jeszcze zrozumiane. Obecne podejście badawcze do tego problemu wymaga identyfikacji składników mRNP (głównie za pomocą MS) oraz sekwencjonowanie związanych z nimi obszarów mRNA. Ponadto ważne jest określenie lokalizacji w komórce oraz badania funkcjonalne i strukturalne nad poszczególnymi białkami i ncRNA.<sup>339</sup>

Na podstawie zgromadzonej wiedzy uważa się, że podstawowe ścieżki degradacji konkurują z mechanizmem podtrzymującym translację o dostęp do mRNA. Etapem koniecznym do zainicjowania degradacji jest usunięcie kapu oraz ogona poli(A), które są głównymi strukturami stymulującymi proces translacji.<sup>340</sup> Przemawiają za tym następujące przesłanki. i) Inhibicja inicjacji translacji przez rozbudowane struktury 2-rzędowe w sekwencji 5' UTR, inhibitory translacji oraz mutacje w czynnikach inicjacji translacji zwiększają szybkość dekapingu oraz deadenylacji.<sup>346, 353, 354</sup> ii) Czynniki inicjacji translacji eIF4E zarówno stymuluje rozpoczęcie translacji jak i blokuje aktywność Dcp1/2.<sup>355</sup> iii) Wiele czynników regulatorowych mRNA (miRNA, białka PUF etc.) zarówno blokuje translację jak i przyspiesza dekaping oraz deadenylację.<sup>346</sup> W najprostszym modelu konkurencja pomiędzy translacją a degradacją mRNA zachodzi przez zmiany w kompleksach białkowych związanych z kapem i ogonem poli(A), mającymi wpływ na dostępność tych struktur dla białek je degradujących. Przykładowo białka wiążące się z poli(A) blokują działanie deadenylaz. W podobny sposób dynamiczne zmiany składu mRNP wiążących kap ma wpływ na jego stabilność; by usunąć kap konieczne jest wymienienie czynników stabilizujących translację na promujące degradację mRNA.

### 1.5.3.3.2. Budowa ciałek P i ich rola w degradacji mRNA

W komórce eukariotycznej niepodlegające translacji mRNA mogą akumulować się w dwóch typach granul cytoplazmatycznych: ciałkach P zbudowanych z białek promujących degradację mRNA oraz granul stresowych zawierających wiele czynników inicjujących translację (**Tab. 1.3**). Obecność czynników dekapujących w ciałkach P sugeruje, że są one miejscem gdzie mRNA mogą być transportowane i gdzie zachodzi proces hydrolizy kapu.<sup>342</sup> Mimo tego niektóre badania sugerują, że proces dekapingu może także zachodzić na polisomach.<sup>356</sup> Uważa się, że białka regulujące proces dekapingu i deadenylacji oddziałują ze sobą tworząc większe makrostruktury, które mogą (podobnie jak podczas translacji) poprzez wiązanie do obydwu końców cząsteczki mRNA wymuszać jej cyrkularyzację.<sup>340</sup> Agregacja większej liczby takich mRNP może prowadzić do powstania makroskopowych obiektów. Modyfikacje posttranslacyjne takie jak fosforylacja białka Pat1 przez kinazę PKA także mają wkład do powstawania ciałek P.<sup>357</sup>

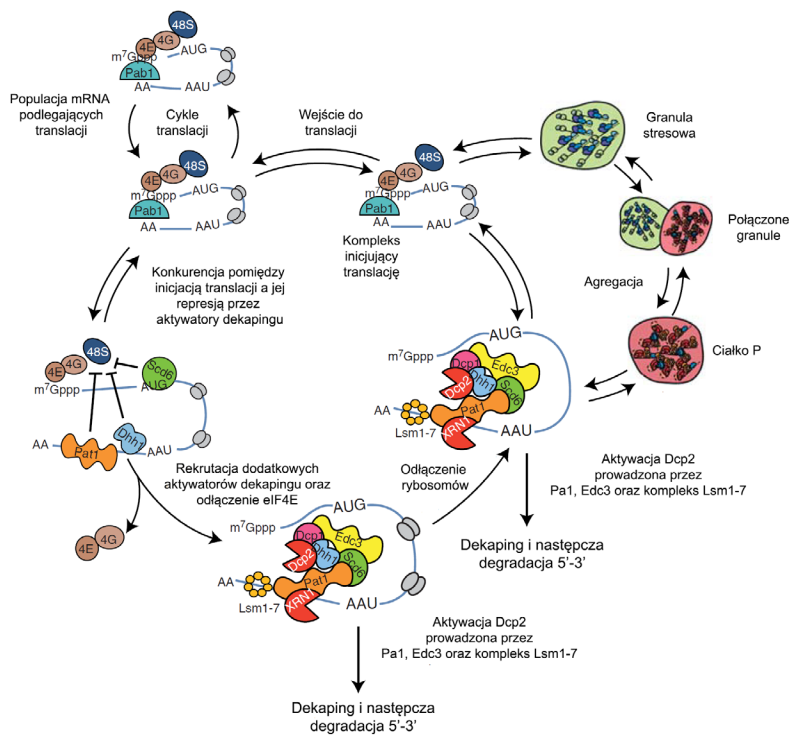
Istnieje szereg przesłanek za tym, że cytoplazmatyczne mRNA może przemieszczać się pomiędzy polisomami, ciałkami P oraz granulami stresowymi.<sup>340</sup> i) Inhibicja translacji prowadzi do transportu mRNA do z polisomów do wspomnianych lokacji.<sup>358</sup> ii) Blokowanie elongacji translacji mRNA w polisomach powoduje spadek ilości ciałek P nawet w czasie przedłużającego się stresu.<sup>358</sup> iii) Badania za pomocą FRAP (ang. *Fluorescence recovery after photobleaching*) wykazały dynamiczną naturę zarówno ciałek P jak i granul stresowych.<sup>359</sup> iv) Obserwowano fizyczne interakcje pomiędzy obydwoma typami granul.<sup>360</sup> v) mRNA związane w tych granulach może być przywrócone do stanu aktywności translacyjnej.<sup>361</sup>

Mechanizm oraz kierunkowość przepływu mRNA pomiędzy ciałkami P a granulami stresowymi nie są dobrze poznane. Zaproponowano teoretyczny model cyklu mRNA (**Rys. 1.31**) gdzie mRNA tworzące kompleks z czynnikami dekapującymi może ulec degradacji, przejściu do ciałek P lub ulec reorganizacji podczas której, czynniki promujące degradację są wymieniane na inicjatory translacji.<sup>340</sup> Ponadto określone typy mRNA mogą być w zależności od stanu fizjologicznego komórki preferencyjnie odkładane w granulach stresowych, ciałkach P

lub też polisomach.

**Tab. 1.3.** Główne składniki ciałek P.

Składnik	Funkcja
<b>Białka występujące głównie w ciałkach P</b> kompleks Ccr4/Pop2/Not kompleks Dcp1/2 Edc1, Edc2, Edc3 eIF4E-T eRF1, eRF3 GW182 kompleks Lsm1-7 Pat1/Pat1L Upf1, Upf2, Upf3	deadenyłacja dekaping aktywacja dekapingu represja translacji terminacja translacji aktywacja deadenyłacji poprzez miRNA aktywacja dekapingu represja translacji/aktywacja dekapingu mediator ścieżki NMD
<b>Białka występujące w ciałkach P i granulach stresowych</b> Białka z grupy Argonauta Dhh1/Rck/p54 eIF4E Rap55/Sdc6 Xrn1	aktywacja deadenyłacji poprzez miRNA represja translacji/aktywacja dekapingu inicjacja translacji represja translacji aktywność 5'-3' egzonukleazowa



**Rys. 1.31.** Proponowany „cykl mRNP” obrazujący dynamiczną równowagę pomiędzy lokalizacją mRNA na polisomach oraz w granulach cytoplazmatycznych. Zaczepnięte i zmodyfikowano na podstawie *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012, 4, a012286.

#### 1.5.3.4. Rola 3' końca w regulacji stabilności mRNA

Deadenylacja prowadzona przez kompleks Ccr4-Not stymuluje rozkład mRNA w *S. cerevisiae*<sup>362</sup> jak i *S. pombe* gdzie początkowa długość ogona poli(A) wynosi około 70 nt.<sup>363</sup> Dodatkowo w genomie tego organizmu znajdują się dwie dodatkowe deadenyłazy – kompleks Pan2/3 oraz PARN. Pierwszy z nich jest silnie zachowawczy ewolucyjnie u eukariontów, jednak u *S. cerevisiae* pełni jedynie pomocniczą rolę w skracaniu ogona poliA.<sup>364</sup> PARN jest zaangażowany w kilka specyficznych ścieżek rozkładu i jest nieobecny w genomach organizmów takich jak *D. melanogaster* lub *S. pombe*.<sup>365</sup> Usuwanie ogona poli(A) u wyższych eukariontów jest bardziej skomplikowane. Początkowa długość ogona



poli(A) wynosi około 200 nt i jest ona redukowana do około 50 nt na skutek aktywności kompleksu Pan2/3. Drugi etap deadenylacji jest prowadzony przez Ccr4-Not lub PARN, których wiązanie jest zależne od szeregu białek regulatorowych wiążących się do sekwencji 3' UTR.<sup>366,367</sup> Gdy poli(A) ulega skróceniu do 10-15 nt PABP nie jest zdolny do wiązania się z mRNA co pozwala na dalszą degradację transkryptu.<sup>337</sup> Dodatkową komplikacją jest to, że proces deadenylacji często współuczestniczy z cytoplazmatycznym wydłużaniem/regeneracją ogona poli(A).<sup>368</sup>

### 1.5.3.5. Rola hydroliza kapu w regulacji stabilności mRNA

#### 1.5.3.5.1. Enzymy odpowiedzialne za usuwanie kapu

W przeciągu kilku ostatnich lat odkryto szereg nowych enzymów zaangażowanych w degradację kapu (**Tab. 1.4**). Podstawowe informacje na ich temat zgromadzono w poniższej tabeli natomiast dokładne informacje na temat budowy i mechanizmu działania wybranych białek zostaną dokładniej opisane w rozdziale 1.5.4. *Struktura i funkcja białek hydrolizujących kap.*

**Tab. 1.4.** Enzymy eukariotyczne specyficznym degradujące strukturę kapu.

Białko	Występowanie	Rola w komórce
Dcp2	Wszystkie eukarionty	Usuwanie 5' mRNA kapu z długich (<25 nt) transkryptów, postulowany udział w regulacji odpowiedzi antywirusowej oraz kontroli składowania snRNP. Trwają spory co do tego w jakim stopniu działalność Dcp2 jest globalna a w jakim specyficzna co do transkryptu
Nudt16	Wyższe eukarionty	Usuwanie 5' mRNA kapu z długich transkryptów, do tej pory nie zostało jasno określone jak bardzo jego rola jest w dużym stopniu wymienna względem Dcp2
DcpS	Wszystkie eukarionty	Usuwanie krótkich kapowanych oligonukleotydów powstałych na drodze 3' egzonukleolitycznej oraz małowzrostkowych analogów kapu. Postulowana rola w selektywnej stabilizacji transkryptów oraz regulacji transkrypcji (dokładny mechanizm nie został opisany)
Aph1/FHIT	drożdże/ssaki	Hydroliza m <sup>7</sup> GpppG do m <sup>7</sup> GDP i GMP*
CG3362	ssaki	Hydroliza m <sup>7</sup> GMP do m <sup>7</sup> Guo*
cytozoloza nukleotydaza III	ssaki	Hydroliza m <sup>7</sup> GMP do m <sup>7</sup> Guo*
Rai1 (Dxo1)	drożdże (potwierdzone)	Rola w jądrowej kontroli jakości transkryptów
Dom3X (DXO)	ssaki (potwierdzone)	Rola w jądrowej kontroli jakości transkryptów

\*Dokładna rola nie została poznana.

#### 1.5.3.5.2. Regulacja aktywności Dcp2

Modulacja przejścia pomiędzy mRNP aktywnymi translacyjnie a skierowanymi do degradacji mRNA jest kierowana przez zestaw zachowawczych ewolucyjnie białek (**Rys. 1.32**). Większość z nich została zidentyfikowana na podstawie badań prowadzonych nad drożdżami; podstawowy zestaw aktywatorów dekapingu to helikaza Dhh1/Rck, Pat1, Edc3, Scd6/Rap55 oraz kompleks Lsm1-7.<sup>340</sup> Dhh1 jest członkiem rodziny helikaz DEAD-box i jej nadekspresja blokuje translację w komórkach i prowadzi do akumulacji granul mRNP w cytoplazmie<sup>369</sup>. Podobne właściwości wykazują białka Pat1, Scd6 oraz Stm1.<sup>370,371</sup> Aktywatory dekapingu mogą działać na różnych etapach translacji, przykładowo Pat1, Dhh1 oraz Scd6 blokują powstanie kompleksu preinicjującego 48S<sup>370</sup> a białko Stm1 działa dopiero na kompleks 80S, prawdopodobnie na skutek bezpośrednich oddziaływań z rybosomem.<sup>371</sup> Nie udało się jednoznacznie określić jak działanie wspomnianych białek prowadzi do dekapingu. Jedną z sugestii jest blokowanie inicjacji translacji co może dać więcej czasu na dysocjację aktywatorów translacji i asocjację białek

dekupujących<sup>340</sup>. Alternatywny mechanizm zakłada uporządkowaną wymianę białkowych komponentów mRNP na promujące dekaping.<sup>372</sup>

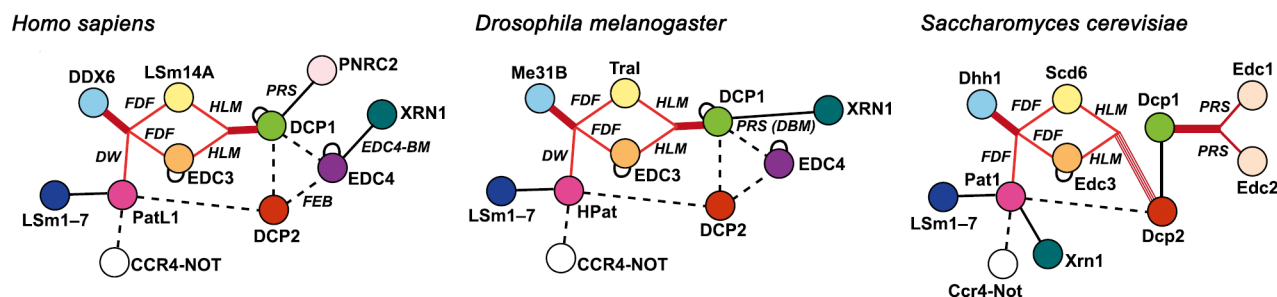
Inną rolę aktywatorów dekapingu jest stymulacja powstawania większych kompleksów dekapujących, co może pośrednio blokować inicjację translacji przez blokowanie dostępu białek do mRNA. Przyjmuje się, że istnieją dwa kompleksy mediujące proces dekapingu. Jeden z nich składa się z białka Pat1, kompleksu Lsm1-7 oraz Xrn1 i prawdopodobnie tworzy się na 3' końcu deadenyłowanego mRNA (dane z doświadczeń *in vitro*).<sup>373</sup> Drugi z nich zbudowany jest z białek Dcp1/2, Ecd3, Sdc6 oraz Dhh1, gdzie Pat1 oraz Edc3 prawdopodobnie stanowią rusztowanie dla innych elementów kompleksu.<sup>340, 370</sup>

Ostatnią rolę aktywatorów dekapingu jest stymulacja usuwania kapu poprzez fizyczne interakcje z enzymami dekapującymi. Przykładowo wykazano, że Edc3 oraz Pat1 wiążą się z Dcp2 *in vitro* w systemach rekonstruowanych<sup>370, 374</sup> natomiast Edc1 wiąże się z Dcp1<sup>375</sup>.

Podsumowując, czynniki regulatorowe zmieniają właściwości mRNP dzieląc je na dwie klasy: propagujące albo inicjację translacji albo jej represję oraz następczą degradację mRNA. Opisana dynamika także wydaje się być regulowana przez specyficznie sekwencyjne czynniki wiążące się z RNA.<sup>340</sup> Ponadto aktywność miRNA też jest związana z represją translacji na skutek bezpośredniego oddziaływania białek GW182 oraz Not1, będącego odpowiednio składnikiem kompleksów RISC oraz Ccr4/Pop2/Not.<sup>376, 377</sup>

Istotny poziom regulacji dekapingu odbywa się poprzez konkurencję o dostęp do struktury kapu. Zarówno w przypadku *H. sapiens* oraz *S. cerevisiae* zaobserwowano, że eIF4E jest inhibitorem usuwania kapu przez Dcp2, podobną rolę przypisano PABP.<sup>354, 378, 379</sup> Wykazano, że ludzkie białko PABP specyficznie wiąże się z końcem 5' mRNA pod nieobecność czynników inicjujących translację, jednak nie wykazuje interakcji z Dcp2. Interakcja PABP z końcem 5' jest większa w przypadku kapowanego oraz poliadenylowanego transkrypty oraz nie zależna od dodatku wolnego m<sup>7</sup>GpppN (badania *in vitro*). Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku eIF4E, które jest zdolne do wypierania PABP z miejsca wiązania kapu jedynie pod obecność poli(A). Co więcej wykazano, że PABP wiąże się jednocześnie z 5' kapem oraz ogonem poli(A). Dlatego też zasugerowano, że białko to może chronić mRNA zarówno przed deadenylacją jak i usunięciem kapu.<sup>378</sup>

Sama sekwencja oraz struktura 5' UTR także może mieć wpływ na aktywność Dcp2. Uważa się, że stymulacja dekapingu przez Dhhp1 może odbywać się na zasadzie rozwijania złożonych struktur 2-rzędowych RNA przez tą helikazę.<sup>380</sup>



**Rys. 1.32.** Plastyczność ewolucyjna sieci interakcji białek regulujących dekaping. Przedstawiono zależności dla trzech wybranych organizmów eukariotycznych. Białka oznaczono jako koła i podpisano. Kolory oznaczają występowanie specyficznych domen (czerwony – Nudix, zielony EVH1, żółty – LSM, pomarańczowy – YjeF-N, różowy – Pat-C, błękitny RecA-C, fioletowy – WD40). Bezpośrednie interakcje fizyczne oznaczono jako linie ciągłe, oddziaływania wzajemne zaznaczono na czerwono. Oddziaływania, w które zaangażowane są obszary nieustrukturyzowane oznaczono kursywą. Linie przerywane oznaczają oddziaływania, które nie zostały potwierdzone jako bezpośrednie. Półkoła w przypadku Edc3 i Dcp1 oznaczają skłonność do oligomeryzacji. Zaczepnięto i zmodyfikowano z *Genes & Development*, 2013, 27, 2628-2641.

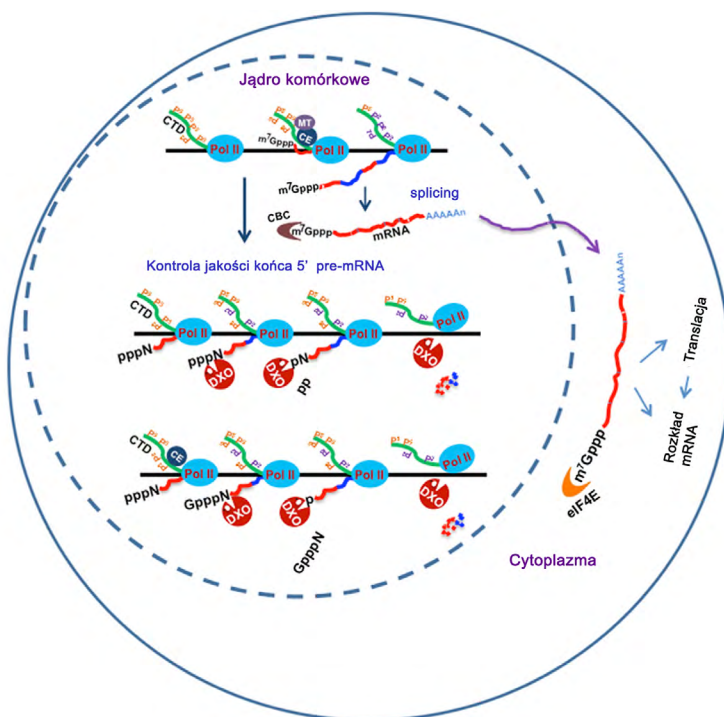
### 1.5.3.5.3. Cytoplazmatyczna degradacja kapu niezwiązana z Dcp2

Badania prowadzone nad aktywnością innych ssaczych białek z rodziny Nudix doprowadziły do odkrycia, że białko Nudt16 posiada podobną aktywność enzymatyczną co Dcp2. Wspomniane białko jest ortologiem białka X29 z *Xenopus laevis*, którego pierwotnie opisana funkcja to hydroliza kapu w U8 snoRNA. Dalsze badania pokazały, że Nudt16 jest zdolne do hydrolizy zarówno MMG jak i TMG kapu.<sup>381</sup> W komórkach ssaczych białko

występuje także w cytoplazmie i może mieć aktywny udział w usuwaniu kapu z mRNA.<sup>382</sup> Obecnie uważa się, że może ono być zaangażowane w degradację innych typów kapowanych RNA. Nudt16, w odróżnieniu od X29 wydaje się być rozpowszechnione w cytoplazmie ale nie występuje w jądrze komórkowym. Zaproponowano także, że Nudt16 oraz Dcp2 mogą kierować degradację odmiennych podzbiorów mRNA.<sup>382</sup>

#### 1.5.3.5.4. Nieprawidłowo kapowane transkrypty i jądrowe mechanizmy kontroli jakości

Przeprowadzone kilka lat temu badania pokazały, że proces syntezy struktury kapu nie zawsze prowadzi do powstania prawidłowego kapu. W wielu przypadkach RNA posiada kap pozbawiony grupy metylowej lub całej reszty m<sup>7</sup>Guo. Drożdżowe białka Rai1 oraz Dxo1 zdolne do usuwania całej struktury nieprawidłowego kapu umożliwiając łatwą degradację takiego transkryptu przez komórkowego egzonukleazy.<sup>383, 384</sup> W wyniku dalszych badań ustalono, że podobny enzym Dom3Z (DXO) występuje też w komórkach ssaków i prawdopodobnie degraduje nieprawidłowe pre-mRNA w jądrze komórkowym (**Rys. 1.33**). Obecnie mechanizmy jądrowej kontroli jakości mRNA nie zostały całkowicie poznane jednak uważa się, że są one związane z dalszą obróbką mRNA taką jak splicing oraz poliadenylacja.<sup>385, 386</sup>



**Rys. 1.33.** Zaproponowany jądrowy model kontroli jakości pre-mRNA. Transkrypty posiadające nieprawidłowy koniec 5' (GpppN-RNA, pppN-RNA) są preferencyjnie wykrywane przez DXO i poddane hydrolizie nieprawidłowego 5' końca a następnie degradacji. CTD – C-końcowa domena polimerazy II, CE – enzym syntezujący kap, MT-metylotransferaza, CBC – jądrowe białko wiążące kap. Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Molecular Cell*, 2013, 50, 104-115.

#### 1.5.3.6. Wybrane specyficzne ścieżki degradacji mRNA

##### 1.5.3.6.1. Rozkład NMD

Proces NMD (ang. *Nonsense-mediated Decay*) jest ograniczony do transkryptów zawierających przedwczesny kodon stop (nieoczekiwany kodon stop położony w środku sekwencji kodującej białko).

Jest on najbardziej rozpowszechnionym i najlepiej poznanym z mechanizmów kontroli jakości mRNA (**Rys. 1.34**). Cechą wspólną tych mechanizmów jest detekcja nieprawidłowych transkryptów mogących zaburzyć proces translacji. Są one rozpoznawane przez białka adaptorowe oddziałujące z maszyną translacyjną i kierujące niefunkcjonalne mRNA na ścieżkę degradacji.<sup>387</sup>

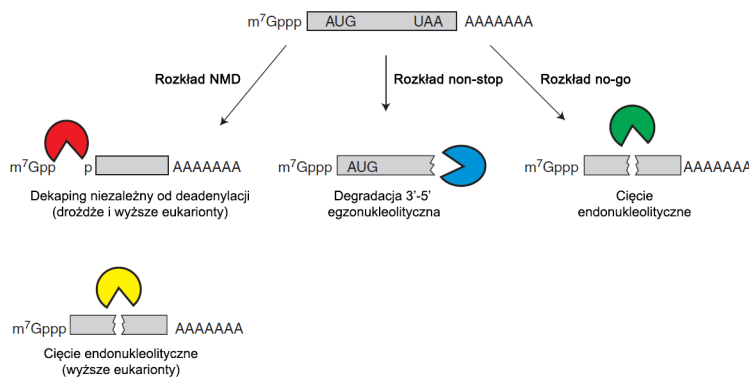
W przypadku NMD podczas tzw. początkowej rundy translacji kompleks CBC80/20 wiąże się z 5' kapem inicjując przy udziale innych pomocniczych białek translację mRNA. Jeżeli transkrypt zawiera przedwczesny kodon stop położony we wnętrzu sekwencji kodującej białko to jest on kierowany na drogę degradacji, która może zachodzić

zarówno endo- jak i egzonukleolitycznie.<sup>339, 340</sup> NMD jest hamowany przez formy stresu takie jak brak niezbędnych aminokwasów, infekcje wirusowe, szok cieplny, szok onkogeniczny oraz wczesne stadia hipoksji.<sup>339</sup> Dodatkowo wydajność NMD jest regulowana przez miRNA<sup>388</sup> oraz jest zależna od typu komórek.<sup>389</sup> Niedawne badania pokazały jednak, że poziom wielu (> 5%) transkryptów w komórce jest bezpośrednio zależny od aktywności białek zaangażowanych w NMD i proces ten może mieć dodatkowe znaczenie dla ssaków.<sup>390</sup> Zaproponowano, że transkrypty regulowane przez NMD stanowią główne źródło peptydów antygenowych w ścieżce odpowiedzi immunologicznej związanej ze ścieżką MHC1 (ang. *Major Histocompatibility Class 1*).<sup>391</sup>

### 1.5.3.6.2. Inne mechanizmy kontroli jakości transkryptów

Opisano szereg innych mechanizmów związanych z usuwaniem wadliwych transkryptów mRNA, część z nich ma miejsce w cytoplazmie podczas gdy inne zachodzą w jądrze komórkowym (**Rys. 1.34**).<sup>339, 387</sup> Jednym z cytoplazmatycznych procesów jest rozkład RNA non-stop (ang. NSD, *Non-stop mRNA decay*) gdzie degradacji ulega mRNA nie posiadający prawidłowego kodonu stop. Translacja takiego transkryptu prowadzi do syntezy niefunkcjonalnego polipeptydu, natomiast wadliwy transkrypt nie może zostać uwolniony z rybosomu blokując jego działanie. W takiej sytuacji typowym mechanizmem jest przyłączenie białka Ski7 co powoduje uwolnienie mRNA oraz rekrutację egzozomu, który następnie rozkłada nieprawidłowy mRNA.<sup>392</sup>

Kolejnym ze ścieżek jest rozkład mRNA (ang. NGD, *No-go mRNA decay*), w którym to degradacji ulega mRNA zablokowane na rybosomie. Proces taki może mieć miejsce gdy z uwagi na zaburzenie struktury przestrzennej cząsteczki mRNA dalsza progresja translacji jest niemożliwa a rybosom jest przez to związany z transkryptem i niezdolny do funkcjonowania. Rozpad takiego transkryptu jest inicjowany przez cięcie endonukleolityczne blisko miejsca wiązania z rybosomem. Następnie powstałe RNA są degradowane odpowiednio od 5' i 3' końca w standardowy sposób.<sup>339, 393</sup>



**Rys. 1.34.** Podstawowe mechanizmy kontroli jakości mRNA w komórkach eukariotycznych. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13, 246-259.

### 1.5.3.6.3. Rozkład kierowany przez elementy ARE i GRE

Elementy bogate w AU (ang. *AU-rich Elements*, ARE) są najbardziej liczną (~9% wszystkich mRNA) oraz zbadaną grupą elementów *cis*-regulatorowych w mRNA mających destabilizujący wpływ na mRNA.<sup>339, 394</sup> Występują one często w transkryptach kodujących proto-onkogeny, interleukiny oraz czynniki regulujące procesy zapalne. Z tego względu ARE mają istotne znaczenie fizjologiczne i zaburzenia w regulacji zależnej od ARE mogą prowadzić do zmian reumatoidalnych lub astmy.<sup>395</sup> Sama degradacja mRNA zawierających ARE jest inicjowana przez skrócenie ogona poli(A)<sup>366</sup> natomiast rozpad cząsteczki zachodzi zarówno od 3' jak i 5' końca.<sup>396</sup> Innymi często spotykanymi elementami *cis*-regulatorowymi są elementy GRE (ang. GU-rich Elements) kontrolujące splicing pre-mRNA oraz rozpad mRNA.<sup>397, 398</sup>

### 1.5.3.7. Urydynylacja mRNA

#### 1.5.3.7.1. Niekanoniczne polimerazy poli(A)

Kanoniczne polimerazy poli(A) mają aktywności transferaz rybonukleotydylowych i należą do rodziny polimeraz DNA  $\beta$ . W przeciągu ostatnich lat odkryto szereg enzymów wykazujących zróżnicowanie pod względem specyficzności substratowej oraz roli w komórce.<sup>399</sup> Zostały one zbiorczo nazwane niekanonicznymi polimerazami poli(A) (ncPAP); pomimo nazwy mogą one dołączać do 3' końca transkryptów RNA także inne reszty niż adenina.<sup>399, 400</sup> Białka te dołączają monofosforany rybonukleozydów bez udziału matrycy DNA lub RNA oraz zwykle nie posiadają motywów rozpoznających RNA, dlatego mogą pełnić swoją funkcję jedynie po włączeniu do większych kompleksów białkowych.<sup>399</sup> Proces dodawania łańcucha poliU do 3' końca mRNA jest prowadzony przez białka wykazując aktywność poli(U) polimerazy (PUP) albo terminalnej transferazy urydylowej (TUTaza).<sup>400</sup> Spośród drożdżowych ncPAP istotnym enzymem jest Cid1, który pełni istotny udział w 3' oligourydytacji mRNA kierując je w ten sposób na ścieżkę degradacji.<sup>363</sup> Innym ważnym enzymem jest występujący w jądrze Trf4, który jest składnikiem kompleksu TRAMP uczestniczącego w kierowanej przez egzosom degradacji nieprawidłowych transkryptów niekodujących RNA. Ludzki genom zawiera siedem genów kodujących potencjalne ncPAP: U6 TUTaza, PAPD1 (hmtPAP), PAPD4 (hGLD2), POLS, PAPD5, ZCCHC6, oraz ZCCHC11.<sup>399</sup> Białka ZCCHC6 oraz ZCCHC11 są ortologami drożdżowego Cid1 i biorą udział w regulacji stabilności miRNA.<sup>399, 401</sup> Te dwa enzymy także są kluczowe w urydytacji mRNA, czego implikacje zostaną przedstawione później.<sup>402</sup> Prowadzono szereg badań nad mechanizmem działania oraz specyficznością substratową Cid1. Pomiarów kinetycznych wykazały, że białko to wiąże wszystkie kanoniczne NTP ale ma znaczną preferencję do UTP. Natomiast badania strukturalne wykazały, że za tą specyficzność substratową odpowiedzialna jest pojedyncza reszta histydy, ponadto istotne zmiany konformacyjne miejsca aktywnego w czasie procesu katalitycznego sugerują, że urydylowany produkt jest usuwany z miejsca wiązania a następnie ponownie wiązany by dołączyć kolejną resztę U.<sup>403, 404</sup>

#### 1.5.3.7.2. Rozpowszechnienie w organizmach eukariotycznych

Pierwotnie urydylacja RNA została zaobserwowana na 3' końcu produktów cięcia mRNA kierowanego przez miRNA w komórkach *Arabidopsis thaliana* oraz ssaczyc. <sup>405</sup> Zaobserwowano zachodzenie tego procesu dla innych transkryptów takich jak mRNA histonów (Patrz rozdział 1.5.3.8. *Metabolizm mRNA histonów*).<sup>406</sup> Wielkoskalowe badania transkryptomyczne na ssaczyc liniach komórkowych pokazały, że oligourydylacja jest bardzo rozpowszechnionym procesem. Zmodyfikowane w ten sposób transkrypty obserwowano w przypadku prawie wszystkich klas RNA, wliczając w to mRNA, miRNA, snRNA, snoRNA, tRNA, scRNA oraz RNA mitochondrialne.<sup>407</sup> Opracowanie techniki TAIL-seq pozwoliło na lepsze poznanie sekwencji 3' wszystkich komórkowych RNA w skali genomowej. Pokazała ona, że w przypadku komórek Hela oraz NIH 3T3 ponad 85% wszystkich ssaczyc mRNA podlega urydytacji z częstością większą niż 1%.<sup>408</sup> Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań na roślinach<sup>409</sup>, urydylacja była obserwowalna głównie na skróconych (< 25 nt) ogonach poli(A) ale molekularny mechanizm tego procesu nie został poznany.<sup>408</sup> Urydylacja u niższych eukariotów (*S. pombe*, *Aspergillus nidulans*) jest niezależna od długości ogona poli(A), co jest prawdopodobnie związane z tym, że jest on znacznie krótszy u tych organizmów niż u zwierząt lub roślin.

#### 1.5.3.7.3. Rola fizjologiczna

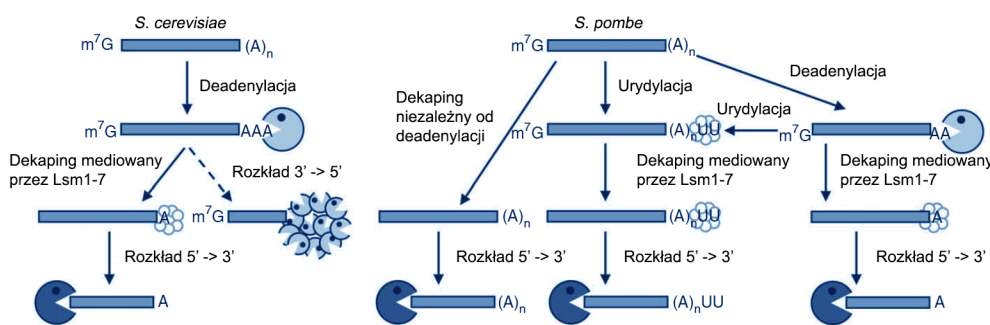
Proces urydytacji jest związany z kontrolą stabilności mRNA u wielu organizmów eukariotycznych (*S. pombe*, nicienie, rośliny ssaki).<sup>337</sup> Przykładowo, seria badań przeprowadzonych w ostatnich latach pokazała, że wiążące RNA białko LIN28 specyficznie rozpoznaje rodzinę miRNA pre-let7 a następnie rekrutuje białka ZCCHC6 oraz ZCCHC11 dodające sekwencję oligo(U) do wspomnianych miRNA. Proces ten zachodzi w komórkach embrionalnych i blokuje dalszą obróbkę miRNA przez białka z grupy Dicer.<sup>401, 410</sup> Z drugiej strony dodanie jednej reszty U stymuluje dojrzewanie miRNA co oznacza, że urydylacja może mieć zarówno stabilizujący jak i destabilizujący wpływ na RNA.<sup>411</sup> W przypadku wielu organizmów (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *A.*

*thaliana*) takie transkrypty są zwykle degradowane.<sup>412-414</sup> Inne badania pokazały że ZCCHC6 oraz ZCCHC11 katalizują urydylację mRNA w komórkach ludzkich, preferencyjnie do transkryptów o skróconym ogonie poli(A). Nokauty tych białek powodują globalny obniżenie urydylacji (badania te nie obejmowały mRNA histonów), natomiast podwójny nokaut tych enzymów jest letalny co świadczy o istotności tego procesu dla funkcji życiowych komórki.<sup>402</sup>

Oligourydylowane cząsteczki RNA często są rozpoznawane i degradowane przez egzonukleazę Dis3L2 zarówno w *S. pombe*<sup>415</sup> jak i komórkach ssaczych.<sup>416, 417</sup> W komórkach ssaczych istnieje kilka homologów Dis3. Typowa forma Dis3 występuje w jądrze komórkowym natomiast formy Dis3L oraz Dis3L2 są cytoplazmatyczne. Mimo, że wykazuje ona pewne podobieństwo sekwencyjne do katalitycznej podjednostki eksosomu to nie jest związana z tym kompleksem. Przeprowadzone analizy filogenetyczne pokazały, że białko Dis3L2 należy do odrębnej i zachowawczej ewolucyjnie rodziny egzonukleaz występującej u większości eukariontów (jednym z wyjątków jest organizm modelowy – *S. cerevisiae*, co może tłumaczyć dlaczego przez długi czas białko to nie wzbudzało zainteresowania osób badających degradację mRNA).<sup>415, 416</sup> Dokładniejsza rola białka Dis3L2 w degradacji mRNA zostanie przedstawiona w następnym rozdziale.

#### 1.5.3.7.4. Rola urydylacji w kontroli stabilności mRNA

Badania nad działaniem białka Cid1 w drożdżach *S. pombe* pokazały, że uczestniczy ono we wcześniej nieznanym szlaku degradacji mRNA gdzie deadenylacja nie jest skorelowana z usuwaniem kapu. Zaobserwowano liczne transkrypty pozbawione kapu ale z zachowanym ogonem poliA, co jest sprzeczne z klasycznym mechanizmem zakładającym usuwanie poliA jako etapu poprzedzającego hydrolizę kapu. Duża część tych poliadenyloowanych transkryptów posiadała dodatkowo dołączone 1-2 reszty U a dalsze badania pokazały, że procesy urydylacji i deadenylacji mogą zachodzić sekwencyjnie lub równolegle oraz są wzajemnie redundantne. Zablokowanie jednego z tych procesów może być przynajmniej częściowo kompensowane przez drugi. Dołączanie reszt U jest zależne od białka Cid1 a jeśli dekaping jest zaburzony to obserwuje się nagromadzenie kapowanych i urydyloowanych transkryptów świadczące, że urydylacja zachodzi wcześniej niż usuwanie kapu. Deadenylacja jest natomiast prowadzona specyficznie przez kompleks Ccr4, inne deadenylazy nie odgrywają w nim znaczącej roli. Uważa się, że opisywane ścieżki działają równolegle z klasycznymi mechanizmami degradacji (**Rys. 1.35**) oraz nie występują u *S. cerevisiae*. Istnienie kilku niezależnych ścieżek degradacji mRNA może także wskazywać na to, że stabilność różnych zestawów mRNA jest regulowana za pomocą odrębnych mechanizmów. Ponadto nie można wykluczyć, że proces urydylacji jest odwracalny na skutek działania poli(U) egzonukleazy.<sup>363</sup>



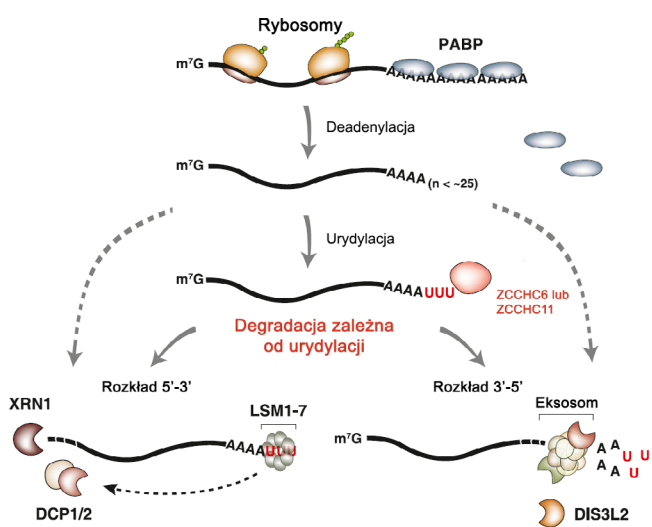
**Rys. 1.35.** Porównanie procesów degradacji mRNA u *S. cerevisiae* oraz *S. pombe*. Zacerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16, 616-623.

Opisana wcześniej egzonukleaza Dis3L2 jest obecnie uważana za główne białko prowadzące degradację urydyloowanych RNA w komórkach drożdży i ssaków. Nukleaza ta nie wchodzi w skład egzozomu<sup>415, 418</sup> jednakże badania prowadzone na *S. pombe* wykazały jej genetyczne asocjacje z białkami zaangażowanymi w degradację mRNA (przykładowo *dis3l2Δ* jest syntetycznie letalny z *xrn1Δ*) co świadczy o jej zaangażowaniu w degradację 3'-5'. Dis3L2 wykazuje preferencję do degradacji urydylowanego RNA, badania *in vitro* pokazały, że jest całkowicie nieaktywne względem poliadenyloowanego RNA, ponadto nie wykazuje aktywności 5'-3' egzonukleazowej oraz endonukleazowej<sup>416</sup>. Białko to wykazuje dużą specyficzność substratową względem urydylowanego RNA a jego

delecja w *S. pombe* prowadzi do akumulacji transkryptów z traktem poli(U) na 3' końcu.<sup>415</sup>

Obecnie uważa się, że degradacja urydylowanych transkryptów prowadzona przez Dis3L2 jest alternatywną oraz zachowawczą ewolucyjnie ścieżką rozpadu RNA.<sup>337, 415</sup> Ponadto możliwe jest, że w komórkach ludzkich hDis3L2 oraz hXrn mogą przynajmniej częściowo kooperować podczas degradacji mRNA. Globalna analiza transkryptów regulowanych przez hDisL2 pokazała, że są one związane z regulacją cyklu komórkowego oraz pakowaniem DNA.<sup>416</sup> Jest to zgodne z innymi obserwacjami, które pokazały, że nokaut hDis3L2 zwiększa tempo proliferacji oraz zaburza stabilność chromosomów.<sup>419</sup> Ponadto mutacje w genie hDIS3L2 mogą być powiązane z szeregiem zaburzeń takich jak syndrom Perlmana i podatność na nowotwory Wilmsa. Uważa się, że mutacje te blokują aktywność egzonukleazową hDIS3L2 co prowadzi do zaburzeń cyklu komórkowego i proliferacji.<sup>419</sup>

Późniejsze badania nad urydylacją mRNA w komórkach ludzkich potwierdziły, że urydylacja mRNA ma globalny wpływ na obniżenie stabilności takich transkryptów jednakże wydaje się, że w proces ich degradacji zaangażowanych jest więcej mechanizmów niż pierwotnie przypuszczano. Wykazano, że ścieżki wyciszenia genów przez miRNA oraz urydylacji są ze sobą powiązane. Deadenylacja wywołana przez działanie mimików miRNA prowadzi do urydylacji i degradacji docelowych mRNA. Co więcej zauważono, że inaktywacja ścieżki 5'-3' (deplecja Xrn1) skutkuje znaczną akumulacją urydylowanych transkryptów. Podobne efekty obserwowano przy deplecji katalitycznej podjednostki eksosomu oraz nukleazy Dis3L2. Przedstawione wyniki sugerują, że proces usuwania urydylowanych mRNA zachodzi prawdopodobnie poprzez wiele różnych ścieżek degradacji ale do tej pory nie udało się ustalić ich relatywnego wkładu do tego procesu (**Rys. 1.36**).<sup>402</sup>



**Rys. 1.36.** Model zależnej od urydylacji degradacji mRNA w komórkach ludzkich. Rozpad mRNA jest inicjowany poprzez deadenylację. Białka PABP ulegają dysocjacji od RNA gdy długość ogona poli(A) spada poniżej 25 nt. TUTazy ZCCHC6 oraz ZCCHC11 działają w bardzo zbliżony sposób i wprowadzają sekwencję poli(U) do cząsteczek mRNA. Tak zmodyfikowane mRNA jest rozpoznawane przez czynniki białkowe kierujące je na ścieżkę degradacji. Kompleks Lsm1-7 wiąże się do poli(U) i ułatwia przyłączenie kompleksu dekapującego Dcp1/2. Po usunięciu kapu transkrypt jest degradowany przez egzonukleazę Xrn1. Alternatywna ścieżka degradacji zakłada aktywność eksosomu lub Dis3L2, które degradują mRNA od 3' końca. Obecnie nie udało się ustalić jaki jest wkład ścieżek związanych z urydylacją mRNA do całościowego procesu jego degradacji. Kwestia czy urydylacja jest procesem odwracalnym także pozostaje otwarta. Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Cell*, 2014, 159, 1365-1376.

### 1.5.3.8. Metabolizm mRNA histonów

#### 1.5.3.8.1. Informacje ogólne

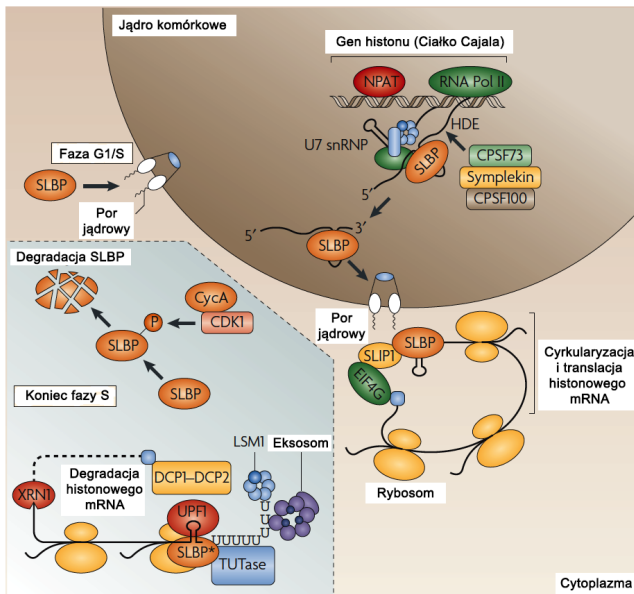
Histony stanowią główny komponent białkowy chromatyny, ponadto pełnią one istotną rolę w regulacji ekspresji genów na etapie transkrypcji ponieważ podlegają intensywnym modyfikacjom postranslacyjnym (acetylacja, metylacja etc.) mającym wpływ na wiązanie czynników translacyjnych.<sup>420</sup> Z uwagi na wspomniane role konieczna jest precyzyjna kontrola syntezy histonów w czasie stosunkowo krótkiej fazy S, gdzie zachodzi replikacja materiału genetycznego. Dwukrotne zwiększenie ilości chromatyny w jądrze komórkowym wymaga syntezy 10<sup>8</sup> cząsteczek histonów i ich wydajnej inkorporacji do nowo tworzonej chromatyny. Dlatego też w czasie fazy S zachodzi szybka ekspresja mRNA histonów w czasie której ich stężenie w komórce jest bardzo wysokie. Następnie ulega ono szybkiej degradacji po wejściu w fazę G2.<sup>421</sup> W odróżnieniu od innych białek mRNA kodujące histony nie posiada ogona poliA co powoduje, że ich metabolizm w kilku przypadkach różni się od metabolizmu klasycznych mRNA (**Rys. 1.37**). Strukturą zastępczą dla poliA jest zachowawcza ewolucyjnie sekwencja złożona z 25-26 nukleotydów i tworząca strukturę spinki do włosów.<sup>422</sup> Motyw ten jest specyficznie rozpoznawany przez białko SLBP

(ang. *Stem-loop Binding Protein*), które następnie uczestniczy w dalszych etapach obróbki i funkcjonowania mRNA. Domena wiążąca spinkę jest unikatowa i nie została wykryta w innych białkach wiążących mRNA.<sup>423</sup> Natomiast koniec 5' histonowego mRNA posiada klasyczną strukturę kapu i nie różni się od innych mRNA.<sup>421</sup> Warto nadmienić, że poza klasycznymi histonami istnieje szereg wariantów niekanonicznych, których synteza nie jest związana z cyklem komórkowym. Ich mRNA są poliadenylowane i traktowane przez komórkę podobnie jak inne „standardowe” mRNA.<sup>424</sup>

### 1.5.3.8.2. Ekspresja genów histonów i translacja mRNA histonów

Z powodu nietypowego zakończenia 3' końca ekspresja i obróbka mRNA histonów wymaga obecności odmiennych białek i snRNA jednakże dużo białek oddziałujących z kanonicznymi mRNA także jest zaangażowanych w ten proces (**Rys. 1.37**).<sup>421, 425</sup> Jak wspomniano wcześniej w komórkach ssaczych szybkość ekspresji białek histonowych gwałtownie wzrasta z początkiem fazy S. Proces ten przebiega w ciałkach Cajala i jest stymulowany przez kompleks CycE-CDK2 fosforylujący białko NPAT mające bezpośredni wpływ na aktywność polimerazy RNA w tych obszarach.<sup>421, 426</sup> Geny kodujące histony zwierząt nie posiadają intronów dlatego też ich obróbka przed-translacyjna jest uproszczona. Jedynym procesem jest cięcie pre-mRNA pomiędzy strukturą spinki a bogatym w puryny elementem HDE (ang. *Histone Downstream Element*).<sup>427</sup> Co ciekawe, wprowadzenie intronów do genu histonu zaburza powstawanie struktury spinki do włosów i prowadzi do klasycznej poliadenylacji.<sup>428</sup> W pierwszym etapie tworzenia 3' końca białko SLBP wiąże się ze spinką a U7 snRNA z elementem HDE. Prowadzi do zainicjowania cięcia enzymatycznego prowadzonego przez złożony kompleks białkowy uwalniającego dojrzałe mRNA.<sup>421</sup>

Dojrzałe mRNA są transportowane do cytoplazmy gdzie od razu podlegają translacji. Cyrkularyzacja histonowego mRNA przebiega w odmienny sposób niż dla kanonicznych mRNA. Uczestniczy w nim białko SLBP związane z 3' końcem mRNA, białko to nie oddziałuje bezpośrednio z czynnikiem eIF4G tylko oddziaływanie to ma miejsce poprzez białko SLIP1. Reszta procesu inicjacji translacji nie odbiega od powszechnie przyjętego modelu.<sup>421, 429</sup>



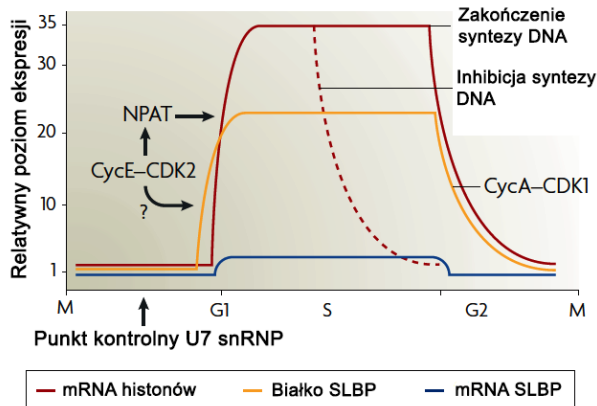
**Rys. 1.37.** Metabolizm histonów w komórkach ssaczych. Transkrypcja genów kanonicznych histonów i obróbka powstałego mRNA zachodzi w pobliżu ciałek Cajala. Mała jądrowa rybonukleoproteina (snRNP) U7, białko SLBP oraz kompleks rybonukleaz są odpowiedzialne za obróbkę histonowego pre-mRNA i utworzenie dojrzałego mRNA. SLBP pozostaje związane z mRNA także po jego transporcie do cytoplazmy, gdzie przy udziale odpowiednich białek (SLIP1, eIF4G) ulega cyrkularyzacji a następnie translacji. Pod koniec fazy S do 3' końca histonowego mRNA dodawany jest krótki trakt oligoU, do którego wiąże się kompleks Lsm1-7. Skutkuje to rekrutacją kompleksu Dcp1/2 oraz eksosomu prowadzącą do degradacji mRNA zarówno z 3' jak i 5' końca. Dodatkowo, kompleks CycA-CDK1 fosforyluje SLBP inicjując jego degradację na końcu fazy S cyklu komórkowego blokując dalszą syntezę mRNA histonów. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9, 843-854.

### 1.5.3.8.3. Translacja i regulacja stabilności histonowego mRNA

Histony wykazują zdolność do niespecyficznego zaburzania wielu procesów zachodzących w komórce przez co ich obecność w cytoplazmie jest toksyczna a ich ekspresja musi być ściśle regulowana (**Rys. 1.38**).<sup>430</sup> W komórce ssaczej istnieją cztery niezależne mechanizmy regulacyjne kontrolujące poziom białek histonowych i) transkrypcja genów histonów ii) obróbka pre-mRNA iii) regulacja okresu półtrwania mRNA iv) degradacja nadmiaru białek histonów. W dalszej dyskusji większość nacisku będzie położona na mechanizmy związane z degradacją mRNA.<sup>421</sup> W chwili gdy komórka wychodzi z fazy S zapotrzebowanie na histony spada, nagłe wyłączenie ich produkcji może



być regulowane na poziomie transkrypcji (*S. cerevisiae*) lub degradacji mRNA (ssaki). Drugi z mechanizmów jest regulowany przez koniec 3', który jest regulatorowym *cis*-elementem.<sup>431</sup> Warunkiem koniecznym dla prawidłowego działania tego mechanizmu jest obecność spinki w pobliżu (25-60 nt) kodonu stop<sup>432</sup> oraz obecność białka SLBP (element regulacyjny *trans*) rekrutującego białko dodające oligoU do 3' końca mRNA. Trakt poliU stanowi miejsce wiązania kompleksu Lsm1-7 inicjującego bezpośrednią degradację mRNA. Wykazano także, że białko Lsm1 jest integralnym elementem prowadzącym do degradacji oddziałującym z SLBP podczas trwania tego procesu.<sup>406</sup> Białko Upf1 (związane z terminacją translacji i ścieżką NMD) także jest wymagane dla degradacji mRNA histonów.<sup>433</sup>



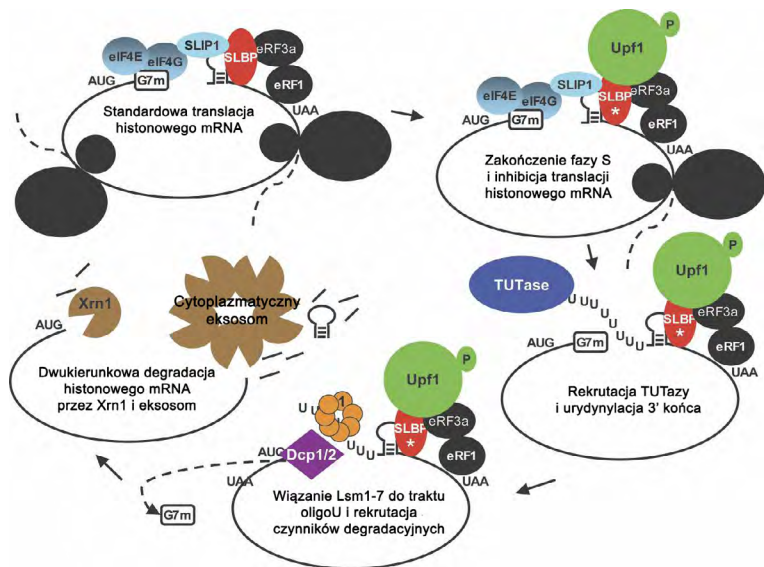
**Rys. 1.38.** Regulacja syntezy histonowego mRNA w cyklu komórkowym dla kanonicznych wariantów histonów. Pokazano relatywne poziomy stężenia dla mRNA kanonicznych histonów, mRNA *SLBP* oraz białka *SLBP*. W fazie G1 poziom zarówno *SLBP* oraz histonowych mRNA jest niski. Akumulacja mRNA histonów wymaga aktywności kompleksu CycE-CKD2 fosforylującego białko NPAT. Poziom mRNA histonów jest gwałtownie zwiększony po wejściu komórki w fazę S. Zakończenie syntezy DNA lub jej inhibicja na skutek uszkodzenia materiału genetycznego prowadzi do szybkiej redukcji stężenia mRNA histonów. Stężenia *SLBP* także się zwiększa przy wejściu w fazę S a następnie ulega redukcji na skutek działania kompleksu CycA-CDK1, jednak nie jest zależne od inhibicji replikacji DNA. Zaburzenie w działaniu U7 snRNP może prowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 sugerując istnienie mechanizmu kontrolnego opartego na mRNA histonów w fazie G1. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9, 843-854.

Zebrane dane biochemiczne wskazują, że mRNA histonów podlega degradacji zarówno od 3' jak i 5' końca.<sup>406, 434, 435</sup> Wyciszenie białka Dcp2 oraz egzonukleazy Xrn1 redukuje szybkość degradacji histonowego mRNA. Poliadenylowane mRNA może być także degradowane przez kompleks egzozomu, wyciszenie jego kluczowych komponentów ma istotny wpływ na degradację histonowego mRNA. Co istotne, nawet znaczące obniżenie poziomu wspomnianych białek ma znikomy wpływ na wzrost i cykl komórkowy.<sup>406</sup> W celu bezpośredniej identyfikacji i poznania sekwencji częściowo zdegradowanych cząsteczek mRNA histonów wykorzystano cRT-PCR (ang. *circularization RT-PCR*), którego produkty sklonowano i poddano sekwencjonowaniu. Uzyskane dane pokazały, że część intermediatów posiada na sekwencję oligoU na 3' końcu. Działanie na komórki hydroksymocznikiem (HU), blokującym syntezę DNA, prowadzi do zwiększenia udziału transkryptów z traktem oligoU. Z uwagi na różną długość sekwencji oligoU uważa się, że w czasie degradacji danego transkryptu możliwe jest wielokrotna urydylacja na 3' końcu jak i jednoczesna degradacja od końców 3' oraz 5'. Wykazano także, że tak modyfikowane transkrypty są obecne jedynie na końcu fazy S gdzie zachodzi ich szybka degradacja co stanowi kolejną sugestię wiążącą 3' oligourydylację z degradacją mRNA. Zaproponowano także ogólny model zaniku mRNA histonów w którym Lsm1 wiąże się z oligoU co kieruje transkrypt na ścieżkę degradacji (**Rys. 1.39**).<sup>406, 436</sup>

Jak wspomniano wcześniej wprowadzenie serii urydyn na 3' koniec mRNA wymaga aktywności specyficznych enzymów z grupy TUTaz. Białko ZCCHC11 jest związane z mRNA histonów i bierze udział w regulacji jego stabilności i kierowaniu do degradacji. To białko może być bezpośrednio odpowiedzialne za urydylację tych mRNA.<sup>437</sup> Ponadto w tych samych badaniach zaobserwowano, że wyciszenie PAPD1 lub PADP5 nie wpływa na stabilność mRNA histonów natomiast poziom ekspresji ZCCHC11 spada w czasie fazy S cyklu komórkowego. Przedstawione dane wspierają model w którym ZCCHC11 jest białkiem odpowiedzialnym za wprowadzanie poli(U) do mRNA histonów, co przyspiesza ich degradację.<sup>437</sup>

Inną istotną kwestią było ustalenie jakie białka są odpowiedzialne za degradację mRNA histonów. Pierwotnie uważano, że zachowawcze ewolucyjnie egzonukleaza Eri1 (3'hExo) także jest związana z degradacją mRNA histonów. 3'hExo skraca transkrypty o 2-3 nukleotydy (w większym stężeniu procesywnie degraduje transkrypty *in vitro*) a obecność *SLBP* blokuje tą aktywność. Sugeruje to konieczność interakcji z dodatkowymi białkami by możliwa była degradacja mRNA.<sup>438</sup> Jednym z nich jest składnik kompleksu Lsm1-7, białko Lsm4, którego

C-końcowa domena oddziałuje bezpośrednio z domeną wiążącą RNA białka SLBP co jest wymagane procesu rozpadu mRNA histonów. Egzonukleaza 3' hExo wiąże się równocześnie z SLBP oraz Lsm1-7 do urydylowanego transkryptu i prawdopodobnie jedynie inicjuje degradację, która jest prowadzona dalej przez inne enzymy.<sup>439</sup> Do tej pory nie zaproponowano spójnego modelu degradacji mRNA histonów. Wydaje się, że w proces ten zaangażowane jest kilka ścieżek rozpadu mRNA (klasyczne ścieżki 3'-5', 5'-3' oraz ich specyficzne warianty) i przebiega tak samo jak dla poli(A)<sup>+</sup> mRNA ale udział poszczególnych z nich lub specyficzność tkankowa nie zostały sprecyzowane.



**Rys. 1.39.** Proponowany model degradacji mRNA histonów. Wyjście komórki z fazy cyklu S prowadzi do przyłączenia ufosforylowanego białka Upf1 i rekrutację TUTazy. Spinka na 3' końcu jest koniecznym elementem cis prowadzącym do degradacji mRNA i musi być ona ulokowana w pobliżu kodonu stop. Dodanie traktu oligoU skutkuje przyłączeniem kompleksu Lsm1-7 a następnie czynników inicjujących degradację transkryptu od obydwu końców. Zacerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Genes & Development*, 2008, 22, 50-65.

## 1.5.4. Struktura i funkcja białek hydrolizujących kap

### 1.5.4.1. Dcp2

#### 1.5.4.1.1. Hydrolazy Nudix

Do superrodziny Nudix należy ponad 250 hydrolaz zależnych od kationów  $Mg^{2+}$ . Występują one u wszystkich organizmów (prokaryoty, eukaryoty i wirusy) i przeprowadzają hydrolizę difosforanów nukleozydów dołączonych do innej grupy. Cechą charakterystyczną tych enzymów jest obecność silnie zachowawczego motywu sekwencyjnego NUDIX ( $GX_5EX_2REUXEEXGU$ , gdzie U to rozbudowana sterycznie reszta hydrofobowa a X jest dowolną resztą).<sup>440</sup> Motyw ten tworzy strukturę typu pętla-helisa-pętla, która wiąże magnez i wykazuje aktywność katalityczną. Wchodzi ona w skład fałdu Nudix o strukturze kanapki  $\alpha/\beta/\alpha$  (ang.  $\alpha/\beta/\alpha$  sandwich), której struktura jest charakterystyczna dla określonego enzymu. Substratami hydrolaz Nudix mogą być naturalne lub oksydacyjnie uszkodzone trifosforany nukleozydów, polifosforany dinukleotydu, nukleotydo-cukry, dinukleotydydowe koenzymy oraz kapowane transkrypty RNA.<sup>441</sup>

Hydrolazy Nudix przyspieszają przebieg reakcji w zakresie wielkości  $10^9$ - $10^{12}$ , z czego wkład od ogólnej katalizy kwasowej wynosi  $10^3$ - $10^5$  i pochodzi on od reszty Glu z sekwencji Nudix lub reszty His z innego obszaru. Duże znaczenie ma też wkład od kationów  $Mg^{2+}$  (1-3 na centrum aktywne) kompleksowanych przez reszty Glu zarówno z sekwencji Nudix oraz innych fragmentów białka. Dodatkowy efekt katalityczny jest zapewniany przez kationowe łańcuchy boczne Lys lub Arg oraz wiązania wodorowe tworzone przez reszty Tyr pozwalające na zapewnienie optymalnej geometrii kompleksu aktywnego.<sup>441</sup>

#### 1.5.4.1.2. Ogólna charakterystyka biochemiczna Dcp2

Dcp2 jest enzymem, którego substratem są cząsteczki RNA posiadające strukturę kapu na końcu 5'. Produktami reakcji enzymatycznej są  $m^7GDP$  oraz ufosforylowane RNA. Już wczesne badania pokazały, że wiązanie RNA jest

kluczowe dla reakcji hydrolizy kapu. Zauważono też, że wolne cząsteczki kapu ( $m^7GpppN$ ) nie są ani hydrolizowane ani nie wpływają na przebieg reakcji enzymatycznej. Minimalna długość transkryptu RNA wymagana dla jego związania została ustalona na 23 nt.<sup>442-444</sup> Dodatkowo badania prowadzone na Dcp2 pochodzącego z *A. thaliana* (AtDcp2) wykazały, że obecność jonów  $F^-$  nie prowadzi do inhibicji reakcji hydrolizy kapu.<sup>444</sup> Jest to ciekawa obserwacja ponieważ większość enzymów z rodziny Nudix jest podatna na obecność jonów  $F^-$ . Zaproponowano, że tworzenie się kompleksu jonu fluorkowego z produktem reakcji blokuje dostęp do miejsca aktywnego dla substratu.<sup>445</sup>

Badania prowadzone na białkach Dcp2 z różnych organizmów pozwoliły na ustalenie, że decydujące znaczenie w aktywności katalitycznej ma zachowawcza ewolucyjnie obszar N-końcowy (złożony z domeny Nudix oraz regulatorowej domeny N-końcowej), podczas gdy obszar C-końcowy wykazuje dużą zmienność i nie jest kluczowy do hydrolizy kapu. Dcp2 posiada trzy zachowawcze ewolucyjnie motywy sekwencyjne mające znaczenie fizjologiczne: fałd Nudix, Box A oraz Box B. Ludzkie białko Dcp2 (hDcp2) pozbawione motywu Box A posiada obniżoną specyficzność i produktami reakcji dekapingu są wtedy  $m^7GDP$  oraz  $m^7GMP$ .<sup>442</sup> Zarówno hDcp2<sup>442</sup> jak i drożdżowe Dcp2<sup>446</sup> wykazują aktywność enzymatyczną w obecności kationów  $Mg^{2+}$  oraz  $Mn^{2+}$ , dodatek manganu znacząco zwiększa wydajność katalityczną *in vitro*. Co ciekawe, większość białek Nudix preferencyjnie wykorzystuje kationy  $Mg^{2+}$  jako kofaktory, jednym z wyjątków są hydrolaza mannozylova GDP mannozy z *E. coli* oraz hydrolaza NADH z *A. thaliana*, które także mogą korzystać z jonów  $Mn^{2+}$ .<sup>441</sup>

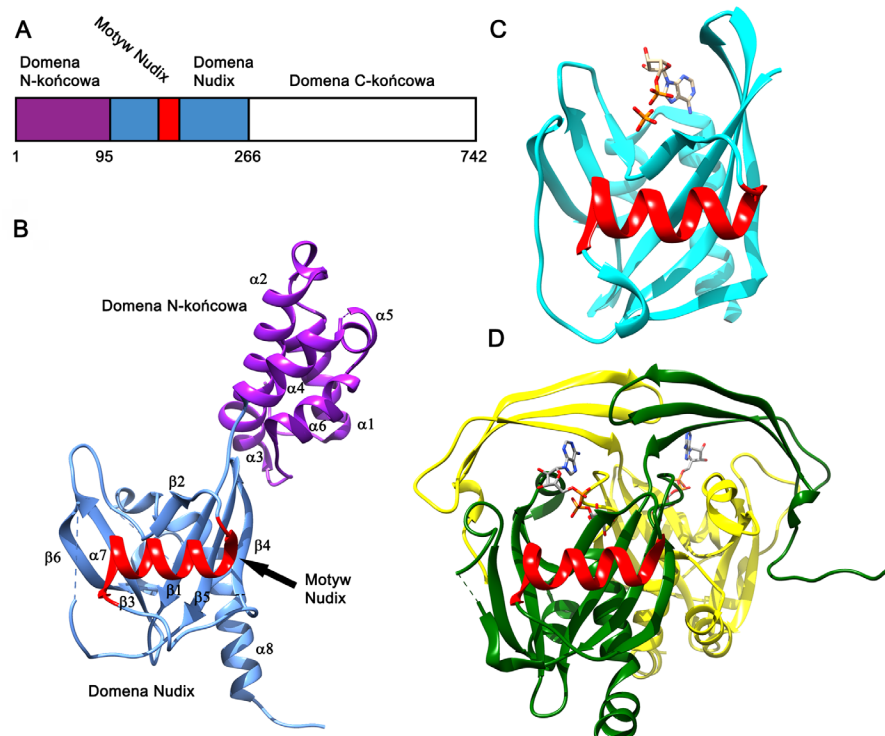
Podobnie jak w przypadku drożdżowych ortologów hDcp2 nie hydrolizuje wolnych cząsteczek  $m^7GpppN$ .<sup>442</sup> Jednakże pewne badania wskazują, że zarówno w przypadku drożdżowych białek Dcp2 jak i AtDcp2 produkt reakcji dekapingu ( $m^7GDP$ ) lub inne nukleotydy mogą mieć właściwości inhibitorowe. Aktywność AtDcp2 jest w niewielkim stopniu hamowana przy stężeniu  $m^7GDP$  wynoszącym 0.2 mM, zwiększenie stężenia do 2 mM nie prowadzi do dużych zmian w efektywności inhibicji.<sup>444</sup> Niektóre inne białka usuwające kap takie jak białko wirusa L-A<sup>447</sup> oraz jądrowe białko X29<sup>448</sup> też są wrażliwe na wysokie stężenia  $m^7GDP$ . Ponadto SpDcp2 wykazuje obniżoną aktywność pod obecność wyższych stężeń (> 1 mM) nukleotydów takich jak ATP,  $m^7GpppA$  lub pAA.<sup>449</sup> Szereg badań pokazał, że w przypadku drożdżowych białek Dcp2 obecność Dcp1 ma istotny wpływ na szybkość reakcji enzymatycznej *in vitro* oraz jest ono konieczne dla usuwania kapu *in vivo*. W przypadku wyższych eukariontów działanie Dcp2 jest mniej istotne.

### 1.5.4.1.3. Struktura Dcp2

Do chwili obecnej (czerwiec 2015) udało się rozwiązać 8 struktur białka Dcp2 (6 za pomocą krystalografii rentgenowskiej i 2 za pomocą NMR), niektóre z nich zawierają także inne białka (Dcp1, kompleks Lsm). Dzięki temu udało się dość dobrze poznać budowę i działanie zachowawczej domeny N-końcowej natomiast funkcja i struktura ewolucyjnie zmiennej domeny C-końcowej nie została jeszcze dobrze zbadana.

#### 1.5.4.1.3.2. Ogólna charakterystyka

Pierwsza struktura krystalograficzna została uzyskana dla skróconego (266 aa z domeny N-końcowej) białka z *S. pombe*. Struktura (numer PDB: 2A6T, **Rys. 1.40**) posiada ponadto szereg obszarów niewidocznych na mapie gęstości elektronowej, założono, że są one nieustrukturyzowane (reszty 79-81; 186-191; 209-214; 244-266). Opisująca struktura jest zbudowana z dwóch domen. Część N-terminalna (1-93) składa się z sześciu  $\alpha$ -helis oraz jednej helisy  $3_{10}$  i jest ona przyłączona krótkim łącznikiem do części C-terminalnej (98-245). Składa się ona z zakrzywionej, położonej w centrum 3-elementowej  $\beta$ -kartki otoczonej po obydwu stronach przez  $\alpha$ -helisy. Podobnie jak w przypadku innych hydrolaz Nudix, motyw sekwencyjny Nudix ulokowany jest w strukturze typu pętla-helisa-pętla utworzonej przez helisę  $\alpha 7$  i otaczające ją pętle. Specyficzna dla białek Dcp2 sekwencja Box B także jest zawarty w strukturze kanapki  $\alpha/\beta/\alpha$  a nie jest (jak sugerowano wcześniej<sup>443</sup>) położony na zewnątrz.<sup>450</sup> Struktura przestrzenna domeny C-końcowej Dcp2 nie została jeszcze poznana. Nie jest ona zachowawcza ewolucyjnie a jej sekwencja jest zmienna u różnych organizmów. Analizy bioinformatyczne pokazały, że w przypadku AtDcp2 domena ta jest nieustrukturyzowana oraz zawiera domniemany motyw wiążący domenę PDZ. Jest to dość nietypowe ponieważ większość hydrolaz Nudix to małe globularne białka. Obecność wspomnianych elementów strukturalnych może być związana z dużą podatnością na proteolizę.<sup>444</sup>



**Rys. 1.40.** Struktura krystalograficzna SpDcp2 i porównanie do innych białek Nudix. (A) schemat budowy SpDcp2 z uwzględnieniem istotnych elementów. (B) Struktura SpDcp2, domena N-końcowa została zaznaczona na fioletowo, domena Nudix na niebiesko a motyw Nudix na czerwono (C) Struktura hydrolazy  $Ap_4A$  w kompleksie z fosforanem i AMP (kod PDB 1KTG), motyw Nudix zaznaczono na fioletowo. (D) Struktura pirofosfatazy ADP-rybozy w kompleksie z ADP-rybozą (kod PDB 1G9Q), na zielono zaznaczono podjednostkę A, na żółto podjednostkę B. Sporządzono na podstawie *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13, 63-70.

#### 1.5.4.1.3.4. Podobieństwa do innych nukleaz

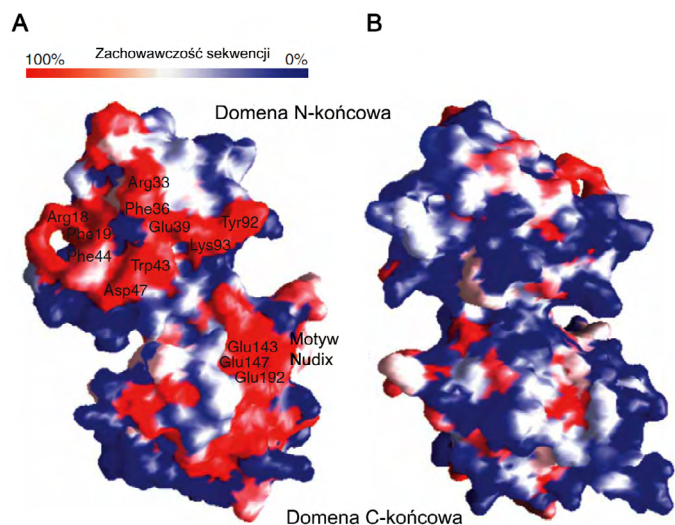
Pomimo dużych różnic sekwencyjnych zaobserwowano, że C-końcowa domena Nudix SpDcp2 wykazuje podobieństwo strukturalne do szeregu hydrolaz takich jak hydrolaza  $Ap_4A$  z *C. elegans* oraz pirofosfatazy ADP-rybozy z *E. coli* (Rys. 40). Nałożenie przestrzenne domen Nudix dla wymienionych wcześniej białek pokazuje ich znaczące podobieństwo (RMSD  $\sim 1.6$ - $1.7$  Å, Rys. 1.41). Natomiast struktura domeny N-terminalnej reprezentuje nowy typ fałdu.<sup>450</sup> Hydrolaza  $Ap_4A$  jest monomerycznym białkiem, gdzie reszty E52, E56 oraz E103 biorą udział w wiązaniu  $Mg^{2+}$  i ataku nukleofilowym na wiązanie pirofosforanowe a ich mutacja prowadzi do drastycznego spadku szybkości reakcji ( $>10^3$ ).<sup>441</sup> Porównanie struktur SpDcp2 oraz hydrolazy  $Ap_4A$  pokazuje, że reszty E143 oraz E147 Dcp2 mają bardzo zbliżone położenie do reszt E52 i E56 w hydrolazie  $Ap_4A$ .<sup>450</sup> Ponadto reszta E103 ( $Ap_4A$ ) ma znaczenie w wiązaniu kationu metalu oraz pośredniczy w reakcji enzymatycznej.<sup>441</sup> Jej odpowiednikiem w SpDcp2 jest E192 jednak porównanie położenia reszt E192 (SpDcp2) oraz E103 ( $Ap_4A$ ) jest utrudnione ze względu na słabą rozdzielczość map gęstości elektronowych w tamtych obszarach.<sup>450</sup>



**Rys. 1.41.** Zestawienie motywów Nudix z SpDcp2 (fioletowy) oraz hydrolazy  $Ap_4A$  (żółty) obrazuje, że zachowawcze ewolucyjnie reszty aminokwasowe (reprezentacje atomowe) przyjmują zbliżoną geometrię. Sporządzono na podstawie *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13, 63-70.

### 1.5.4.1.3.5. Domena Nudix i inne obszary zachowawcze w ewolucji

Pomimo różnic w przebiegu procesu katalitycznego trzon strukturalny domeny Nudix jest dobrze zachowany. Reszty E16, E17 oraz E20 motywu Nudix kompleksują kation metalu i jeden z nich działa jako ogólna zasada w katalizie. Miejsca te odpowiadają resztą E143, E146 oraz E147 w białku SpDcp2 oraz E149, E152 oraz E153 w białku ScDcp2.<sup>450</sup> Z tych reszt E147 (SpDcp2) i jego odpowiedniki są najważniejsze dla procesu katalitycznego bowiem ich mutacja prowadzi do nieaktywnego białka, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* natomiast mutacje w E152 (ScDcp2) nie prowadzą do istotnych zaburzeń.<sup>345, 443, 446</sup> Porównanie zachowawczości w ewolucji reszt na powierzchni Dcp2 dla kilku gatunków pozwoliło stworzyć mapę przedstawiającą te zależności (**Rys. 1.42**). Istnieją dwa silnie zachowawcze regiony na powierzchni białka, jeden z nich w obszarze domeny Nudix a drugi w domenie Box A.<sup>450</sup>



**Rys. 1.42.** (A) Powierzchnia białka SpDcp2 ukazująca zachowawczość ewolucyjną reszt aminokwasowych. Poza motywem Nudix zauważono, że wiele reszt w domenie N-końcowej także jest stabilnych ewolucyjnie. (B) widok na cząsteczkę po obrocie o 180°. Zaczerpnięto i zmodyfikowano podstawie *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13, 63-70.

### 1.5.4.1.3.6. Rola domeny N-końcowej

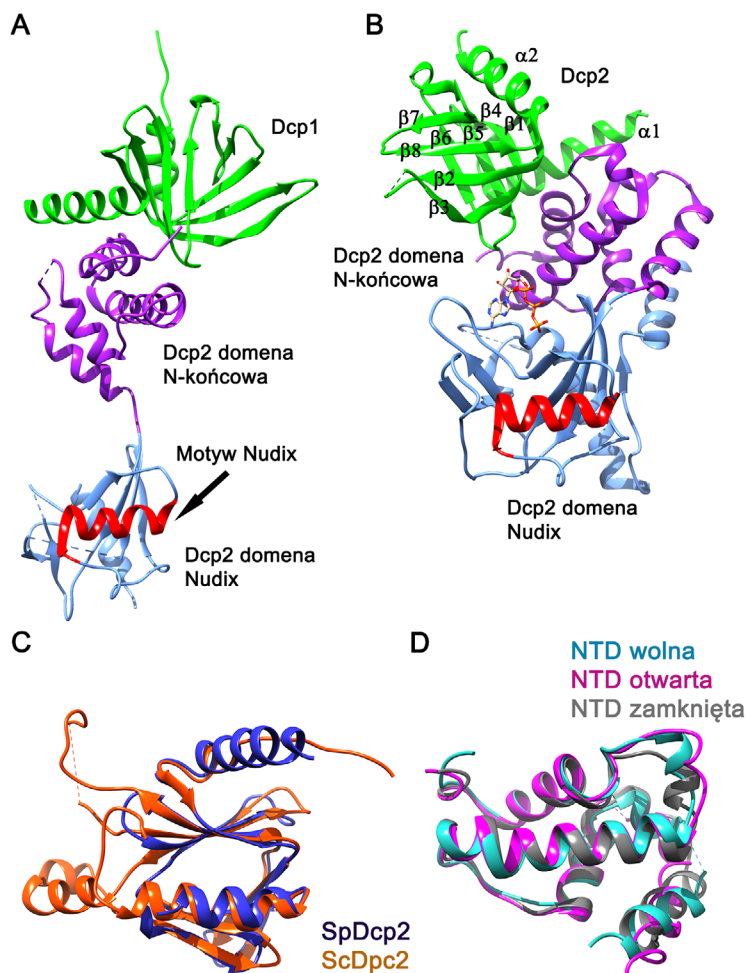
Domena N-końcowa (1-94) nie wykazuje aktywności katalitycznej podczas gdy domena Nudix (95-266) jest aktywna, jednak jej efektywność jest znacznie niższa niż dla kompletnego SpDcp2, co oznacza, że rolą fragmentu N-końcowego jest zwiększenie szybkości katalizy. Zmieszanie równomolowych ilości obydwu domen w roztworze nie prowadzi do odtworzenia aktywności natywnego białka. Badania za pomocą ukierunkowanej mutagenazy wykazały, że szereg reszt aminokwasowych (R18, F19, R33, E39, W43, D47, L93) jest koniecznych dla prawidłowego funkcjonowania SpDcp2 i ich podmiana znacząco obniża funkcjonalność białka. Co więcej badania na *S. cerevisiae* pokazały, że N-koniec Dcp2 jest konieczny dla usuwania kapu *in vivo*, a wprowadzanie wspomnianych mutacji znacznie pogarsza wydajność tego procesu. Wyniki te zasugerowały, że N-koniec Dcp2 jest potrzebny do wiązania się z Dcp1 a mutagenaza ukierunkowana pozwoliła wykazać które reszty aminokwasowe są do tego wymagane. Ustalono też, że SpDcp2<sub>1-93</sub> jest zdolne do wiązania się z Dcp1 a resztami absolutnie kluczowymi dla tego procesu są R18, F19 oraz F44. Mutacje te nie obniżają szybkości dekapingu jednak po dodaniu Dcp1 nie obserwuje się oczekiwanego przyśpieszenia reakcji. Podobne wyniki zaobserwowano dla analogicznych mutacji ScDcp2 (R25, F26, F51). Dodatkowe badania na *S. cerevisiae* z użyciem testów dwuhybrydowych potwierdziły, że reszty te także mają decydujące znaczenie w wiązaniu Dcp1 *in vivo*. Co ciekawe zauważono, że o ile w testach *in vitro* wszystkie trzy mutacje mają taki sam efekt to w badaniach *in vivo* jedynie reszta F51(ScDcp2) jest absolutnie kluczowa co może oznaczać, że interakcje z dodatkowymi elementami kompleksów degradujących mRNA mogą stabilizować kompleks Dcp1/2 u drożdży.<sup>450</sup>

### 1.5.4.1.3.7. Struktura kompleksu Dcp1-Dcp2

Poznanie struktur krystalograficznych kompleksów Dcp1-Dcp2<sub>1-93</sub> oraz Dcp1-Dcp2<sub>1-266</sub> z drożdży *S. pombe* pomogło w zrozumieniu wielu zagadnień związanych z mechanizmem działania tego enzymu (**Rys. 43**). Komórka elementarna drugiego z kompleksów (dla wygody nazywanego dalej SpDcp1/2) jest dość złożona bowiem składa się ze struktur czterech kompleksów w jednostce asymetrycznej. W oparciu o symetrię niekrystalograficzną mogą one zostać podzielone na dwa typy. W jednym konformacja SpDcp2 jest „otwarta” a w drugim „zamknięta”. Kompleks zamknięty posiada Dcp1 oraz Dcp2 położone blisko siebie, ponadto z domeną katalityczną związana jest cząsteczka ATP. Natomiast w kompleksie otwartym obydwie domeny Dcp2 są odseparowane od siebie za pomocą krótkiego łącznika i nie oddziałują ze sobą.<sup>449</sup>

W obydwu kompleksach Dcp1 przyjmuje bardzo podobną strukturę złożoną z ośmiu β-kartek tworzących typową domenę EVH1 oraz dwóch dodatkowych α-helis. Jedna z nich, położona na N-końcu jest ulokowana naprzeciwgle do układu β-kartek oraz ortogonalnie do drugiej, krótszej helisy. W obydwu kompleksach z Dcp2 mechanizm wiązania Dcp1 jest taki sam. Co istotne, pomimo pewnych różnic w sekwencji struktury SpDcp1 oraz Dcp1 pochodzące z *S. cerevisiae* (ScDcp1) są do siebie zbliżone. Jednakże ScDcp1 struktura obszaru N-terminalnego to helisa 3<sub>10</sub> oraz fragment nieustrukturyzowany podczas gdy SpDcp1 posiada jedną długą α-helisę.<sup>449, 451</sup>

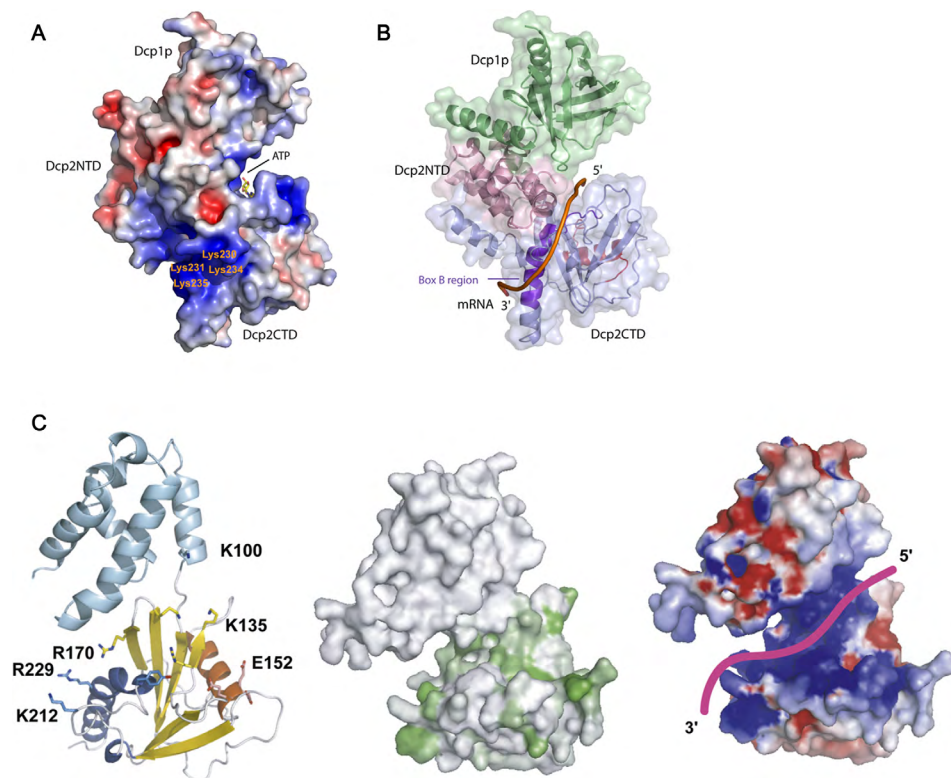
Struktury indywidualnych domen SpDcp2 nie wykazują istotnych różnic w kompleksie otwartym oraz zamkniętym, przykładowo RMSD dla domeny N-końcowej wynosi 1,2 Å (**Rys. 1.43**) a dla domeny Nudix parametr ten ma wartość poniżej 0,7 Å. Pomimo tych podobieństw wzajemne orientacje obydwu domen są odmienne w obydwu kompleksach. Przy nałożeniu strukturalnym domen Nudix z kompleksu otwartego, zamkniętego oraz wolnego (struktura bez Dcp1) różnice w położeniu domeny N-końcowej są znaczące. Dodatkowo widoczne są pewne różnice lokalne, przykładowo domena N-końcowa w formie zamkniętej posiada inny układ helis α5 oraz α6, co może być wywołane związaniem ATP przez domenę Nudix (**Rys. 1.43D**).<sup>449</sup>



**Rys. 1.43.** Struktura kompleksu Dcp1/2. (A) Schemat kompleksu Dcp1/2 w konformacji otwartej. Dcp1 oznaczono na zielono, domenę N-końcowa na fioletowo, domenę Nudix na niebiesko a motyw Nudix na czerwono. (B) Schemat kompleksu Dcp1/2 w konformacji zamkniętej ze związaną cząsteczką ATP. Schemat kolorystyczny taki sam jak w (A). (C) Nałożenie przestrzenne struktur ScDcp2 (pomarańczowy) oraz SpDcp2 (indygo). Rdzeniowa domena EVH1 jest bardzo podobna w obydwu białkach, główne różnice są widoczne w helisie α1. Ponadto w białku ScDcp1 obecna jest kilkunastoaminokwasowa insercja. (D) Nałożenie przestrzenne struktur domen N-końcowych w trzech różnych konformacjach: wolnej (ze struktury SpDcp2 bez SpDcp1, niebieska), otwartej (fioletowa) oraz zamkniętej (szara). Sporządzone na podstawie *Molecular Cell*, 2008, 29, 337-349.

### 1.5.4.1.3.8. Mechanizm wiązania RNA

Przez długi czas mechanizm wiązania RNA przez Dcp2 nie był znany, zauważono jednak, że sekwencja Box B bierze udział w tym procesie.<sup>442</sup> Obszar ten jest bogaty w dodatnio naładowane reszty aminokwasowe, ponadto mapy gęstości elektronowych z badań krystalograficznych pokazały, że miejsce to może wiązać dodatkowe reszty ATP. Pojedyncze (K230A, K231A, K234A, K235A) lub podwójne (K230A K231A, K234A K235A) mutacje punktowe w tym obszarze prowadzą do spadku powinowactwa do RNA oraz obniżenia szybkości dekapingu. Efekty te dla mutacji podwójnych były znacznie silniejsze.<sup>449</sup> Zasugerowano, że mRNA jest wiązane na tym obszarze powierzchni ale brakowało bezpośrednich danych strukturalnych na potwierdzenie tej hipotezy.



**Rys. 1.44.** Wiązanie RNA do Dcp2. (A) Powierzchnia potencjału elektrostatycznego obliczona dla kompleksu Dc1/2 w formie zamkniętej (numer PDB 2QKM). (B) Struktura przestrzenna kompleksu SpDcp1/2 w takiej samej orientacji z zaznaczonym domyślnym miejscem wiązania RNA. (C) Reszty aminokwasowe na fragmencie powierzchni domeny Nudix tworzą naładowany ujemnie kanał wiążący RNA (prawo). Nałożenie zmian przesunięcia chemicznego po związaniu oligonukleotydu z odpornym na hydrolizę analogiem kapu na powierzchnię ScDcp2 (środek) wskazuje na obszar oddziałujący z RNA. Domena N-końcowa (górny fragment środkowej struktury) nie była badana za pomocą NMR, jej struktura to model homologiczny dodany do struktury domeny Nudix wyznaczonej przy użyciu NMR. Na podstawie badań strukturalnych oraz biochemicznych zaproponowano model wiązania RNA (fioletowa linia) do ScDcp2. Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Molecular Cell*, 2008, 29, 337-349 oraz *Molecular Cell*, 2008, 29, 324-336.

Dopiero badania za pomocą NMR pomogły w wyjaśnieniu tej kwestii. Badania spektroskopowe wykonane na ScDcp2 połączone z modelowaniem homologicznym pokazały, że kapowane mRNA faktycznie wiąże się do dodatnio naładowany kanału na powierzchni (Rys. 1.44). Warto zaznaczyć, że w celu przeprowadzenia pomiarów NMR wykorzystano modyfikowany analog kapu,  $m_2^{7,2'-O}GppCH_2pG$ , który jest odporny na działanie Dcp2. Opisywany kanał zaczyna się na grzbietowej powierzchni białka, przesuwając się w kierunku wnęki blisko łącznika pomiędzy domenami i kończy przy krótkiej  $\beta$ -karcie. Obszar ten jest podobny do miejsca wiązania nukleotydów w innych hydrolazach Nudix, jednakże jest on znacznie mniej zachowawczy ewolucyjnie. Sama powierzchnia białka wykazuje podobną geometrię oraz rozkład ładunku w obydwu białkach drożdżowych co sugerują znaczną rolę oddziaływań niespecyficycznych w rozpoznaniu i wiązaniu łańcucha fosforanowego RNA. Wiązanie oligonukleotydów pozbawionych kapu jak i zawierających  $m_2^{7,2'-O}GpCH_2ppG$  powodowało takie same zmiany przesunięcia chemicznego w resztach na powierzchni grzbietowej ScDcp2, za wyjątkiem reszt biorących udział

w katalizie (E153, E198). Ponadto wiązanie RNA jest silne i niezależne od jego sekwencji. Efekty takie nie były obserwowane po dodaniu  $m^7GDP$  lub  $m^7GpppG$  w stężeniu do 1 mM. Wprowadzenie mutacji w obszarze kanału (Y222A, K212A R229A, R170A R229 etc.) prowadzi do co najmniej 5-krotnego spadku w wydajności dekapingu. Badania *in vivo* pokazały natomiast, że podwójne mutacje w tym obszarze prowadzą do znacznych zaburzeń wzrostu co dodatkowo potwierdza, że ma on istotne znaczenie dla działania enzymu.<sup>452</sup> Modelowanie kompleksu RNA-ScDcp2 pokazało, że transkrypt długości 10 nt jest wiązany przez kanał, jednak inne obserwacje *in vitro* pokazały, że dłuższe transkrypty są wiązane lepiej.<sup>453, 454</sup> Sugeruje to, że zachodzenie niespecyficznych interakcji opartych na dyfuzji, takich jak skanowanie RNA, co może mieć znaczenie fizjologiczne (np. lokalizowanie struktury kapu w ciałkach P). Dalszym wsparciem dla tej hipotezy jest duża giętkość konformacyjna Dcp2 opisana w rozdziale 1.5.4.1.3.1.2. *Dynamika konformacyjna i mechanizm działania*).<sup>452</sup>

#### 1.5.4.1.3.9. Kinetyka enzymatyczna

Badania na drożdżowych białkach Dcp2 i ich kompleksach prowadzono przy użyciu metody pojedynczego obrotu, gdzie obserwowano powstawanie  $m^7GDP$  przy różnych stężeniach enzymu (patrz rozdział 1.7.6. *Kinetyka pojedynczego obrotu*). W przypadku wolnej domeny Nudix białka ScDcp2 obserwowano znaczący ( $10^3$ ) spadek wartości  $k_{max}$  w porównaniu do ScDcp1/2 podczas gdy  $K_M$  wzrosła jedynie 2-krotnie. Ponadto bezpośrednie pomiary wiązania oligonukleotydów z niehydrolizowalnym kapem pokazały, że  $K_M$  jest tożsama z  $K_d$  dla RNA. Mutacje w resztach na obszarze kanału wiążącego RNA prowadzą do pewnego wzrostu  $K_M$  co potwierdza, że wiązanie opiera się na szeregu słabych oddziaływań elektrostatycznych. Mutacje w tym obszarze także wpływają na etap katalityczny reakcji dekapingu – efektywności katalityczne mutantów takich jak R170/R229 czy K212/R229 są znacznie niższe co też tłumaczy się zaburzonym wiązaniem substratu.<sup>452</sup>

Badanie z wykorzystaniem oligonukleotydów zawierających niemetylowany kap, GpppG, pokazały, że dla takiego substratu obserwuje się 15-krotny spadek wartości  $k_{max}$  (w porównaniu do oligonukleotydów z  $m^7GpppG$ ). Jednak wartość  $K_M$  wzrosła jedynie 3-krotnie. Natomiast pomiary wiązania oligonukleotydów z niehydrolizowalnym kapem lub pozbawionymi tej struktury wykazały, że wiązanie RNA jest niezależne od struktury końca 5'. Wyniki te wskazują, że rozpoznanie kapu ma miejsce dopiero po przyłączeniu się Dcp2 do RNA. Wykazano także, że w warunkach pojedynczego obrotu etap katalityczny jest limitujący. Natomiast fakt, że powinowactwa kapowanych i niekapowanych oligonukleotydów są bardzo bliskie wskazuje na szybkie uwalnianie produktu. Obecność domeny N-końcowej (regulatorowej) ma kluczowy wpływ na szybkość reakcji jednak nie zmienia powinowactwa ScDcp2 do substratu. Brak tej domeny powoduje około 1000-krotny spadek wydajności etapu katalitycznego co oznacza, że bierze ona bezpośredni lub pośredni udział w hydrolizie kapu.<sup>452</sup>

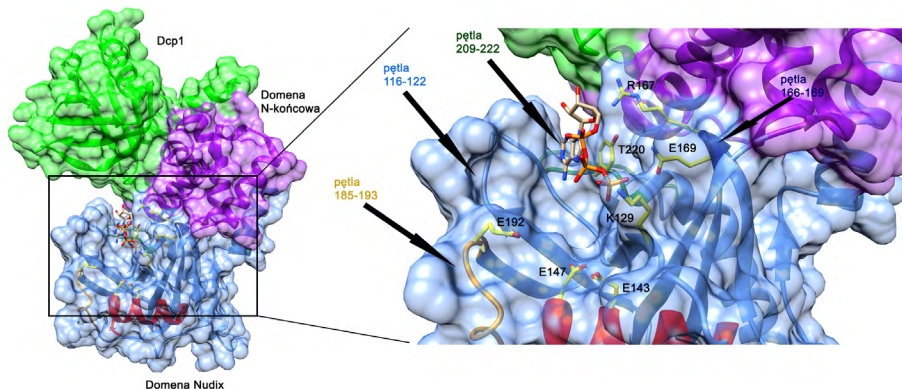
Badania za pomocą mutagenyzy ukierunkowanej pokazały, że dla SpDcp2 szereg reszt aminokwasowych w zachowawczym ewolucyjnie fragmencie domeny regulatorowej (31-52) jest zaangażowanych w proces katalityczny. W szczególności reszty W43 oraz D47 są konieczne do prowadzenia reakcji a ich mutacja do alaniny skutkuje odpowiednio 20-krotnym lub 100-krotnym spadkiem  $k_{max}$  przy praktycznie nie zmienionej wartości  $K_M$  co oznacza, że obecność tych reszt ma kluczowe znaczenie w etapie katalitycznym. Ponieważ białka Dcp1 i Dcp2 z *S. pombe* po ekspresji w *E. coli* mogą zostać oczyszczone i badane oddzielnie to można było zbadać bezpośrednio wpływ Dcp1. Ustalono, że obecność tego białka zwiększa  $k_{max}$  10-krotnie nie mają znaczącego wpływu na  $K_M$ .<sup>455</sup>

#### 1.5.4.1.3.10. Wiązanie ATP przez Dcp2

W kompleksie zamkniętym Dcp1/2 cząsteczka ATP jest ulokowana we wnęce utworzonej przez pętle 166-169, 185-193 i 209-222 oraz przez motyw Nudix (**Rys. 1.45**). ATP oddziałuje z kilkoma resztami w pętlach ale nie przejawia fizycznych interakcji z żadną helisą ani cząsteczką Dcp1. Pomiędzy Y220 a resztą adeniny zachodzą oddziaływania warstwowe, pierścień rybozy oraz grupa fosforanowa  $\alpha$  oddziałują odpowiednio z R167 oraz E169 natomiast fosforan  $\beta$  jest położony blisko K129. Wykazano, że mutacje punktowe (do Ala) w resztach K129, E169 oraz Y220 prowadzą do obniżenia aktywności enzymu co oznacza, że są one zaangażowane w usuwanie kapu.<sup>449</sup> Początkowo zasugerowano, że ATP może imitować resztę kapu lub pierwszej zasady w RNA jednakże późniejsze badania uwidoczniły, że związek ten nie musi być związany przez aktywną katalitycznie konformację Dcp2



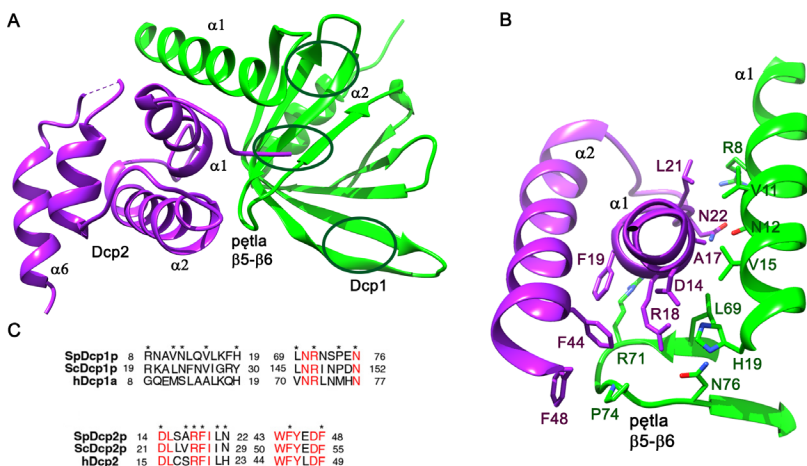
a białko to występuje w dynamicznej równowadze strukturalnej pomiędzy wieloma formami. Zjawiska te zostaną opisane dokładniej w następujących rozdziałach.



**Rys. 1.45.** Wiązanie ATP przez Dcp2. (A) Związana cząsteczka ATP jest ulokowana we wnęce uformowanej przez domenę Nudix oraz fragmenty domeny N-końcowej oraz białka Dcp1. (B) Zbliżenie na wnękę. Cząsteczka nukleotydu jest położona blisko centrum katalitycznego i jest wiązana przez reszty aminokwasowe na kilku pętłach. Sporządzono na podstawie *Molecular Cell*, 2008, 29, 337-349.

#### 1.5.4.1.3.11. Oddziaływanie Dcp2 z Dcp1

Większość badań nad mechanizmem oddziaływań z Dcp1 zostało przeprowadzonych na białkach pochodzących z *S. pombe*. SpDcp1 wiąże się z domeną N-końcową SpDcp2 poprzez oddziaływania hydrofobowe oraz wiązania wodorowe. Reszty zaangażowane w wiązanie są zachowawcze ewolucyjnie pośród gatunków drożdży. Geometria wiązania nie jest w istotny sposób zależna od konformacji SpDcp2. Badania *in vivo* prowadzone na *S. cerevisiae* pokazały, że mutacje w ScDcp2 (D21A, N29A, V24A I24A) blokują powstawanie kompleksu ScDcp1/2. Zarówno w przypadku Dcp1 jak i Dcp2 mutacje reszt biorących udział w tworzeniu kompleksu Dcp1/2 prowadzą do spadku wydajności usuwania kapu. Co ciekawe tak silne oddziaływania są rzadko obserwowane wśród białek EVH1. Ponadto wiązanie z Dcp2 nie blokuje miejsca bogatego w prolinę (ang. PRS, *proline-rich site*) co może oznaczać, że jest tam wiązane inne białko (patrz rozdział 1.5.4.1.3.13. *Oddziaływania Dcp1/2 z innymi białkami*).<sup>449</sup> Badania strukturalne pokazały też, że aminokwasy mające wpływ na szybkość dekapingu ale nie zaangażowane w wiązanie Dcp2 występują na trzech określonych fragmentach powierzchni (Rys. 1.46), które mogą być miejscami oddziaływania z innymi aktywatorami dekapingu.<sup>449</sup>



**Rys. 1.46.** Mechanizm wiązania Dcp1-Dcp2. (A) Diagram Dcp2 (zielony) w kompleksie z Dcp2 (fioletowy). Zielone elipsy oznaczają zachowawcze ewolucyjnie fragmenty powierzchni uczestniczące w wiązaniu kofaktorów dekapingu. (B) Interfejs białko-białko dla Dcp1/2. Zaznaczono reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie. Sporządzono na podstawie *Molecular Cell*, 2008, 29, 337-349.

Reszty odpowiedzialne za wiązanie SpDcp1 z SpDcp2 charakteryzują się dużą zmiennością pośród wyższych eukariontów co może tłumaczyć dlaczego kompleks Dcp1/2 jest u nich mniej stabilny a samo Dcp2 jest mniej zależne od tego białka. Brak wyraźnych fizycznych interakcji pomiędzy Dcp1 i Dcp2 odnotowano w przypadku *C. elegans* oraz *H. sapiens*.<sup>453, 456</sup> W drugim z przypadków konieczny jest udział dodatkowych białek pośredniczących

w powstawaniu Dcp1/2.<sup>343, 457</sup>

Ponieważ SpDcp1 wiąże się z SpDcp2 niezależnie od orientacji przestrzennej oraz samej obecności domeny Nudix to pierwotnie uznano, że białko to może ułatwiać usuwanie kapu przez stabilizację wiązania z RNA. Jednak pomiary z użyciem ITC (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*) pokazały, że SpDcp2 oraz SpDcp1/2 mają podobne powinowactwo do RNA.<sup>449</sup> Dlatego też sugeruje się, że działanie Dcp1 polega raczej na stabilizowaniu aktywnej katalitycznie konformacji Dcp2.

### 1.5.4.1.3.12. Dynamika konformacyjna i mechanizm działania kompleksu

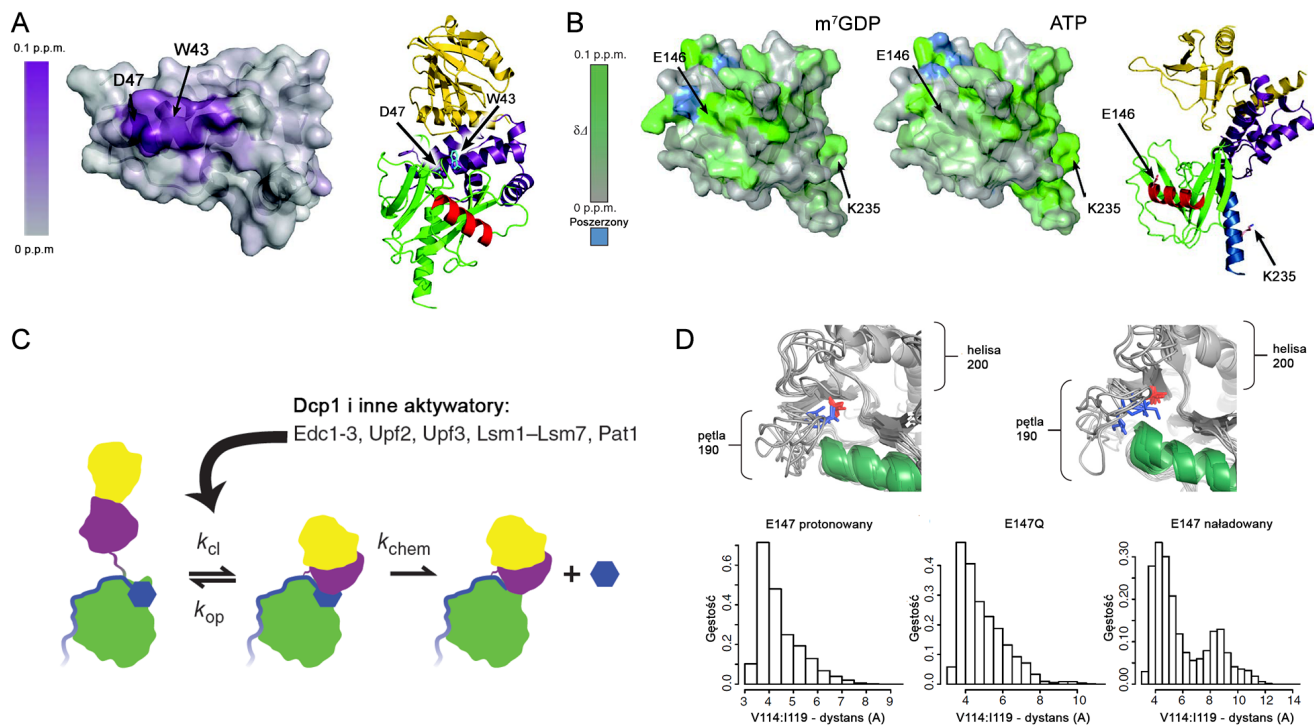
#### 1.5.4.1.3.12.1. Badania za pomocą technik dyfrakcyjnych

Zaobserwowanie dwóch różnych konformacji SpDcp2 w strukturze krystalicznej zasugerowało, że białko to może charakteryzować się znaczną dynamiką konformacyjną. Badania prowadzone z wykorzystaniem techniki SAXS pokazały, że po dodaniu ATP promień żyracji,  $R_g$  oraz maksymalny rozmiar  $D_{max}$  ulegają zmianie ( $R_g = 33,5 \text{ \AA}$ ,  $D_{max} = 105 \text{ \AA}$  vs  $R_g = 28,5 \text{ \AA}$ ,  $D_{max} = 95 \text{ \AA}$ ) co oznacza znaczne ściśnięcie struktury. Podobne wielkości tych parametrów uzyskano dla odpowiednich struktur krystalograficznych SpDcp2. Ponadto niskorozdzielcze modele wyznaczone metodami *ab initio* w oparciu o dane z SAXS przypominają struktury krystalograficzne, co oznacza, że dobrze oddają one konformacje SpDcp1/2 w roztworze. Dodatkowa analiza danych z SAXS i NMR wskazuje na to, że Dcp2 wykazuje się dużą dynamiką konformacyjną w roztworze i poza konformacjami znanymi z danych krystalograficznych mogą istnieć inne struktury o znaczeniu fizjologicznym.<sup>449</sup>

Dalsze pomiary SAXS kompleksu SpDcp1/2 z m<sup>7</sup>GpppA oraz pAA pokazały, że obecność tych nukleotydów w roztworze także prowadzi do kompaktacji struktury kompleksu. Do zajścia takiej zmiany konformacyjnej wymagana jest obecność SpDcp1, w przypadku wolnego SpDcp2 nie zaobserwowano istotnych zmian struktury po dodaniu nukleotydów. Zasugerowano, że jest to związane z faktem istnienia SpDcp2 w równowadze pomiędzy wieloma konformacjami a wiązanie z SpDcp1 może być pomocne w stabilizacji zamkniętej konformacji po związaniu nukleotydu. Giętkość konformacyjna Dcp2 zasugerowała ponadto, że białka oddziałujące z tym enzymem mogą mieć znaczący wpływ na jego strukturę, stabilizacja aktywnej katalitycznie konformacji przez partnerów białkowych może być mechanizmem tłumaczącym działanie aktywatorów dekapingu zarówno *in vitro* jak *in vivo*.<sup>449</sup> Pomiary SAXS kompleksu Dcp1/2 wykonane dla mutantu W43A pokazały brak zmian w  $R_g$  oraz  $D_{max}$  po dodaniu m<sup>7</sup>GpppA co sugeruje, że reszta ta jest kluczowa dla wiązania nukleotydów przez SpDcp2. Z drugiej strony mutacja w reszcie D167 istotnej dla wiązania ATP nie blokowała ściśnięcia struktury z czego wynika że i) W43 odgrywa istotną rolę w promowaniu zmian konformacyjnych koniecznych dla zajścia etapu katalitycznego ii) D167 nie jest zaangażowane w ten proces iii) konformacja ze związanym ATP oraz konformacja aktywna katalityczne mogą być odmienne od siebie.<sup>455</sup>

#### 1.5.4.1.3.12.2. Wiązanie nukleotydów i centrum katalityczne

Ponieważ przejście do zamkniętej konformacji Dcp2 jest promowane przez obecność nukleotydu to uznano, że ten proces zachodzi poprzez interakcje domeny regulatorowej oraz katalitycznej z resztą 5' RNA kapu. Za pomocą spektroskopii NMR zbadano wiązanie się szeregu nukleotydów do poszczególnych domen Dcp2 (**Rys. 1.47**). Wykazano, że zarówno m<sup>7</sup>GDP (produkt reakcji dekapingu) jak i m<sup>7</sup>GpppA są rozpoznawane i wiązane przez zachowawczy ewolucyjnie fragment domeny regulatorowej. Dane uzyskane z miareczkowań <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC dobrze korelują z prostym modelem wiązania (forma apo oraz kompleks białko-ligand, jedno miejsce wiązania) na podstawie którego wyznaczono  $K_d$  dla m<sup>7</sup>GDP wynosząca 12 mM a podobną wartość uzyskano dla m<sup>7</sup>GpppA. Zarówno GDP, ATP jak i ApppA nie wykazały istotnego powinowactwa do domeny regulatorowej. Oznacza to, że miejsce wiążące jest specyficzne dla m<sup>7</sup>G natomiast obecność reszt W43 oraz D47 jest kluczowa dla wiązania.<sup>455</sup> W przypadku domeny katalitycznej zauważono, że profile wiązania dla ATP oraz m<sup>7</sup>GDP są odmienne. Dodatek m<sup>7</sup>GDP wpłynął na zmiany przesunięć reszt aminokwasowych nie tylko na obszarze wiążącym RNA lub ATP ale także miał wpływ na helisę katalityczną. Wartość  $K_d$  dla E146 wyniosła 12 mM natomiast powinowactwo do reszt wiążących RNA było słabsze.



**Rys. 1.47.** Wiązanie nukleotydów do Dcp2 i proponowany mechanizm działania enzymu. **(A)** Domena regulatorowa Dcp2 posiada specyficzne miejsca wiążące kap. Na powierzchnię białka nałożono gradient reprezentujący zmianę przesunięcia chemicznego reszt aminokwasowych po dodaniu 30 mM m<sup>7</sup>GDP. Zaznaczono reszty W43 oraz D47 odpowiedzialne za wiązanie liganda. Żółty kolor reprezentuje Dcp1, fioletowy domenę regulatorową, zielony domenę katalityczną a czerwony motyw Nudix **(B)** Domena katalityczna Dcp2 oddziałuje z m<sup>7</sup>GDP w miejscu katalitycznym a także z szeregiem nukleotydów wzdłuż kanału wiążącego RNA. Na powierzchnię domeny nałożono gradient reprezentujący zmianę przesunięcia chemicznego po dodaniu 30 mM m<sup>7</sup>GDP lub ATP. Reszty, których sygnał był mocno poszerzony w widmie HSQC zaznaczono na błękitno. Zastosowano taki sam schemat kolorystyczny jak w **A**, region wiążący RNA zaznaczono na niebiesko. **(C)** Reakcja dekapingu wymaga powstania kompozytowego miejsca katalitycznego, proces izomeryzacji z kolei wymaga wiązania kapu przez obydwie domeny Dcp2. Po powstaniu miejsca katalitycznego zachodzi hydroliza wiązania pirofosforanowego i uwolnienie produktów. **(D)** Symulacje dynamiki molekularnej pokazują zmiany konformacyjne po uprotonowaniu E147 (ogólny kwas) w SpDcp2. Symulacja dla uprotonowanego E147 wskazują na małą ruchliwość konformacyjną w pętli 190 (górze, lewo) natomiast symulacja dla ujemnie naładowanego E147 uwiadczenia dużą giętkość pętli 190. Motyw Nudix zaznaczono na zielono, V114 na czerwono a I193 na niebiesko. Histogramy wzajemnej odległości wymienionych reszt (dół) pokazują wzmoczoną ruchliwość pętli 190 w sytuacji gdy E147 jest obdarzony ujemnym ładunkiem. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17, 1096-1101 oraz *Structure*, 2013, 21, 1571-1580.

Ponieważ powinowactwo m<sup>7</sup>GDP do obydwu domen jest bardzo podobne to zasugerowano, że wiązanie kapu jest procesem uzgodnionym w którym zaangażowane są różne fragmenty białka. Na skutek tego procesu powstaje kompozytowe miejsce katalityczne powstałe dzięki ściśnięciu struktury Dcp2 po związaniu kapu. Zebrane dane doświadczalne wskazują, że konformacja SpDcp2 ze związanym kapem jest odmienna od konformacji związanej z ATP. i) Reszty wiążące kap – W43 oraz D47 są ukryte we wnętrzu struktury kompleksu Dcp2-ATP i nie biorą udziału we wiązaniu nukleotydu. ii) Obszary wiążące m<sup>7</sup>GDP są odległe od siebie o 20 Å w strukturze krystalicznej. iii) Reszta W43 jest zaangażowana w oddziaływanie warstwowe z R167 jednak mutacja tej ostatniej nie ma wpływu na aktywność katalityczną *in vitro*. iv) W strukturze kompleksu Dcp2-ATP reszty 244-266 domeny katalitycznej tworzą helisę oddziałującą z domeną regulatorową jednak jej usunięcie nie ma wpływu na aktywność katalityczną ani kompaktę konformacji *in vitro*.<sup>455</sup>

Do tej pory nie udało się ustalić czy konformacja ze związanym ATP jest istotna fizjologicznie w procesie usuwania kapu jednakże jest łatwo obserwowalna *in vitro*. Uważa się, że Dcp2, podobnie jak wiele innych białek wiążących kwasy nukleinowe, może przyjmować szereg odmiennych konformacji przechodzących jedna w drugą.<sup>224</sup> Wiązanie różnych ligandów może zatem skutkować stabilizacją jednego z tych stanów konformacyjnych.<sup>455</sup>

Zaproponowano model działania Dcp2, w którym etap katalityczny składa się z co najmniej dwóch etapów elementarnych, najpierw zachodzi izomeryzacja do aktywnej formy a następnie hydroliza wiązania

pirofosforanowego (**Rys. 1.47C**). W formie otwartej miejsce katalityczne jest niekompletne co znacznie utrudnia proces dekapingu. Dopiero rozpoznanie kapu przez obydwie domeny umożliwia zmianę konformacji, utworzenie miejsca katalitycznego i zajście reakcji chemicznej. Opisany proces wykazuje pewne podobieństwa do mechanizmu działania innego białka hydrolizującego kap, DcpS (patrz rozdział 1.5.4.1.4.1. *Pirofosfataza DcpS*).

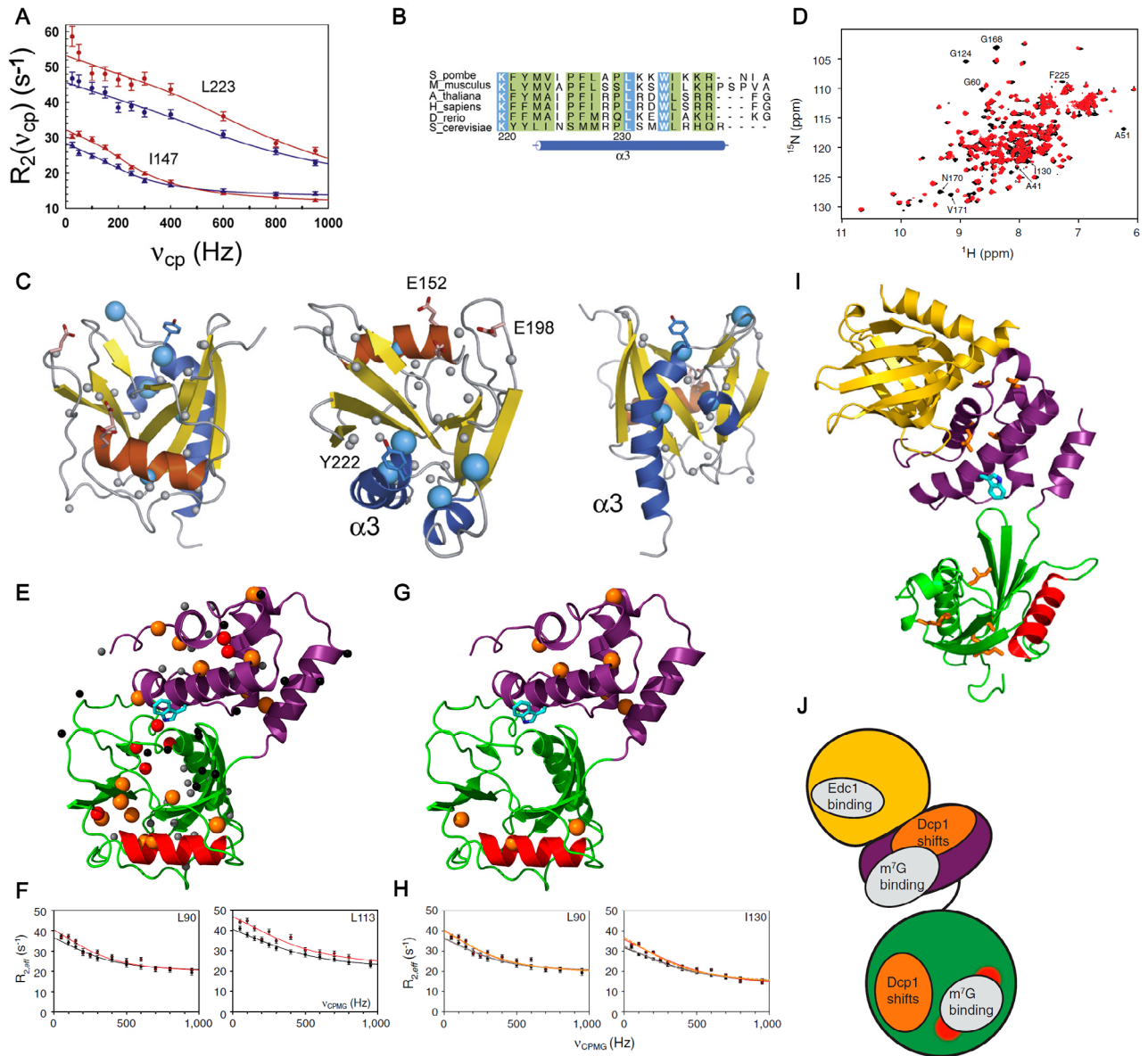
### 1.5.4.1.3.12.3. Badania za pomocą NMR

W celu dokładniejszego poznania dynamiki konformacyjnej Dcp2 przeprowadzono szereg badań z wykorzystaniem spektroskopii NMR (**Rys. 1.48A-C**). Badania wolnej (skali  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  s) dynamiki konformacyjnej wykonano na obydwu białkach drożdżowych. W przypadku ScDcp2 zastosowano eksperyment CPMG na wolnej domenie Nudix znakowanej  $^{13}\text{C}$  na grupach metylowych I( $\delta_1$ ), L i V. Analiza profili relaksacji wskazała na istotną giętkość konformacyjną obszaru kanału wiążącego RNA. Zauważono także, że proces wiązania RNA przebiega przez uzgodniony ruch konformacyjny obejmujący wiele reszt aminokwasowych. Dla porównania obszary we wnęce wiążącej ATP były relatywnie sztywne.<sup>452</sup>

W celu lepszego poznania mechanizmu stojącego za przejściem konformacyjnym Dcp2 do postaci aktywnej także wykorzystano spektroskopię NMR, badania prowadzono na białku z *S. pombe*. Eksperymenty HSQC pokazały, że wprowadzenie mutacji do reszty W43 blokuje ruchliwość konformacyjną białka. Dokładniejsze badania polegały na przeprowadzeniu eksperymentów CPMG stosując schemat znakowania  $^{13}\text{C}$  grup metylowych ILVMA. Zaobserwowano, że około jednej trzeciej grup metylowych podlega zmianom konformacyjnym w skali  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  s, które są rozmieszczone w obydwu domenach białka. Co istotne duże zmiany konformacyjne, takie jak przejście do konformacji zamkniętej zachodzą pod nieobecność nukleotydów wiązanych przez białko. Dopiero mutacja W43 ogranicza dynamikę SpDcp2. Pokazano także, że ruchy konformacyjne badanych reszt metylowych nie mają charakteru lokalnego tylko są procesami uzgodnionymi mającymi wkład do globalnych zmian konformacji SpDcp2.<sup>458</sup>

Podobne pomiary NMR (eksperyment HMQC) przeprowadzone na kompleksie SpDcp1/2 i jego mutantach udowodniły, że reszta W43 nie ma dużego przyczynku do wiązania Dcp1 i związanych z tym zmian konformacyjnych (**Rys. 1.48D-J**). Jednakże obecność Dcp1 ma także wpływ na dynamikę konformacyjną domeny katalitycznej. W tym przypadku mutacja W43A prowadzi do spadku ruchliwości reszt aminokwasowych w kompleksie SpDcp1/2. Oznacza to, że ma miejsce zależność pomiędzy W43 oraz Dcp1. Białko to może bezpośrednio oddziaływać z domeną katalityczną Dcp2, do czego konieczna jest reszta W43. Jeżeli zostanie ona zmieniona do Ala to Dcp1 traci zdolność do stymulacji aktywności Dcp2. Domena EVH1 białka Dcp1 jest potrzebna do wiązania koaktywatorów dekapingu takich jak Edc1. Wykazano, że w przypadku ScDcp1/2 mutacja reszty W50 (odpowiednik W43 w SpDcp2) znacznie obniża aktywację dekapingu przez Edc1 (z 13-krotnej do 3-krotnej).<sup>458</sup>

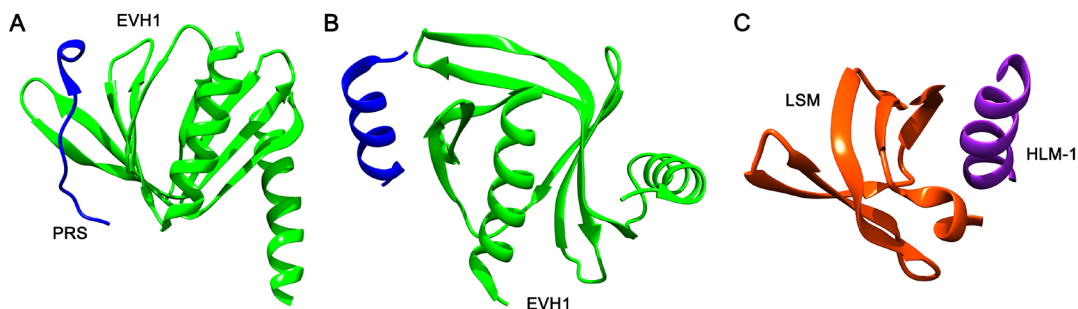
Dynamika strukturalna Dcp2 ma przełożenie na jego aktywność katalityczną. Dla wielu enzymów takich jak reduktaza dihydrofolianu<sup>459</sup> czy cyklofilina A<sup>460</sup> etapem limitującym szybkość reakcji jest właśnie przejście konformacyjne do aktywnej formy. Ponadto enzymy często przejawiają mechanizm selekcji konformacyjnej, co przejawia się dynamiką konformacyjną wzdłuż współrzędnej reakcji nawet gdy nie wiążą substratu.<sup>460, 461</sup> W przypadku Dcp2 uwalnianie produktu jest szybkie a etapem limitującym szybkość cyklu reakcyjnego jest etap katalityczny. Ponieważ szybkość przejścia konformacyjnego do formy aktywnej jest znacznie większa niż  $k_{\text{cat}}$  ( $\sim 2,3 \text{ s}^{-1}$  vs  $\sim 0,2 \text{ min}^{-1}$ ) to należy założyć, że czynnikiem limitującym aktywność Dcp2 jest udział aktywnej konformacji w populacji a nie szybkość interkonwersji pomiędzy stanami konformacyjnymi. Jest bardzo prawdopodobnym, że białka wiążące się z Dcp2 mają istotny wkład w regulację udziału poszczególnych form tego białka, aktywatory dekapingu mogą stabilizować postać aktywną katalitycznie. By potwierdzić te założenia konieczne będzie przeprowadzenie badań nad dynamiką konformacyjną Dcp1/2 w obecności substratów lub innych ligandów wiążących się z centrum katalitycznym.



**Rys. 1.48.** Zarys dynamiki konformacyjnej Dcp2. (A) Wybrane krzywe relaksacji dla domeny Nudix znakowanych  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  w grupach metylowych I( $\delta_1$ ), L i V zarejestrowane przy 600 MHz (niebieski) lub 800 MHz (czerwony). Sygnał grupy metylowa  $\delta_1$  dla L223 (Box B) jest mocno poszerzony przez dynamikę w skali  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  s podczas gdy sygnał I147 (motyw Nudix) jest mniej zaburzony. (B) Przyrównanie sekwencji motywu Box B dla szeregu organizmów. (C) Szybkości wymiany ( $k_{\text{ex}}$ ) pomiędzy stanami konformacyjnymi zawarto w średnicy sfer naniesionych w miejsca grupy  $\text{C}_\beta$  w resztach I, L i V w domenie Nudix (numer PDB 2JVB). Niebieskie sfery oznaczają ruchy widoczne w zakresie czasowym  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  s podczas gdy szare sfery oznaczają grupy metylowe niewidoczne we wspomnianych przedziale czasowym. (D) Mutacja w W43 zmniejsza rezonansowe poszerzenie sygnałów w widmie  $^{15}\text{N}$  HSQC. Pokazano przesunięcia dla naturalnego białka SpDcp2<sub>1-243</sub> (czerwony) oraz SpDcp2<sub>1-243</sub> W43A. Zaznaczono wybrane reszty, których przesunięcie chemiczne po wprowadzeniu mutacji uległo istotnej zmianie. (E) Analiza ilościowa dynamiki łańcucha białkowego w SpDcp2<sub>1-243</sub> przy użyciu znakowania ILVMA. Grupy metylowe oznaczono jako sfery naniesione na strukturę krystalograficzną (numer PDB: 2QKM). Na pomarańczowo zaznaczono grupy  $\text{CH}_3$  o znaczącym przesunięciu, na czerwono oznaczono grupy o słabym sygnale, na szaro oznaczono grupy nieaktywne. Domenę N-końcowa oznaczono na fioletowo, domenę katalityczną na zielono, motyw Nudix na czerwono a W43 na cyjanowo. (F) Wybrane krzywe relaksacji przy 800 MHz (czarne) lub 900 MHz. (G) Obydwie domeny SpDcp2 biorą udział w kolektywnych ruchach konformacyjnych. Pokazano dziewięć reszt z klastra czternastu reszt zaangażowanych w takie przejście konformacyjne. (H) Wybrane krzywe relaksacji CPMG dla przejścia kolektywnego. (I) Dcp1 powoduje przesunięcie reszt aminokwasowych w Dcp2 niezwiązanych bezpośrednio z jego wiązaniem do tego białka. Reszty ulegające przesunięciu oznaczono na pomarańczowo, Dcp1 na żółto. (J) Schemat Dcp1/2 z zaznaczonym miejscem wiązania Edc1, reszty kapu (szare) oraz obszarami zaburzonymi w NMR przez Dcp1 (pomarańczowe). Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Molecular Cell*, 2008, 29, 324-336 oraz *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, 2012, 109, 2872-2877.

### 1.5.4.1.3.13. Oddziaływania Dcp1/2 z innymi białkami

Kompleks Dcp1/2 jest stymulowany przez szereg czynników białkowych (patrz **Rys. 1.49** dla wybranych przykładów). Pierwszymi opisanymi czynnikami tego rodzaju były Edc1 i Edc2, które wiążą się bezpośrednio do RNA i stymulują reakcję dekapingu. Białka te występują u drożdży a ich homologi nie zostały wykryte u wyższych eukariontów.<sup>462</sup> Z kolei białko Edc3 wiąże się bezpośrednio z kompleksem Dcp1/2 i jest zachowawcze ewolucyjnie pośród eukariontów.<sup>372</sup> Wyższe eukarionty posiadają też białko Edc4, mechanizm jego działania nie został wyjaśniony jednak wiadomo, że pośredniczy ono we wiązaniu Dcp1 z Dcp2.<sup>343, 352</sup> Drożdżowe białko Pat1 także stymuluje dekaping *in vitro*, jego ortologi u *H. sapiens* i *D. melanogaster* asocjują z innymi białkami zaangażowanymi w degradację mRNA takimi jak kompleks Lsm1-7 oraz pośredniczącą w usuwaniu kapu helikazą Dhh1 (Rck/p54 u człowieka, Me31B u *D. melanogaster*).<sup>370, 463, 464</sup> Do tej pory nie rozstrzygnięto kwestii czy aktywatory dekapingu działają globalnie czy są zależne od określonego mRNA. Badania transkryptomyczne prowadzone na *D. melanogaster* wskazują, że rola aktywatorów do pewnego stopnia jest globalna ale niektóre (np. Edc3) działają bardziej specyficznie.<sup>344</sup>



**Rys. 1.49.** Wiązanie Dcp1/2 z koaktywatorami dekapingu na wybranych przykładach. (A) kompleks Dcp1-PNRC1, domena EVH1 z Dcp1 oddziałuje z sekwencją bogatą w prolinę (PRS) w drugim białku. (B) Kompleks Dcp1-Xrn1, podobny mechanizm wiązania jak w A. (C) Wiązanie się domeny HLM1 z Dcp2 do domeny LSM z białka Edc3.

W przypadku szeregu białek wiążących się z Dcp1/2 przeprowadzono badania strukturalne pozwalające poznać sposób wiązania oraz mechanizm działania (Rys. 48). Domena EVH1 białka Dcp1 wiąże się z Edc1 oraz Edc2<sup>375</sup>, poznana została też struktura krystalograficzna białka PNRC2 z Dcp1, oba białka mogą aktywować dekaping a stymulacja ma charakter synergistyczny. Ponadto PNRC2 może bezpośrednio wiązać się z Dcp2.<sup>465</sup> Poznano także struktury białek takich jak Edc3, ScDhh1, DDX6-C oraz Pat1C, w niektórych przypadkach w kompleksach z innymi białkami.<sup>372, 466-468</sup> Ponadto prowadzono badania nad rekonstrukcją ciałek P *in vitro* z wykorzystaniem Dcp2 oraz wspomnianych wcześniej białek.<sup>469</sup> Z uwagi na złożoność powyższych zagadnień oraz dość luźny związek z badaniami objętymi w niniejszej rozprawie nie będą one dalej dyskutowane.

### 1.5.4.1.3.14. Dcp2 jako cel terapeutyczny

Niedawne doniesienia wskazują na to, że zaburzenia w funkcjonowaniu Dcp2 mogą prowadzić do wystąpienia szeregu schorzeń. Białko to ma wpływ na ekspresję grupy genów związanych z odpowiedzią antywirusową w której pośredniczy interferon typu 1 (IFN). Komórki mysie z obniżonym poziomem Dcp2 wykazywały istotnie większą ekspresję białek zaangażowanych w odpowiedź antywirusową. Mechanizm ten wiąże się ze zwiększoną stabilnością mRNA kodującego czynnik transkrypcyjny IRF-7 jednak dokładny sposób regulacji aktywności Dcp2 względem tego mRNA nie został jeszcze poznany. Autorzy uważają, że selektywna inhibicja Dcp2 może pełnić rolę terapii pomocniczej w sytuacjach gdy silna odpowiedź antywirusowa jest niepożądana.<sup>470</sup>

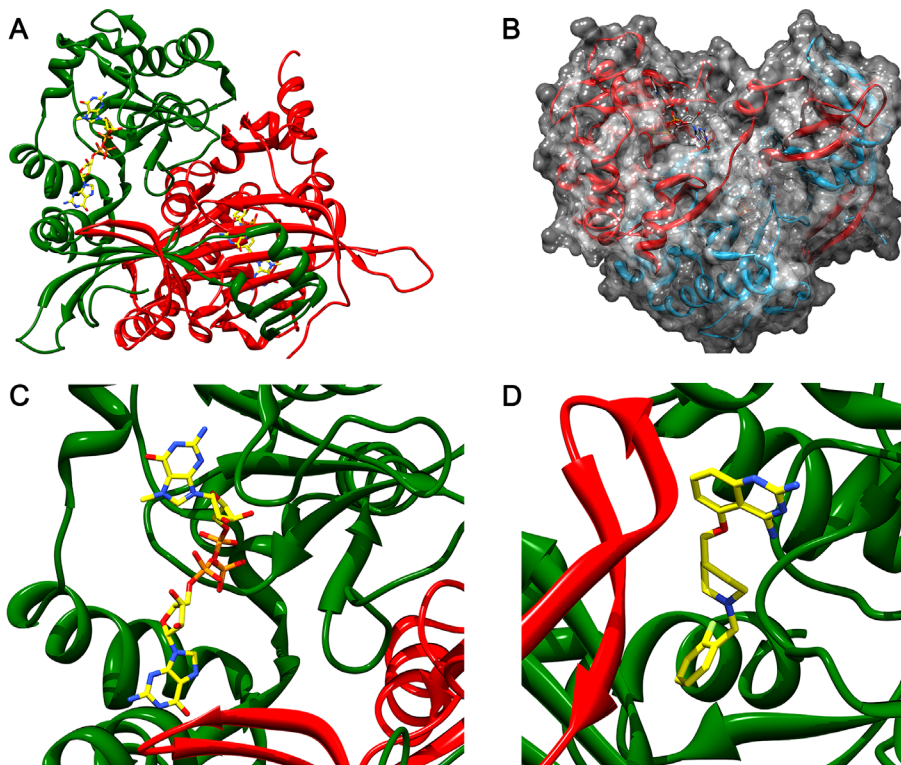
Inne badania wiążą aktywność Dcp2 z kontrolą jakości składania cząsteczek U1 snRNA. Mechanizm ten ma duże znaczenie fizjologiczne bowiem uważa się, że gromadzenie się nieprawidłowych cząsteczek RNP prowadzi do rozwoju szeregu zaburzeń neurologicznych określanymi mianem „chorób składania RNP” (ang. *RNP assembly diseases*). Dla komórek drożdżowych wykazano, że w warunkach fizjologicznych nieprawidłowe U1 snRNA są degradowane zarówno w ścieżce 3'-5' jak i 5'-3' które są od siebie niezależne. Natomiast w komórkach ssaczych

jedyną aktywną ścieżką jest 5'-3', aktywność Dcp2 jest kluczowa dla degradacji tego RNA. Zaproponowano, że regulacja aktywności białek regulujących ścieżki degradacji snRNA może być nową strategią terapeutyczną w leczeniu zaburzeń związanych z nieprawidłowymi RNP.<sup>471</sup>

#### 1.5.4.1.4. Inne białka degradujące kap

##### 1.5.4.1.4.1. Pirofosfataza DcpS

Enzym DcpS należy do rodziny pirofosfotaz HIT, posiadających w centrum katalitycznym zachowawczy ewolucyjnie układ trzech reszt His nazywany triadą histydynową.<sup>350</sup> DcpS hydrolizuje kapowane oligonukleotydy, będące pozostałościami po degradacji 3'-5', oraz małowzrostkowe analogi kapu takie jak m<sup>7</sup>GpppG lub m<sup>7</sup>GTP. Białko to, w przeciwieństwie do Dcp1/2, katalizuje reakcję hydrolizy wiązania pirofosforanowego w pozycji β/γ, zatem produktami hydrolizy są m<sup>7</sup>GMP i odpowiedni 5'-difosforan. Do tej pory rozwiązano kilka struktur krystalograficznych DcpS związanych z m<sup>7</sup>GDP lub m<sup>7</sup>GpppN pokazujących, że białko występuje pod postacią niesymetrycznego homodimeru, natomiast kataliza wymaga zajścia dynamicznych zmian strukturalnych w obrębie całego białka (Rys. 1.50)<sup>472, 473</sup>. Opisane wyniki dotyczą białek z wyższych eukariontów jednak w świetle obecnej wiedzy drożdżowy homolog DcpS, białko Dcs1 ma takie same funkcje, zarówno w *S. cerevisiae* jak i *S. pombe*.<sup>306</sup>



**Rys. 1.50.** Struktura pirofosfatazy DcpS. (A) Nieaktywny katalitycznie mutant w postaci heterodimeru związany z analogiem kapu m<sup>7</sup>GpppG. (B) Powierzchnia molekularna opisanego heterodimeru. (C) Zbliżenie na miejsce katalityczne ze związanym nukleotydem. (D) Zbliżenie na miejsce katalityczne ze związanym syntetycznym inhibitorem DcpS.

Początkowo uważano, że DcpS nie pełni znaczącej roli w metabolizmie mRNA jednakże seria nowych badań prowadzi do zmiany tego poglądu. (i) Enzym ten występuje nie tylko w cytoplazmie, gdzie hydrolizuje resztkowe m<sup>7</sup>G-oligonukleotydy, ale także w jądrze komórkowym pośrednicząc w splicingu mRNA. Występowanie DcpS w obydwu wspomnianych przedziałach komórkowych sugeruje, że może on być modulatorem trwałości mRNA.<sup>474</sup> (ii) Wykazano, że w połączeniu z innymi białkami takimi jak egzonukleaza Xrn1 może on pośredniczyć w selektywnej degradacji określonych transkryptów.<sup>475</sup> (iii) Inne badania wskazały na to, że określone mutacje w ludzkim DcpS są skorelowane z pewnymi schorzeniami dziedzicznymi objawiającymi się ograniczeniami poznawczymi.<sup>476, 477</sup> (iv) Pierwotnie uważano, że DcpS jest zdolne do hydrolizy m<sup>7</sup>GDP (powstającego na skutek aktywności Dcp1/2) jednakże nowsze badania pokazały, że związek ten jest w istocie inhibitorem DcpS.<sup>478</sup> Biorąc pod uwagę, że Dcp2 z niektórych organizmów także jest negatywnie regulowane przez m<sup>7</sup>GDP<sup>444</sup> to można założyć, że interakcje pomiędzy ścieżkami degradacji 3'-5' oraz 5'-3' mogą być bardziej złożone niż obecnie się uważa.

(v) Kolejne rezultaty wskazują na rolę DcpS w występowaniu SMA (ang. *Spinal Muscular Atrophy*), wrodzonej choroby neurodegeneracyjnej. Rola DcpS nie została jeszcze dobrze poznana, postuluje się że może on działać jako regulator transkrypcji. Przeprowadzono też badania przesiewowe mające na cel znalezienie inhibitorów tego enzymu. Uzyskano także strukturę DcpS z pochodną chinoliny będącą silnym inhibitorem.<sup>479</sup> W innej pracy uzyskano bibliotekę związków mogących posłużyć do dalszych badań nad DcpS oraz pokrewnych białek.<sup>480</sup> Po podsumowaniu uzyskanych wyników (wraz z opisanymi w rozdziale 1.5.4.1.3.14 *Nowo poznane funkcje Dcp1/2*) można założyć, że istnieje głębszy związek pomiędzy zaburzeniami w obiegu mRNA a rozwojem i funkcjonowaniem układu nerwowego.

#### 1.5.4.1.4.2. Inne białka z rodziny Nudix

Białka z grupy Nudt występują w wyższych eukariontach, do tej pory prowadzono badania nad białkiem z *Xenopus laevis* (X29) oraz jego ssaczym ortologiem Nudt16. Obecnie w bazie PDB zdeponowano kilka struktur krystalograficznych, zarówno X29 jak i Nudt16 jednak same badania nad ich strukturą i mechanizmem działania nie zostały (poza jednym doniesieniem) szerzej opublikowane.<sup>481</sup> Wykazano ponadto, że sześć innych ssaczyc białek z rodziny Nudix jest aktywnych katalitycznie względem RNA. Nudt17 oraz Nudt19 mają aktywność zbliżoną do Dcp2 podczas gdy inne białka (Nudt2, Nudt3, Nudt12 i Nudt15) mają mniejszą specyficzność cięcia. Do tej pory nie udało się poznać roli tych białek *in vivo*.<sup>482</sup>

#### 1.5.4.1.4.3. Rai1 i białka spokrewnione

Enzymy z tej grupy prawdopodobnie mają pochodzenie wirusowe i występują w drożdżach oraz wyższych eukariontach. Uważa się, że biorą one udział w regulacji jakości syntezy kapu usuwając nieprawidłowe transkrypty pre-mRNA (patrz rozdział 1.5.3.5.4. *Nieprawidłowo kapowane transkrypty i jądrowe mechanizmy kontroli jakości*).<sup>386</sup> Drożdżowe białko Rai1 zostało zbadane jako pierwsze. Białko to ma silne powinowactwo do nukleazy Rat1 i tworzy z nią stabilny kompleks. Badania biochemiczne i strukturalne pokazały, że posiada ono aktywność pirofosforohydrolazy usuwającej pirofosforan z ppp-RNA czyniąc je podatnym na degradację przez nukleazy takie jak Rat1.<sup>483</sup> Ponadto Rai1 posiada nietypową zdolność do usuwania całej struktury niemetylowanego kapu z transkryptu mRNA, jego aktywność względem prawidłowej struktury kapu jest znacznie ograniczona.<sup>383</sup> Inny drożdżowy enzym, Ydr370C (Dxo1) jest słabym homologiem Rai1 i także posiada zdolność usuwania niemetylowanego kapu. Enzym ten ponadto działa też jako procesywna 5'-3' egzonukleaza co pozwala mu samodzielnie degradować nieprawidłowe pre-mRNA. Co ciekawe, w odróżnieniu od Rai1, Dxo nie posiada aktywności pirofosforohydrolazy RNA.<sup>384</sup>

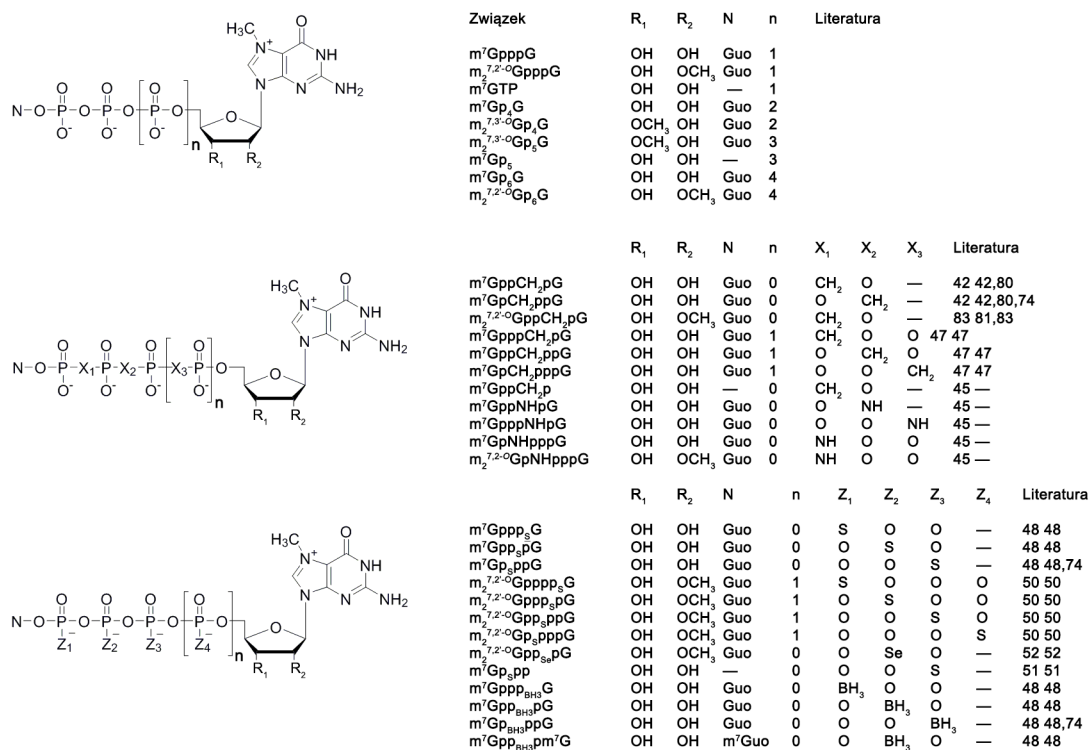
Występującym u ssaków odpowiednikiem wspomnianych enzymów jest Dom3Z (DXO). Spośród poznanych białek Dxo posiada ono najbardziej uniwersalny zakres aktywności enzymatycznych ponieważ jest zdolne do degradacji zarówno Gppp-RNA oraz ppp-RNA oraz wykazuje aktywność 5'->3' egzonukleazy. Badania strukturalne kompleksów DXO z kapowanymi oligonukleotydami oraz m<sup>7</sup>GpppG oraz ukierunkowana mutageniza pokazały, że wszystkie aktywności katalityczne tego białka są prowadzone przez jedno centrum katalityczne. Do tej pory nie prowadzono badań nad mechanizmem działania Rai1 lub Dxo.



## 1.6 Otrzymywanie i zastosowania analogów kapu

### 1.6.1. Przegląd modyfikacji w łańcuchu fosforanowym

Do tej pory otrzymano szereg analogów kapu zawierających modyfikację w łańcuchu fosforanowym (**Rys. 1.51**). Do modyfikacji tych należą wydłużenie łańcucha fosforanowego oraz wprowadzenie grup funkcyjnych w mostkowe atomy tlenu (podstawienie O-CH<sub>2</sub> oraz O-NH) lub niemostkowe atomy tlenu (podstawienia O-S, O-BH<sub>3</sub> oraz O-Se). W większości przypadków udało się dobrze opisać wpływ modyfikacji na właściwości biochemiczne tych związków takie jak powinowactwo do eIF4E czy wpływ na właściwości translacyjne mRNA zawierającego określony analog kapu.<sup>484-493</sup>

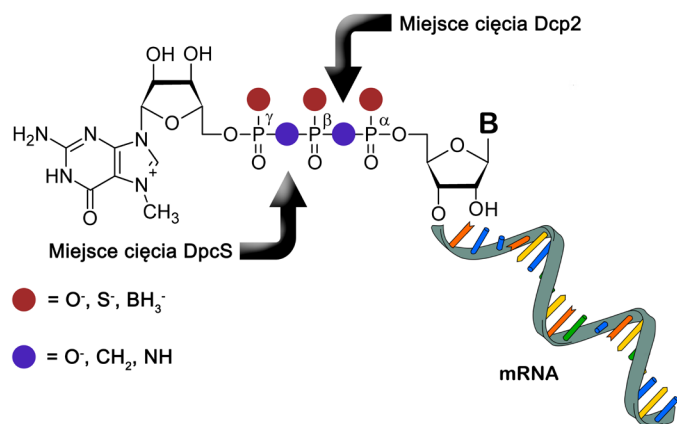


**Rys. 1.51.** Przykładowe analogi kapu zawierające modyfikacje w łańcuchu fosforanowym.

#### 1.6.1.1. Modyfikacje w łańcuchu fosforanowym a odporność na degradację

Enzymy degradujące strukturę kapu wykazują regiospecyficzną względem miejsca hydrolizy mostka 5',5' trifosforanowego (**Rys. 1.52**). Jak wspomniano wcześniej Dcp2 hydrolizuje wiązanie pirofosforanowe pomiędzy atomami fosforu  $\alpha/\beta$  prowadząc do uwolnienia m<sup>7</sup>GDP, natomiast DcpS rozcina wiązanie pirofosforanowe pomiędzy atomami fosforu  $\beta/\gamma$ .<sup>488</sup> Prowadzono także badania nad specyficznością enzymów z klasy Nudt jednak nie są one do tej pory rozstrzygające.<sup>382, 482</sup> Dalsza dyskusja zostanie poświęcona głównie białku Dcp2. Do tej pory wszystkie badania dotyczące podatności modyfikowanych analogów kapu na działanie Dcp2 były prowadzone na ludzkim białku hDcp2, które działa efektywnie także pod nieobecność Dcp1. Białko to, w odróżnieniu od DcpS wykazuje dużą tolerancję na modyfikacje w pierścieniu cukrowym m<sup>7</sup>Guo. Wprowadzanie modyfikacji takich jak metylacja grupy 2'OH lub 3'OH nie powoduje zauważalnego spowolnienia reakcji enzymatycznej.<sup>493</sup>

Modyfikacje w pozycjach mostkowych zapewniają całkowitą odporność na cięcie enzymatyczne, zarówno przez Dcp2 jak i DcpS. Enzymy te nie są zdolne do efektywnej hydrolizy wiązań P-C oraz P-N a z uwagi na regiospecyficzność prowadzenie modyfikacji imidodifosforanowej lub metylenobisfosfonianowej w odpowiednią pozycję pozwala na uzyskanie analogu kapu selektywnie odpornego na działanie danego enzymu. Dlatego też analogi postaci m<sup>7</sup>GpXppG są odporne na działanie Dcp2 natomiast analogi postaci m<sup>7</sup>GppXpG na działanie DcpS (X = NH lub CH<sub>2</sub>).<sup>486, 487, 492, 493</sup> do tej pory nie testowano analogów posiadających grupy CCl<sub>2</sub> lub CF



**Rys. 1.52.** Degradacja struktury kapu przez enzymy Dcp2 oraz DcpS. Modyfikacje mostka 5',5' trifosforanowego mogą przyczynić się do mniejszej podatności na działanie tych enzymów.

z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że także będą wykazywały odporność na degradację enzymatyczną. Wprowadzenie modyfikacji niemostkowych nie ma tak oczywistego wpływu na odporność względem Dcp2. Obecność atomu siarki lub grupy boranowej w pobliżu wiązania hydrolizowanego przez Dcp2 może wprowadzić dodatkową zawadę steryczną oraz zmienić rozkład ładunku oraz geometrię wiązań wodorowych w kompleksie kap-białko przez co borano- i tiofosforanowe analogi kapu mogą wykazywać obniżoną podatność na działanie Dcp2. Tiofosforanowe analogi kapu,  $m_2^{7,2'-O}Gpp_s pG$  oraz  $m_2^{7,2'-O}Gppp_s G$  cechują się częściową odpornością na działanie Dcp2. Izomer D2 związku  $m_2^{7,2'-O}Gpp_s pG$  wykazuje najmniejszą podatność na działanie Dcp2 ( $12 \pm 3\%$  degradacji po 15 min).<sup>487,494</sup> Analogi kapu posiadające modyfikację tiofosforanową w sąsiedztwie  $m^7Guo$ , takie jak  $m^7Gp_s ppG$  oraz  $m_2^{7,2'-O}Gp_s pppG$  są niepodatne na działanie DcpS.<sup>490,495</sup>

Boranofosforanowe analogi kapu zmodyfikowane w pozycji  $\beta$  także są mało wrażliwe na Dcp2, izomery D1 oraz D2  $m_2^{7,2'-O}Gpp_{BH_3} pG$  są hydrolizowane odpowiednio w  $22 \pm 3\%$  oraz  $4 \pm 1\%$  ( $t = 15$  min) podczas gdy pseudosymetryczny związek  $m^7Gpp_{BH_3} pm^7G$  jest całkowicie odporny na hydrolizę.<sup>487</sup> Nie wykonano jeszcze badań podatności innych boranofosforanowych analogów kapu na działanie Dcp2. Wiele boranofosforanowych analogów kapu wykazuje obniżoną podatność na działanie DcpS. Obydwa izomery  $m^7Gpp_{BH_3} pG$  są degradowane przez DcpS dużo wolniej niż  $m^7Gppp_s G$ . Natomiast w przypadku  $m^7Gp_{BH_3} ppG$  obserwuje się zależność od stereochemii grupy boranofosforanowej. Izomer D1 wykazuje zbliżone właściwości do  $m^7Gpp_{BH_3} pG$  podczas gdy izomer D2 jest hydrolizowany znacznie szybciej (jednak nadal jest mniej podatny niż niemodyfikowane analogi kapu).<sup>484</sup>

Spośród innych związków posiadających modyfikacje mostkowe zbadano obydwie izomery selenofosforanowego analog kapu  $m_2^{7,2'-O}Gpp_{Se} pG$ . Izomer D1 wykazuje dość znaczną podatność na Dcp2 ( $55 \pm 5\%$  degradacji,  $t = 15$  min) natomiast izomer D2 jest w znacznym stopniu odporny ( $16 \pm 1\%$  degradacji,  $t = 15$  min).<sup>487</sup>

Do tej pory nie prowadzono szeroko zakrojonych badań nad wpływem wydłużenia łańcucha fosforanowego na działanie Dcp2. Nie zauważono, by tetra- i pentafosforanowe analogi kapu pozbawione modyfikacji w mostku fosforanowym wykazywały odporność na działanie tego enzymu. Nie prowadzono też badań nad na tetrafosforanowymi analogami kapu posiadającymi modyfikacje w mostku fosforanowym.

Praktyczne zastosowania analogów kapu o zmniejszonej podatności na aktywność Dcp2 zostaną opisane w dalszej części pracy.

### 1.6.2. Metody syntezy i oczyszczania

Dinukleotydy z mostkiem 5'-5' oligofosforanowym są często syntetyzowane za pomocą podobnych metod jak trifosforany nukleozydów. Przykładowo tetrafosforany mogą zostać otrzymane na drodze sprzęgania aktywowanych monofosforanów nukleozydu z pirofosforanem lub jego analogiem. W przypadku użycia nadmiaru fosforanu nieorganicznego uzyskuje się trifosforan natomiast użyciu niedomiaru molowego fosforanu (względem monofosforanu nukleozydu) prowadzi do powstania większych ilości dinukleotydu. Analogicznie 5'-5' trifosforany można uzyskać przez sprzęganie aktywowanych NMP z nieorganicznym fosforanem. W przypadku syntezy związków modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym istotnym ograniczeniem tych metod mogą być problemy z otrzymaniem aktywnych pochodnych NMP. Ponadto wydajności takich reakcji często są niskie

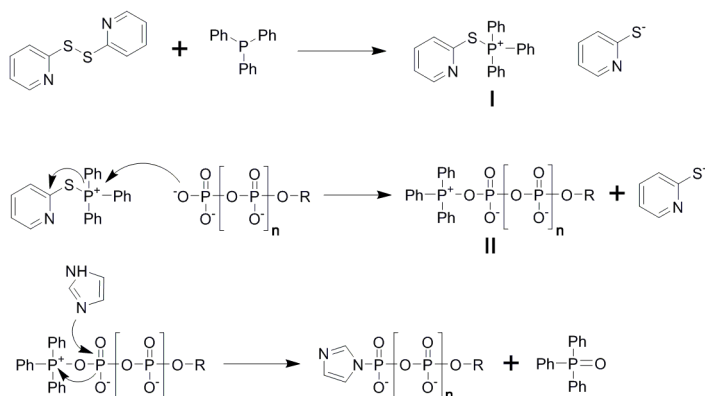
(<30 %) a oczyszczanie docelowego związku z produktów ubocznych może być kłopotliwe.<sup>496, 497</sup>

Opisane wyżej techniki nie znajdują dużego zastosowania w przypadku syntezy modyfikowanych chemicznie analogów kapu. W niektórych przypadkach wykorzystano sprzężanie aktywowanych NMP z nieorganicznym tiofosforanem lub boranofosforanem w celu uzyskania symetrycznych związków, takich jak m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G jednak strategia taka jest przydatna jedynie w syntezie symetrycznych dinukleotydów.<sup>484</sup>

Inną strategią może być sprzężanie aktywowanego NMP z odpowiednim di- lub trifosforanem nukleozydu, przykładem takiej syntezy może być otrzymywanie analogów AppCX<sub>2</sub>ppA (X = CH<sub>2</sub>, CCl<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>) z wykorzystaniem AppCX<sub>2</sub>p z zadowalającymi wydajnościami.<sup>498</sup> Wariacje tych metod z użyciem imidazolowych pochodnych nukleotydów znalazły szerokie zastosowanie w syntezie analogów kapu.<sup>488, 499, 500</sup> Można także wspomnieć, że opisano też inne podejścia do syntez 5'-5' dinukleotydów opierające się na zmodyfikowanej wersji reakcji Ludwiga-Ecksteina<sup>501</sup> lub użycia cyklicznego trifosforanu<sup>11</sup>, co pozwala na uzyskanie symetrycznych tetra- i pentafosforanowych dinukleotydów.

### 1.6.2.1. Aktywacja fosforanów

Z uwagi na obecność w strukturze kapu stabilnych energetycznie wiązań pirofosforanowych do ich utworzenia, na drodze sprzężania dwóch jednostek fosforanowych, konieczne jest dostarczenie energii. Można to osiągnąć gdy jedna z wymienionych podjednostek jest aktywowana za pomocą odpowiedniego ugrupowania chemicznego dołączonego do terminalnego atomu fosforu w łańcuchu. Do tej pory opracowano wiele technik aktywacji fosforanów pomocnych w tworzeniu wiązania pirofosforanowego, wykorzystujących m.in. pochodne tiofenylowe<sup>502</sup>, morfolinowe<sup>503</sup> czy pirydynowe.<sup>504</sup> Mimo tego jedną z najbardziej powszechnych metod jest wykorzystanie imidazolu.<sup>488</sup> Oryginalna metoda wprowadzona na początku lat 60'<sup>505</sup> i była oparta na wykorzystaniu 1,1'-karbonyloimidazolu. Otrzymane w ten sposób imidazolowe pochodne nukleotydów wykorzystano m.in. w syntezie trifosforanów nukleozydów<sup>506</sup> oraz pierwszych syntetycznych analogów kapu. Ważnymi ograniczeniami tej procedury jest stosowalność jedynie do syntezy monofosforanów nukleozydów oraz konieczność stosowania dużych nadmiarów 1,1'-karbonyloimidazolu, który musi zostać rozłożony przed rozpoczęciem kolejnego etapu. Dlatego też oryginalna procedura została poddana wielu modyfikacjom co uprościło syntezę i znacząco poprawiło jej wydajność.<sup>507</sup> Obecnie najczęściej stosowaną metodą syntezy imidazolidów nukleotydów jest opracowana na początku lat 70' reakcja Mukaiyama-Hashimoto (**Schemat 1.26**).<sup>508</sup> Jej głównymi zaletami jest praktyczna nieodwracalność procesu oraz regiospecyficzność – powstają niemal wyłącznie produkty podstawienia na terminalnym fosforanie. Ponieważ jest to reakcja utleniania-redukcji i nie dochodzi w niej do rozpadu reaktywnych wiązań (co ma miejsce w przypadku syntezy poprzez 1,1'-karbonyloimidazol) to ilość produktów ubocznych jest znacznie ograniczona, ponadto jest ona mniej wrażliwa na obecność śladowych ilości wody w środowisku.



**Schemat 1.26.** Mechanizm reakcji Mukaiyama-Hashimoto. Opiera się ona na układzie aktywującym złożonym z trifenylofosfiny oraz 2,2'-ditiopiryryny (DTDP). Związki te reagują ze sobą tworząc produkt pośredni **I**, który po podstawieniu jednostką fosforanową tworzy związek **II**. Zawada steryczna przy atomie fosforu związku **I** sprawia, że może być atakowany nukleofilowo jedynie przez atom tlenu na terminalnym fosforanie. W kolejnym etapie dochodzi do podstawienia nukleofilowego w grupie fosforanowej przez cząsteczkę imidazolu co prowadzi do powstania oczekiwanego produktu oraz tlenku fosfiny.

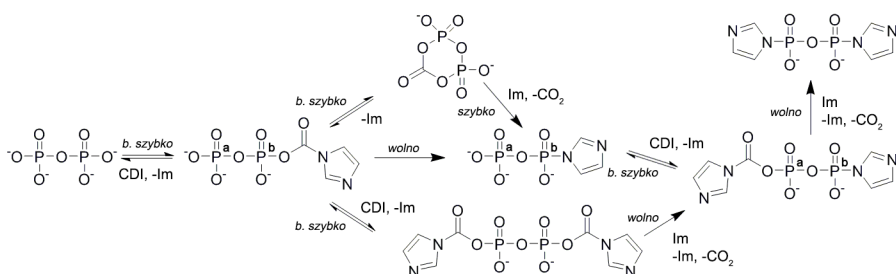
W standardowych warunkach większość pochodnych imidazolowych wykazuje się stosunkowo dużą trwałością w stanie stałym i mogą być dość długo przechowywane w obniżonej temperaturze jednak w środowisku wodnym ulegają hydrolizie do odpowiednich fosforanów. Proces ten jest jednak na tyle powolny, że związki te mogą być badane przy pomocy standardowych technik badawczych takich jak RP HPLC czy MS.

### 1.6.2.1.1. Imidazolowe pochodne fosforanów nieorganicznych

Z teoretycznego punktu widzenia imidazolowe pochodne fosforanu (V) i jego analogów takich jak tiofosforan mogłyby znaleźć zastosowanie w syntezie organicznej do wydłużania łańcucha fosforanowego lub syntezie symetrycznych dinukleotydów. Jednakże synteza imidazolowych pochodnych tio- i boranofosforanów zwykle charakteryzuje się albo bardzo niską wydajnością albo prowadzi do rozpadu substratu.<sup>484</sup>

Dla odmiany aktywowane imidazolem pochodne pirofosforanu i jego strukturalnych analogów wydają się być dobrym narzędziem w syntezie organicznej. Do tej pory opisano syntezę imidazolowych pochodnych pirofosforanu i niektórych bisfosfonianów. Pomimo opisanych wcześniej ograniczeń syntezy z użyciem CDI autorzy zdecydowali się na użycie tej metody. Reakcję soli tetrabutylamoniowych pirofosforanu i odpowiednich bisfosfonianów prowadzono w DMF z nadmiarem CDI w środowisku zasadowym. Pochodne imidazolowe uzyskano z dużą wydajnością (~90%) a część z nich wykorzystano do syntez analogów Ap<sub>4</sub>A i Gp<sub>4</sub>G.<sup>496</sup>

Przeprowadzono także badania mechanizmu powstawania imidazolowej pochodnej pirofosforanu. Wykorzystanie spektroskopii <sup>31</sup>P NMR oraz znakowanego izotopowo substratu (<sup>13</sup>C-CDI) pozwoliło na zaproponowanie dokładnego mechanizmu reakcji i jego kinetyki (**Schemat 1.27**).<sup>496</sup>



**Schemat 1.27.** Mechanizm powstawania pochodnej imidazolowej pirofosforanu z użyciem CDI.

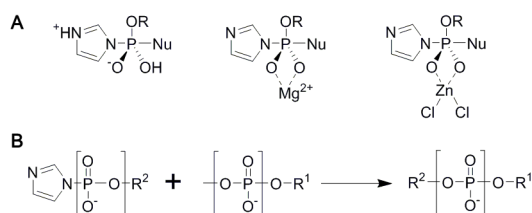
### 1.6.2.2. Sprzężenie jednostek fosforanowych

Imidazol przyłączony wiązaniem P-N do terminalnego fosforanu nie jest dobrą grupą odchodzącą co czyni taki atom fosforu mało podatnym na atak nukleofilowy. Jednakże po odpowiedniej aktywacji tak przyłączony imidazol może stać się dobrą grupą odchodzącą. Najprostszy mechanizm aktywacji to protonacja atomu azotu w pozycji 3 (**Schemat 29A**) co prowadzi do przesunięcia gęstości elektronowej na wiązaniu P-N w kierunku pierścienia heterocyklicznego czyniąc jednocześnie atom fosforu bardziej elektrofilowym. Badania kinetyki hydrolizy 2-metyloimidazolowych pochodnych monofosforanów nukleozydów wykazały, że proces ten jest znacznie szybszy (~10) przy niskich wartościach pH.<sup>509</sup> Zastosowanie buforu fosforanowego w pH 4-5 prowadziło do powstania difosforanów nukleozydów, powstałych na skutek ataku nukleofilowego jonów H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> oraz HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

Bardziej użytecznym z syntetycznego punktu widzenia sposobem aktywacji imidazolu jest wykorzystanie kwasów Lewisa, najczęściej chlorków metali takich jak Mn, Zn czy Mg. Kationy takich metali są zwykle silnie kompleksowane przez fosforany i polifosforany przez co gęstość elektronowa na atomach fosforu ulega zmniejszeniu. Z uwagi na to, że magnez jest powszechnym kofaktorem enzymów katalizujących reakcje podstawienia nukleofilowego przy atomie fosforu to przeprowadzono dokładne badania mechanistyczne hydrolizy imidazolowych pochodnych fosforanów pod wpływem kationów magnezu.<sup>510</sup> Wiele początkowych badań nad zastosowaniem kationów metali w tworzeniu wiązania pirofosforanowego prowadzono w środowisku wodnym. Przebadano szereg kationów metali (Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), gdzie najskuteczniejsze okazały się jony manganu i kadmu.<sup>511</sup> Mimo tego, że wydajności syntezy nie przekraczała 40% to metoda ta została wykorzystana w syntezie naturalnie występującego kapu m<sup>7</sup>GpppG. Badania nad wykorzystaniem innych jonów (Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>) nie przyniosły pozytywnych rezultatów.<sup>512</sup>

Bardziej efektywną drogą do wykorzystania kationów metali w syntezie wiązania pirofosforanowego była metoda opracowana przez M. Sekine<sup>513</sup> w której reakcja prowadzona jest w rozpuszczalniku aprotycznym (bezwodny DMF) w obecności ZnCl<sub>2</sub>. Skuteczność tej metody jest prawdopodobnie związana z dodatkową aktywacją imidazolidu

na skutek koordynacji atomu cynku przez wolną parę elektronową azotu w pozycji 3 (**Schemat 1.28**). Metoda ta została z powodzeniem zastosowana w syntezie różnorodnych analogów kapu, także posiadających modyfikacje w łańcuchu fosforanowym oraz innych nukleotydów oraz nukleotydocukrów.<sup>484, 486, 490, 514-518</sup> Jej jedyną wadą jest konieczność stosowania nukleotydów w postaci soli amoniowych rozpuszczalnych w DMF (standardowo wykorzystywane są do tego celu sole trietyloamoniowe, TEA).



**Schemat 1.28.** Sprzęganie imidazolowych fosforanów. (**A**) Postulowane produkty mechanizmu katalizy dla reakcji w zakwaszonym środowisku wodnym (lewo), katalizowanej kationami  $Mg^{2+}$  w środowisku wodnym (środek) oraz katalizowanej  $ZnCl_2$  w środowisku DMF. (**B**) Ogólny schemat sprzęgania imidazolowej pochodnej fosforanu z inną jednostką fosforanową prowadzący do wydłużenia łańcucha fosforanowego.

### 1.6.2.3. Metylacja guanozyny

Metody selektywnego alkilowania pozycji N7 guanozyny opracowano już w latach 60'. Metylacja guanozyny może zostać osiągnięta przy użyciu jodku metylu albo siarczanu dimetylu.<sup>519, 520</sup> Z powodu dużej nukleofilowości atomu N7 reaguje on selektywnie z elektrofilowymi czynnikami alkilującymi przez co nie jest wymagane wprowadzanie zabezpieczeń na grupie N2 lub grupach hydroksylowych w pierścieniu cukrowym. Nukleotydowe pochodne guanozyny także mogą być metylowane poprzez  $CH_3I$ , jednakże obserwuje się wtedy małe ilości produktów ubocznych będących wynikiem alkilowania terminalnego fosforanu. Dobrą metodą metylacji fosforanowych pochodnych guanozyny w pozycji N7 jest reakcja z siarczanem dimetylu, która zachodzi w środowisku wodnym przez co można modyfikować w ten sposób związki trudno rozpuszczalne w rozpuszczalnikach aprotycznych takie jak nieorganiczne sole nukleotydów.<sup>521</sup>

### 1.6.2.4. Synteza dinukleotydowych analogów kapu

W rozdziale 1.2.5.4 przedstawiono zarys syntezy nukleotydów posiadających modyfikacje w łańcuchu fosforanowym. Tutaj zostaną omówione dokładniej metody syntezy stosowane do syntezy dinukleotydowych analogów kapu.

Niezależnie od tego czy dinukleotydowy analog kapu zawiera modyfikacje w grupie fosforanowej czy też nie to strategia syntezy takich związków jest podobna. W reakcji sprzęgania prowadzonej w DMF w obecności  $MCl_2$  (gdzie  $M = Zn$  lub  $Mg$ ) aktywowana pochodna nukleotydu (*P*-elektrofil) ulega atakowi nukleofilowemu prowadzonemu przez obecny w roztworze nukleotyd (*P*-nukleofil, **Rys 1.28**). Ponieważ pochodne imidazolowe związków posiadających modyfikacje chemiczne na terminalnym fosforanie są zwykle niestabilne lub niereaktywne to w przypadku syntezy analogów takich jak  $m^7Gppp_5G$  należy dążyć do tego by aktywować nukleotyd nie zawierający modyfikacji w grupie fosforanowej. W przypadku związków zawierających  $m^7Guo$ , z uwagi na ich mniejszą stabilność oraz rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, warto unikać ich konwersji do pochodnych imidazolowych (mniejsza wydajność syntezy). Planując syntezę tiofosforanowych analogów kapu należy wziąć pod uwagę, że metylacja  $m^7Guo$ , niezależnie czy prowadzona z użyciem  $CH_3I$  lub  $SO_2(OCH_3)_2$ , prowadzi także do metylacji atomu siarki. Dlatego też konieczne w reakcji sprzęgania należy użyć związków zawierających od razu  $m^7Guo$ .

### 1.6.2.5. Metody oczyszczania i charakteryzacji analogów kapu

#### 1.6.2.5.1. Wydzielanie i oczyszczanie nukleotydów

Z uwagi na jonowy charakter nukleotydów dobrą metodą ich oczyszczania jest kolumnowa chromatografia jonowymienna pozwalająca w łatwy sposób na uzyskania relatywnie czystych związków. Najpowszechniej stosowany system elucji oparty jest na buforze TEAB, który może zostać łatwo usunięty w czasie odparowania

rozpuszczalnika na wyparce obrotowej. Prowadzi to do otrzymania soli trietyloamoniowych nukleotydów, które są stosunkowo dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach stosowanych w dalszych etapach syntezy.<sup>522</sup> Jedynym ograniczeniem tej metody jest stosunkowo mała rozdzielczość, przez co mieszaniny związków posiadające taki sam ładunek i zbliżone stałe  $K_a$  nie mogą zostać efektywnie rozdzielone. Ponadto w ten sposób uzyskuje się sole trietyloamoniowe nukleotydów, które nie nadają się do badań biochemicznych lub biofizycznych.

W celu uzyskania związków o większej czystości lub rozdziału mieszanin związków niemożliwych do rozdziału za pomocą chromatografii jonowymiennej stosuje się chromatografię HPLC. Najpowszechniej stosowaną metodą jest HPLC w układzie faz odwróconych (ang. *Reverse Phase*, RP), gdzie na krzemionkowe złożo chromatograficzne nakłada się alifatyczne związki organiczne (najczęściej alkanany) i stosuje się polarny układ elucji. Pozwala to na efektywny rozdział związków niepolarnych takich jak nukleotydy lub peptydy. W przypadku gdy jest zapotrzebowanie na uzyskanie związku o dużej czystości stosuje się dwuetapowy system oczyszczania gdzie pierwszy etap polega na zastosowaniu chromatografii jonowymiennej a drugi na użyciu RP HPLC. Plusem takiego rozwiązania jest to, że związki oczyszczane na HPLC są relatywnie czyste co zmniejsza ryzyko uszkodzenia kolumny HPLC oraz znacznie zwiększa jej żywotność. Powszechnie stosowanymi buforami w oczyszczaniu nukleotydów są bufor octanowy oraz TEAB i TEAA.<sup>8, 522</sup>, wiele firm oferuje także kolumny preparatywne specjalnie dostosowane do oczyszczania nukleotydów.

Standardową techniką stosowaną w oczyszczaniu nukleotydów o niskiej polarności jest kolumnowa chromatografia adsorpcyjna. Najpowszechniej stosowanymi adsorbentami jest tlenek krzemu (IV) nazywany często „silikażelem” oraz tlenek glinu (III). W zależności od oczyszczanego związku jako eluent stosuje się różne mieszaniny rozpuszczalników organicznych. Do powszechnie stosowanych rozpuszczalników należą metanol, dichlorometan oraz chloroform. Warto zaznaczyć, że niedawno wprowadzone na rynek zautomatyzowane systemy „flash chromatography” pozwalają na wygodne oczyszczanie zarówno polarnych jak i niepolarnych związków w skali półpreparatywnej.

#### 1.6.2.5.2. Charakteryzacja chemiczna

Otrzymane związki są charakteryzowane głównie przy pomocy wysokorozdzielczej spektrometrii mas oraz spektroskopii  $^1\text{H}$  oraz  $^{31}\text{P}$  NMR.<sup>522</sup> Pierwsza z technik pozwala na potwierdzenie wzoru sumarycznego związku oraz w przypadku związków zawierających atomy pierwiastków takich jak chlor i bor możliwe jest wykrycie charakterystycznych pików izotopowych, których wartości  $m/z$  oraz relatywne intensywności są dalszym potwierdzeniem struktury związku. Spektroskopia NMR pozwala na potwierdzenie struktury związku i w niektórych przypadkach wyznaczenie wybranych równowag konformacyjnych (*syn* i *anti* w wiązaniu glikozydowym lub  $\text{C}'3$  *endo* i  $\text{C}'2$  *endo* w pierścieniu cukrowym).<sup>523-525</sup> Z uwagi na to, że zwykle uzyskuje się bardzo małe ilości końcowych produktów (~2-5 mg) to zazwyczaj nie wykonuje się widm  $^{13}\text{C}$  NMR ani widm korelacyjnych. W przypadku związków znakowanych fluorescencyjnie dokonuje się także charakterystyki spektralnej (spektroskopia absorpcyjna i emisyjna UV-VIS). Pomocniczymi technikami analitycznymi, które można wykorzystać w charakteryzacji nukleotydów są spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)<sup>526</sup> oraz spektroskopia w podczerwieni (IR).<sup>527</sup>

### 1.6.3. Właściwości biologiczne oraz wybrane zastosowania

**Tab.1.5.** Zastosowania analogów kapu w badaniach biochemicznych i medycznych

Zastosowanie	Rola analogu kapu	Przykładowe związki
Synteza RNA <i>in vitro</i>	Zmodyfikowana struktura kapu może zwiększać powinowactwo mRNA do maszyny translacyjnej oraz wydłużyć jego czas półtrwania w komórce. Więcej informacji zawarto w poniższych rozdziałach.	1) $m_2^{7,2'-O}GpppG$ 2) $m_2^{7,2'-O}Gpp_s pG D2$ 3) $m_2^7Gpp_{BH3}pm^7G$
Inhibicja translacji w terapii przeciwnowotworowej	Analogi kapu po wprowadzeniu do komórki mogą selektywnie hamować translację mRNA kodujących czynniki wzrostu co ma potencjalne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. Więcej informacji zawarto w poniższych rozdziałach.	1) lipofilowe pochodne $bn^7GMP$ 2) $m^7Gp_s pp^*$
Inhibicja DpcS w terapii SMA	Nadekspresja białka DcpS może być związana z rdzeniowym zanikiem mięśni (ang. SMA Spinal Muscular Atrophy) przez co związki silnie wiążące się z tym białkiem mają potencjalne zastosowanie w terapii tego schorzenia.	1) $m^7GpCH_2ppG^*$ 2) $m^7GpNHppG^*$
Dostarczanie terapeutycznych oligonukleotydów do jądra komórkowego <sup>485</sup>	Oligonukleotydy zawierające strukturę TMG kapu są rozpoznawane przez kompleks snurportyny i wprowadzane do jądra komórkowego gdzie mogą być wykorzystane do leczenia chorób takich jak dystrofia mięśniowa Duchenne'a poprzez korekcję nieprawidłowego splicingu mRNA dystrofiny.	1) $m_3^{7,2,2}GppNHpG^*$ 2) $m_3^{7,2,2}Gpp_s pG D2^*$
Żywicze powinowactwa <sup>516</sup>	Odporne na hydrolizę analogi kapu służą do wiązania i wydzielania z materiału biologicznego białek wykazujących powinowactwo do reszty $m^7Guo$ .	1) $m^7GpCH_2ppA$ -Sefaroza
Badania biochemiczne	Badania nad białkami wiążącymi się z kapem (eIF4E <sup>311, 528-530</sup> , DcpS <sup>531-534</sup> ) oraz mechanizmami represji translacji <sup>535</sup> oraz degradacji mRNA. <sup>452, 493</sup>	1) $m^7GpppG$ 2) $m^7GppCH_2pG$ 3) $m^7GMP$ 4) $p$ -F- $bn^7 m^2GMP$ 5) $m_3^{7,2,2}GpppG$

\*zastosowania potencjalne, wymagające weryfikacji doświadczalnej.

#### 1.6.3.1. Synteza RNA *in vitro* oraz jego wykorzystanie w badaniach biomedycznych.

##### 1.6.3.1.1. Stabilizacja mRNA za pomocą analogów kapu

Badania nad optymalizacją syntezy białka w oparciu o kapowane mRNA prowadzono początkowo w bezkomórkowych układach *in vitro*, następnie rozszerzono je o kultury komórkowe. Jednym z pierwszych odkryć było opracowanie analogów kapu typu ARCA co znacznie polepszyło wydajność syntezy kapowanego mRNA. Pierwszymi tego typu analogami były  $m_2^{7,3'-O}GpppG$  oraz 3'-deoksy- $m^7GpppG$  zwiększające wydajność translacji nieomal dwukrotnie w stosunku do niemodyfikowanego kapu.<sup>499</sup> Jest to spowodowane tym, że w procesie transkrypcji *in vitro* są one zawsze wbudowywane do transkryptu w prawidłowej orientacji. Wcześniejsze obserwacje pokazały bowiem, że polimeraza RNA nie rozróżnia grupy 3'OH w resztach Guo i  $m^7Guo$  i wprowadza do około połowy transkryptów kap w nieprawidłowej orientacji względem reszty  $m^7Guo$  (tzn. powstaje  $Npppm^7G$ -RNA zamiast prawidłowego  $m^7GpppN$ -RNA) co znacznie pogarsza wydajność translacji.<sup>536</sup> Sukces z opracowaniem analogów ARCA zaowocował dalszymi poszukiwaniami modyfikacji chemicznych poprawiających właściwości translacyjne mRNA. Przebadano związki posiadające mostek fosforanowy wydłużony do czterech albo pięciu jednostek fosforanowych i odkryto, że tetrafosforanowe analogi ARCA zapewniają lepszą wydajność translacji (przykładowo,  $m_2^{7,2'-O}GppppG$  jest 1,2 razy wydajniejszy niż  $m_2^{7,2'-O}GpppG$ ). Ponadto wprowadzenie grupy metylenowej w pozycję 2'OH także chroni przed odwrotną inkorporacją kapu do mRNA.<sup>514</sup> Dalsze badania pokazały, że wprowadzenie podstawnika benzyłowego w pozycję N7 również poprawia właściwości translacyjne mRNA,  $bn^7m^{3'-O}GpppG$  jest prawie dwukrotnie wydajniejszy niż  $m_2^{7,3'-O}GpppG$ . Innymi analogami kapu mogącymi znaleźć zastosowanie w syntezie kapowanego RNA są symetryczne analogi posiadające dwie grupy  $m^7Guo$  w

cząsteczce o wzorze ogólnym  $m^7Gp_n m^7G$  ( $n = 3$  lub  $4$ ). Z powodu symetrycznej struktury te związki zawsze są prawidłowo inkorporowane do RNA przez co są funkcjonalnymi odpowiednikami analogów ARCA. Wykonane badania pokazały, że tak modyfikowane RNA ulega translacji ponad 3-krotnie wydajniej niż w przypadku transkryptów posiadających standardowy kap.<sup>537</sup>

Następnym etapem badań było zaprojektowanie analogów kapu, zapewniałyby nie tylko zwiększone powinowactwo do maszynarii translacyjnej ale także dłuższy czas półtrwania mRNA. Pierwotnie badano wpływ analogów niemodyfikowanych w mostku fosforanowym oraz długość ogona poli(A) na stabilność mRNA w komórkach ssaczych. Wykazano, że struktura kapu silniej wiązana przez eIF4E zapewnia dłuższy okres półtrwania w komórce oraz że transkrypty zawierające odporny na działanie Dcp2 analog kapu z grupą metylenobisfosfonianową,  $m_2^{7,3'}\text{-}^o\text{GppCH}_2\text{pG}$  są stabilniejsze w komórce. Potwierdza to fakt, że ścieżka degradacji 5'-3' ma istotny wkład w rozpad egzogennej mRNA. Głównym ograniczeniem użycia metelenobisfosfonianowych analogów kapu jest ich niskie powinowactwo do eIF4E skutkujące obniżoną wydajnością translacji.<sup>493</sup>

Tiofosforanowe analogi kapu typu ARCA (S-ARCA) posiadają większe powinowactwo do eIF4E dzięki czemu wykazały lepsze właściwości translacyjne niż niemodyfikowane w łańcuchu fosforanowym analogi ARCA. Badania *in vitro* pokazały, że jeden z nich wykazał bardzo dużą odporność na działanie ludzkiego białka Dcp2 (hDcp2) podczas gdy inne były odporne najwyżej częściowo. Tym związkiem był  $m_2^{7,2'}\text{-}^o\text{Gpp}_s\text{pG}$  izomer D2, wydłużający okres półtrwania mRNA w komórkach ludzkich ponad 2-krotnie niż standardowe analogi ARCA.<sup>494</sup> Wyniki te były wskazówką, że tak modyfikowane mRNA może być użyteczne do zastosowań *in vivo*, wliczając w to badania biomedyczne.

W dalszym etapie badań opracowano także inne analogi kapu z modyfikowanym mostkiem fosforanowym wliczając w to tetrafosforanowe analogi z grupą tiofosforanową oraz związki z grupą boranofosforanową. Niektóre z nich zostały poddane badaniom pod kątem stabilizacji mRNA w komórkach ludzkich jednakże uzyskane wyniki nie były lepsze niż w przypadku  $m_2^{7,2'}\text{-}^o\text{Gpp}_s\text{pG}$  (D2). Ciekawą obserwacją było to, że jeden z boranofosforanowych analogów,  $m^7Gpp_{\text{BH}_3}\text{pm}^7G$  mimo, że nie zwiększał istotnie wydajności translacji to wykazał całkowitą odporność na działanie hDcp2. Właściwość ta połączona z faktem, że podobnie jak ARCA zawsze jest inkorporowany do mRNA w prawidłowy sposób czyni z niego cenne narzędzie do badań nad metabolizmem mRNA w komórkach.<sup>487</sup> Inne badania pokazały też, że modyfikacje w pierścieniu cukrowym także mogą poprawić właściwości translacyjne analogu kapu po inkorporacji do mRNA. Przykładowo analogi zawierające grupę 2',3'-*O-O*-izopropylidenową w reszcie  $m^7\text{Guo}$  także wykazują właściwości analogów ARCA i stabilizują mRNA w komórkach bardziej niż standardowy kap  $m^7\text{GpppG}$ .<sup>538</sup> W jednym z późniejszych badań uzyskano także izopropylidenowy analog kapu z modyfikacją tiofosforanową w pozycji  $\beta$  mostka trifosforanowego, jednak nie zapewniał on lepszych właściwości translacyjnych niż S-ARCA.<sup>539</sup> Ciekawa modyfikacja w rybozynie  $m^7\text{Guo}$  odnotowana w literaturze to wprowadzenie analogu LNA (ang. *Locked Nucleic Acid*), który zapewnia większą stabilność mRNA niż  $m_2^{7,3'}\text{-}^o\text{GpppG}$ .<sup>540</sup> Inne uzyskane modyfikacje pierścienia cukrowego  $m^7\text{Guo}$  to wprowadzenie fluoru lub grupy 2'-*O*-allilowej w pozycję 2', jednak w tych przypadkach nie badano wpływu na stabilność i wydajność translacyjną mRNA.<sup>541, 542</sup>

#### 1.6.3.1.2. Wykorzystanie w terapiach genowych

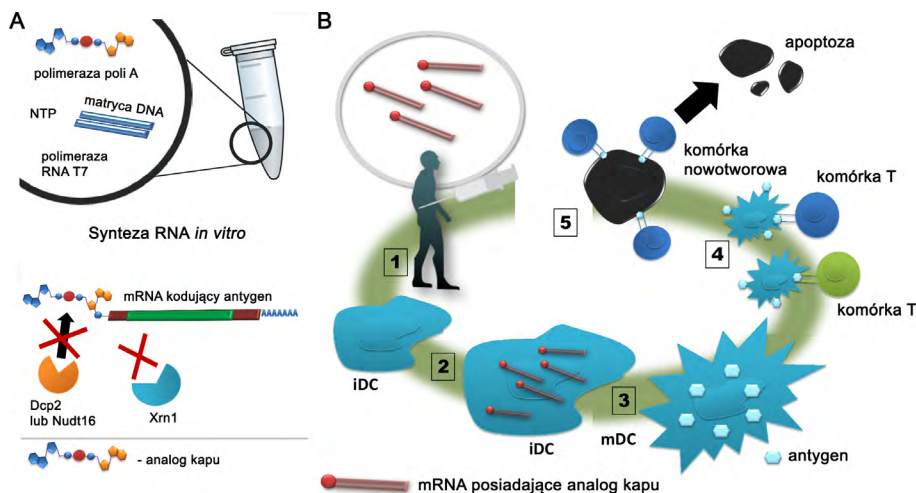
W ciągu ostatnich lat prowadzono wiele badań nad terapiami genetycznymi z użyciem mRNA, zarówno na modelach komórkowych jak i całych organizmach.<sup>543-545</sup> Prowadzi się także szereg prób klinicznych z wykorzystaniem tej technologii.<sup>546, 547</sup> Jednakże w przeważającej większości tych badań stosuje się cząsteczki mRNA bez modyfikacji chemicznych na końcach 3' oraz 5', które mogłyby zwiększać ich stabilność i potencjał translacyjny.

Jedne z pierwszych badań nad terapią genową mRNA prowadzono na szczurach niezdolnych do syntezy wazopresyny. Terapia polegała na wprowadzaniu mRNA wazopresyny (było ono syntezowane *in vitro* lub izolowane z prawidłowego wzgórza pobranego od zdrowych szczurów) bezpośrednio do wzgórza gdzie zachodziła ekspresja. Dużymi wadami takiego podejścia były: niska wydajność translacji, nieduża stabilność mRNA oraz jego immunogenność.<sup>548</sup>

Duże zainteresowanie poświęcono badaniom nad komórkami dendrytycznymi (ang. DC, *dendritic cells*), które można poddać transfekcji mRNA w warunkach *ex vivo* (pobranie komórek od danego osobnika, manipulacja na nich a następnie ponowne wprowadzenie do organizmu). Jest to możliwe gdyż niedojrzałe komórki DC



(ang. iDC, *immature DC*) wykazują naturalną zdolność do pobierania mRNA z otoczenia. Pobrane mRNA następnie podlega translacji a białkowy produkt jest prezentowany jako antygen (**Rys. 1.53**). Opisany proces stanowi podłoże molekularne dla szczepionek antynowotworowych opartych na mRNA. W tej metodzie do iDC wprowadza się mRNA kodujące antygeny specyficzne dla określonej populacji komórek nowotworowych co prowadzi do selekcji cytotoksycznych limfocytów T selektywnie atakujących komórki nowotworowe mające na błonie komórkowej odpowiednie antygeny. Prawidłowe komórki nie są niszczone przez co taka terapia jest mniej szkodliwa dla organizmu niż większość obecnie stosowanych wariantów radio- i chemioterapii.<sup>549,550</sup> Ponadto taka sama technologia została zaadaptowana do szczepionek antywirusowych, skierowanych m.in. przeciwko AIDS.<sup>551</sup>



**Rys. 1.53.** Zastosowanie analogów kapu w produkcji szczepionek mRNA opartych o wykorzystanie komórek dendrytycznych. **(A)** mRNA jest syntezowane *in vitro* przez wykorzystanie wirusowych lub bakteryjnych polimeraz RNA. Ponieważ polimeraza zazwyczaj rozpoczyna syntezę od ataku na grupę 3'OH w GTP to w celu osiągnięcia dużej wydajności dla kapowanego transkryptu należy użyć co najmniej 5-krotnego nadmiaru analogu kapu. Analogi posiadające zwiększoną odporność na hydrolizę mogą przyczynić się do większej stabilności uzyskanego mRNA. **(B)** Schemat terapii z wykorzystaniem syntetycznego mRNA. **(1)** Wprowadzenie mRNA antygenu nowotworowego do niedojrzałych komórek dendrytycznych. **(2/3)** Dojrzwienie komórek dendrytycznych. **(4)** Komórki dendrytyczne prezentują antygeny nowotworu i aktywują komórki T. **(5)** Aktywowane komórki T indukują apoptozę komórek nowotworowych.

Stosunkowo wcześniej zdano sobie sprawę z tego, że jakość mRNA ma duże znaczenie dla wydajnej translacji w komórkach macierzystych. W jednym z badań porównano efektywność translacji dla mRNA bez modyfikacji oraz mRNA kapowanych przy użyciu analogu ARCA, zmodyfikowane transkrypty były około 20 razy bardziej wydajne (późniejsze badania zasugerowały że te wyniki mogą być zawyżone).<sup>552</sup> Kilka lat temu wykazano, że transfekcja komórek dendrytycznych może zostać przeprowadzona nie tylko *ex vivo* ale także *in vivo*. Dokonano tego przez wprowadzenie do węzłów chłonnych myszy mRNA kodującego antygen przeciwnowotworowy. Ten mRNA został pobrany i wyrażony przez komórki dendrytyczne, po prezentacji dojrzewającym limfocytom T uzyskano odpowiedź immunologiczną przeciw nowotworowi.<sup>553</sup> Te rezultaty są zachęcające w kontekście badań klinicznych ponieważ zaprezentowana metoda jest znacznie bardziej dogodna dla pacjentów. W tym samym czasie inne badania pokazały, że mRNA posiadające 5' koniec modyfikowany za pomocą analogu  $\beta$ -S-ARCA zapewniają znacznie lepszą ekspresję antygenów w iDC na modelu mysim.<sup>544</sup> Obecnie trwają badania kliniczne (faza I) nad ich zastosowaniem w szczepionkach antynowotworowych przeciwko czerniakowi. Ponadto badania nad boranofosforanowymi analogami ARCA także pokazały, że polepszają one wydajność translacji mRNA w komórkach dendrytycznych.<sup>484</sup>

Prowadzono także badania z wykorzystaniem modyfikowanego chemicznie mRNA, jedno z nich dotyczyło ekspresji erytropoetyny (EPO) w modelu mysim. Zastąpienie cytozyny i uracylu przez odpowiednio 5-metylocytozynę oraz 2-tiouracyl poskutkowało znacznym spadkiem immunogenności mRNA. Kwas nukleinowy został podany albo w postaci iniekcji domięśniowej albo pod postacią aerozolu, w obydwu przypadkach zwiększając czas życia myszy chorych na wrodzoną chorobę płuc.<sup>554</sup> W innym badaniu wykorzystano mRNA zawierające pseudouracyl także

do podniesienia poziomu ekspresji EPO w organizmie myszy.<sup>543</sup> Wcześniejsze eksperymenty nad podobną terapią prowadzono na makakach ale użyto wtedy mRNA nie zawierającego modyfikacji chemicznych.<sup>555</sup>

Innym ciekawym zastosowaniem syntetycznego mRNA jest indukcja już zróżnicowanych komórek do stadium pluripotencjalnego. Odkrycia, że taki proces jest możliwy poprzez nadekspresję wybranych czynników transkrypcyjnych (Oct4, Sox2, cMyc, oraz Klf4) dokonano kilka lat temu jednakże pierwotna wersja metody wymagała zastosowania retrowirusów.<sup>556</sup> Do chwili obecnej opracowano kilka innych metod indukcji pluripotencji i jedna z nich polega na wprowadzeniu szeregu mRNA kodujących wspomniane czynniki transkrypcyjne do komórki. Dzięki temu możliwe jest szybka i efektywna produkcja komórek pluripotencjalnych.<sup>545</sup>

### **1.6.3.1.3. Inhibicja translacji w komórkach nowotworowych**

#### **1.6.3.1.3.1. Podstawy biologiczne**

Proces transformacji nowotworowej jest wielostopniowy gdzie powstanie komórki nowotworu zachodzi stopniowo na skutek gromadzenia się defektów genetycznych. Mimo tego w procesie tym można wyróżnić aktywność kilku kluczowych białek do przetrwania takiej komórki. Ich inaktywacja może spowolnić lub zatrzymać rozwój nowotworu dlatego są one dobrym celem dla kierowanych terapii antynowotworowych.<sup>3</sup> Uważa się, że jednym z tych białek jest czynnik inicjujący translację eIF4E, którego poziom jest podwyższony w przypadku wielu typów nowotworów.<sup>557-560</sup>

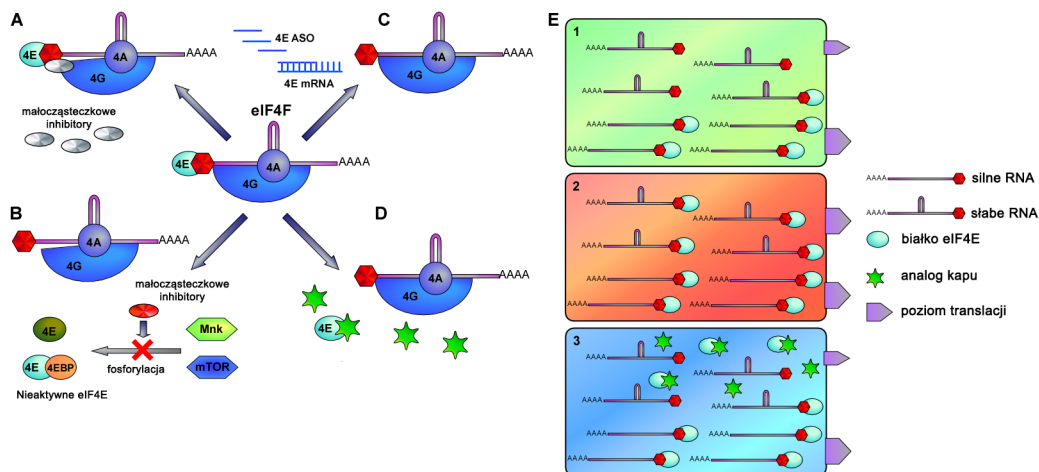
W niezaburzonych warunkach fizjologicznych poziom eIF4E jest niski (co stanowi jeden z mechanizmów regulacji ekspresji genów na poziomie translacji, patrz Rys 1.53). Uważa się, że zwiększenie poziomu tego białka powoduje znacznie silniejszą translację mRNA kodujących czynniki protoonkogenne (VEGF, cyklina D1, Bcl-2 etc.) stymulujące takie procesy jak proliferacja komórek, angiogeneza i adaptacja do stresu. Wspomniane transkrypty posiadają złożoną strukturę przestrzenną sekwencji 5' UTR przez co, w porównaniu do większości innych mRNA, mają obniżone powinowactwo do aparatu translacyjnego i ich efektywność translacji jest niewielka.<sup>560</sup> Jednak gdy dostępność białka eIF4E jest większa także one podlegają intensywnej translacji a zbyt wysokie stężenie czynników wzrostowych może prowadzić do transformacji nowotworowej.<sup>557, 561</sup>

#### **1.6.3.1.3.2. eIF4E jako cel terapeutyczny**

Na przestrzeni ostatnich lat zaproponowano kilka strategii terapeutycznych opartych na inaktywacji elementów kompleksu inicjującego translację (patrz też **Rys. 1.54**). i) Obniżenie stężenia eIF4E poprzez terapię z użyciem antysensownych oligonukleotydów.<sup>562</sup> ii) Blokowanie wiązania się eIF4E z eIF4G.<sup>563</sup> iii) Blokowanie wiązania się eIF4E z 5' mRNA kapem.<sup>564</sup> iv) Blokowanie fosforylacji eIF4E lub inhibicja białek 4E-BP.<sup>565</sup> v) Blokowanie oddziaływań między białkami eIF4A i eIF4G.<sup>566</sup> Warto nadmienić, że część z opisanych metod skierowanych przeciw eIF4E została poddana testom klinicznym<sup>562</sup> lub na modelach zwierzęcych.<sup>565</sup> Syntetyczne analogi kapu z uwagi na silne powinowactwo do wspomnianego białka wydają się być dobrymi kandydatami na potencjalne leki antynowotworowe, co zostanie przedyskutowane w następnym rozdziale. Odrębnym problemem, wymagającym niezależnego rozwiązania jest ich wydajne dostarczenie do komórek.

#### **1.6.3.1.3.3. Analogi kapu jako inhibitory translacji – ogólne rozważania**

Idea wykorzystania prostych analogów kapu ( $m^7GDP$ ,  $m^7GTP$ ,  $m^7GpppN$ ) jako inhibitorów translacji pojawiła się niedługo po tym jak otrzymano pierwsze takie związki.<sup>567</sup> Wczesne badania na szeregu ich syntetycznych pochodnych pomogły w odkryciu inhibitorów o poprawionych właściwościach.<sup>568, 569</sup> Głównym problemem w praktycznym zastosowaniu tych związków *in vivo* jest ujemnie naładowany łańcuch fosforanowy utrudniający ich wnikanie do komórek. Ponadto łańcuch fosforanowy jest podatny na degradację przez różne nukleazy występujące zarówno w komórkach oraz przestrzeni międzykomórkowej natomiast monofosforanowe lub difosforanowe analogi  $m^7Guo$  mają mniejsze powinowactwo do eIF4E.<sup>488, 570</sup> Zaproponowano kilka rozwiązań dla powyższych problemów. Jednym z nich jest zwiększenie lipofilowości analogów kapu przez wprowadzenie do



**Rys. 1.54.** eIF4E jako cel terapii przeciwnowotworowych i możliwe podejścia terapeutyczne. **(A)** Rozpad kompleksu eIF4E/G na skutek działania związków małowcząsteczkowych. **(B)** Inaktywacja białka eIF4E przez związki małowcząsteczkowe blokujące fosforylację eIF4E lub 4E-BP. Defosforylowane 4E-BP mocno wiążą się z eIF4E uniemożliwiając powstanie promującego translację kompleksu eIF4F. **(C)** Obniżenie stężenia eIF4E przez terapię antysensowną. **(D)** Wiązanie aktywnego eIF4E przez analogi kapu. **(E)** Dokładny opis sytuacji przedstawionej w punkcie **D**. W przypadku komórki nie wykazującej cech nowotworowych (górze) poziom eIF4E jest niski a ekspresja słabym mRNA jest dużo niższa niż silnych mRNA. Podniesienie poziomu eIF4E (środek) ekspresja słabych mRNA znacząco wzrasta co może prowadzić do transformacji nowotworowej. Obniżenie poziomu eIF4E przy pomocy syntetycznych analogów kapu (dół) może zredukować ilość aktywnego eIF4E dostępnego dla cząsteczek mRNA przez co jedynie silne mRNA będą podlegać wydajnej translacji.

cząsteczki grup hydrofobowych pozwalających na lepsze przenikanie przez błony komórkowe.<sup>571, 572</sup> Inną strategią jest modyfikacja łańcucha fosforanowego co pozwala zarówno na podniesienie odporności na degradację jak i zwiększenie powinowactwa do eIF4E.<sup>484, 486, 489, 573</sup> W celu wprowadzenia analogów kapu oraz innych nukleotydów do komórki także zaproponowano szereg rozwiązań takich jak polimery kationowe<sup>574</sup>, liposomy<sup>575</sup>, białka strukturalne wirusów<sup>576, 577</sup> oraz syntetyczne nanocząsteczki.<sup>578</sup>

W celu wyznaczenia powinowactwa analogów kapu do eIF4E oraz mechanizmu ich wiązania wykorzystano szereg metod takich jak krystalografia rentgenowska<sup>311, 579</sup>, spektroskopia NMR<sup>580</sup>, techniki oparte na fluorescencji<sup>311</sup>, rezonans plazmowy<sup>581</sup> oraz spektrometria mas<sup>530, 582</sup>. Dane uzyskane z badań strukturalnych także znalazły zastosowanie w racjonalnym projektowaniu nowych inhibitorów translacji o znacznie zmodyfikowanej strukturze (jeśli porównać do naturalnego kapu, m<sup>7</sup>GpppN).<sup>530, 583</sup> Dobrą metodą do wyznaczania stałych asocjacji analogów kapu do eIF4E jest synchronizowane czasowo miareczkowanie fluorescencyjne (szczegóły opisane w rozdziale 1.7 *Metody stosowane w pracy doktorskiej*). Metoda ta nie może być stosowana do analogów znakowanych fluorescencyjnie lub posiadających nietypowy mechanizm wiązania z białkiem.<sup>584</sup> Dlatego też opracowano szereg innych metod zwykle opartych na wyparciu referencyjnego analogu kapu przez testowany związek. Część z nich opiera się na znakowaniu radioizotopowym<sup>583</sup>, niektóre stosują metody fluorescencyjne.<sup>581</sup> Istnienie wielu technik pomiaru powinowactwa do eIF4E stwarza pewne problemy z porównywaniem uzyskanych wyników zwłaszcza, że różne analogi kapu są stosowane jako związki referencyjne.<sup>570</sup> Ponadto należy pamiętać, że z uwagi na warunki fizyczne i środowisko reakcji stałe  $K_{AS}$  wyznaczone przy użyciu różnych metod nie są ze sobą do końca tożsame. Ocena potencjału inhibitorowego analogów kapu w systemach zbliżonych do naturalnych także jest złożonym zagadnieniem. Badania biochemiczne przeprowadzone są zwykle w warunkach *in vitro* wykorzystując modelowy system translacji zwykle oparty na ekstraktach komórkowych<sup>489</sup> lub prostych modelach zwierzęcych takich jak embriony *Danio rerio*.<sup>585</sup> Ograniczeniem takiego podejścia jest problem z rozróżnieniem czy obserwowany efekt inhibitorowy wynika z ograniczenia aktywności eIF4E czy też innego etapu translacji.<sup>570</sup>

#### 1.6.3.1.3.4. Analogi kapu jako inhibitory translacji – wybrane przykłady

Jedne z pierwszych badań przesiewowych przeprowadzono pod koniec lat 90<sup>tych</sup>, wykonano pomiary wydajności translacji w układzie RRL (ang. *Rabbit reticulocyte lysate*) dla takich związków jak mono- di- oraz trifosforany m<sup>7</sup>Guo oraz dinukleotydowe analogi kapu o różnej długości mostka fosforanowego. Wiele z tych związków posiadało zmodyfikowany pierścień cukrowy lub zasadę azotową. Potwierdzono wtedy, że wydłużenie łańcucha fosforanowego dodatnio koreluje z potencjałem inhibitorowym (wartości IC<sub>50</sub> wynoszą 4,4, 7,5 oraz 382,0 μM odpowiednio dla m<sup>7</sup>GTP, m<sup>7</sup>GDP oraz m<sup>7</sup>GMP). Niektóre sztuczne modyfikacje miały pozytywny wpływ na blokowanie translacji, przykładowo zastąpienie grupy metylowej w pozycji N7 przez podstawnik aromatyczny zmniejszało kilkukrotnie wartość IC<sub>50</sub>. Dodatkowa metylacja w pozycji N2 też miała korzystny wpływ a związek posiadający obydwie modyfikacje *p*-Cl-bn<sup>7</sup> m<sup>2</sup>GMP posiadał wartość IC<sub>50</sub> zbliżoną do m<sup>7</sup>GDP (14,2 μM). Jednakże opisane efekty nie były synergistyczne z wydłużaniem łańcucha fosforanowego. Wykazano też, że sztywność konformacyjna pierścienia cukrowego oraz metylacja grup hydroksylowych rybozy (2' OH lub 3' OH) mają istotny wpływ na potencjał inhibitorowy.<sup>586</sup>

Późniejsze badania biofizyczne pomogły w lepszym zrozumieniu zaobserwowanych efektów. Pomiary fluorescencyjne wykazały, że w przypadku nukleotydów z podstawnikiem aromatycznym w pozycji N7 dodatkowa stabilizacja kompleksu kap-eIF4E ma charakter entropowy.<sup>314</sup> Natomiast dane krystalograficzne uwidoczniły dodatkowe interakcje podstawnika aromatycznego z hydrofobowym miejscem wiążącym, powstałym na skutek obrotu o 180 °C jednej z reszt Trp zaangażowanych w wiązanie m<sup>7</sup>Guo.<sup>530</sup> Zasugerowało to, że możliwe jest opracowanie liganda nie będącego nukleotydem a mającego silne powinowactwo do eIF4E. Przeprowadzone później próby obliczeniowego projektowania analogów kapu (dokowanie molekularne) nie były bardzo efektywne gdyż pokazały słabą korelację przewidzianej Δ*G* tworzenia kompleksu z uzyskanymi doświadczalnie wynikami.<sup>572</sup> W innych badaniach otrzymano szereg pronukleotydów będących fosforoimidowymi pochodnymi bn<sup>7</sup>GMP. Związki te miały nawet słabsze powinowactwo do eIF4E niż związek wyjściowy ale po wprowadzeniu do komórki na skutek aktywności enzymu Hint-1 ulegały konwersji do fosforanu nukleozydu działając jako dość efektywny inhibitor translacji. Tryptaminowe pochodne bn<sup>7</sup>GMP także pokazały potencjał medyczny gdyż po wprowadzeniu do komórek blokowały EPM (ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*) będący ważnym etapem na drodze do transformacji nowotworowej.<sup>585</sup> Związki te były zdolne do chemosensytyzacji komórek nowotworowych przez co jednoczesne podanie gemcytabiny przyniosło większy efekt cytotoksyczny niż w przypadku podania tego związku bez inhibitora translacji.<sup>571</sup> Ponadto na drodze racjonalnego projektowania nie-nukleotydowych ligandów eIF4E otrzymano szereg związków wykazujących znaczące powinowactwo do tego białka. Uzyskane struktury krystalograficzne pokazały tworzenie się zmodyfikowanej kieszeni hydrofobowej oddziałującej z lipofilowym fragmentem liganda. Informacje były przydatne w końcowej fazie projektowania docelowych inhibitorów translacji.<sup>583</sup>

Jak wcześniej wspomniano, inne podejście do projektowania analogów kapu polega na tworzeniu związków o zmodyfikowanym łańcuchu fosforanowym zapewniającym silniejsze wiązanie do eIF4E oraz poprawioną odporność na działanie nukleaz. Po wprowadzeniu do organizmu niemodyfikowane analogi kapu (m<sup>7</sup>GpppG, m<sup>7</sup>GTP etc.) są szybko degradowane przez DcpS oraz niespecyficzne pirofosfatazy. Ludzkie białko DcpS hydrolizuje związki typu m<sup>7</sup>GpppN do m<sup>7</sup>GMP oraz NDP, m<sup>7</sup>GTP także ulega cięciu enzymatycznemu do m<sup>7</sup>GMP oraz pirofosforanu.<sup>306</sup> Dlatego też efektywny inhibitor translacji powinien wykazywać odporność na działanie DcpS. Prowadzone od około 10 lat badania nad tym zagadnieniem pokazały, że szereg modyfikacji łańcucha fosforanowego takich jak metylenobisfosfonianowa<sup>492</sup>, imidodifosforanowa<sup>486</sup>, tiosfosforanowa<sup>490</sup> lub boranofosforanowa<sup>484</sup> może stabilizować analog kapu względem DcpS. Wykazano, że zastąpienie niemostkowego atomu tlenu w pozycji sąsiadującej z resztą m<sup>7</sup>Guo przez atom siarki lub grupę BH<sub>3</sub> albo mostkowego w pozycji bliższej do m<sup>7</sup>Guo przez grupę CH<sub>2</sub> lub NH czyni związek odpornym na działanie DcpS (zarówno analogi m<sup>7</sup>GpppG jak i m<sup>7</sup>GTP). Modyfikacja metylenobisfosfonianowa generalnie obniża powinowactwo analogów kapu do eIF4E, przykładowo odporny na cięcie przez DcpS analog m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>ppG ma dwukrotnie mniejszą stałą asocjacji do eIF4E niż m<sup>7</sup>GpppG (6,3 μM<sup>-1</sup> vs 11,6 μM<sup>-1</sup>) co przekłada się na słabsze wyniki w badaniach w RRL.<sup>492, 587</sup> Wydłużenie łańcucha fosforanowego może rekompensować ten negatywny efekt.<sup>588</sup> Modyfikacja imidodifosforanowa nie ma destabilizującego wpływu na wiązanie przez eIF4E dzięki czemu odporny na

działanie DcpS związek m<sup>7</sup>GpNHpp jest dwukrotnie lepszym inhibitorem translacji niż m<sup>7</sup>GpppG (stałe IC<sub>50</sub> wynoszą odpowiednio 4,0 i 8,3 μM). Tetrafosforanowy analog m<sup>7</sup>GpNHpppG posiada jeszcze niższą wartość IC<sub>50</sub> (2,6 μM).<sup>486</sup> Selektynie wprowadzone modyfikacje tiofosforanowe także zapewniają odporność na działanie DcpS. Obydwa diastereoizomery dinukleotydu analogu kapu m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>ppG są niewrażliwe na aktywność tego białka i mają wysokie powinowactwo do eIF4E (odpowiednio 30,8 oraz 10,0 μM<sup>-1</sup> dla izomerów D1 oraz D2).<sup>490</sup> Nawet lepsze rezultaty zostały uzyskane dla tiofosforanowych analogów m<sup>7</sup>GTP. Diastereoizomery m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>pp posiadają bardzo duże stałe wiązania do eIF4E (371 oraz 190 μM<sup>-1</sup>, jedne z najwyższych zanotowanych dla analogów kapu) co też przekłada się na korzystne wartości IC<sub>50</sub> wyznaczone w RRL (0,56 μM oraz 1,44 μM dla izomerów D1 i D2 w porównaniu do 8,3 μM i 4,4 μM dla odpowiednio m<sup>7</sup>GpppG oraz m<sup>7</sup>GTP).

Dodatkowa inkubacja analogu kapu w RRL, przed dodaniem mRNA i rozpoczęciem właściwego pomiaru, prowadzi do spadku potencjału inhibitorowego dla związków pozbawionych modyfikacji w łańcuchu fosforanowym. Efekt ten nie jest obserwowalny dla związków odpornych na działanie DcpS, co sugeruje, że wynika on z hydrolizy inhibitorów przez DcpS.<sup>489</sup> Niedawno wykazano również, że boranofosforanowe analogi kapu także wykazują odporność na działanie DcpS. Diastereoizomery m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pG, izomer D1 m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub>ppG oraz pseudosymetryczny analog m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G są degradowane w minimalnym stopniu natomiast izomer D2 m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub>ppG nie wykazuje znaczącej odporności. Wszystkie wymienione związki posiadają podobne (albo wyższe) powinowactwo do eIF4E niż niemodyfikowany analog, m<sup>7</sup>GpppG.<sup>484</sup>

Podjęto również szereg badań nad dostarczaniem analogów kapu do wnętrza komórek. Jednym z rozwijanych pomysłów jest kowalencyjne przyłączenie tych związków do kompleksu dodekahedronu, będącego elementem strukturalnym kapsydu adenowirusa, odpowiedzialnym za wnikanie do cytoplazmy. Wcześniejsze wyniki pokazały, że możliwe jest dołączenie do niego związków drobnocząsteczkowych z wykorzystaniem grupy ε-aminowej reszty lizyny i taka modyfikacja nie zaburza wnikania do komórek.<sup>589</sup> Koniugaty z analogami kapu także wydajnie wnikały do komórek oraz miały właściwości przeciwnowotworowe względem komórek raka wątroby w modelu szczurzym. Obserwowano wtedy spadek poziomu eIF4E oraz c-myc w cytoplazmie i właściwości te były wzmacniane przez obecność doksorubicyny.<sup>576</sup> Innymi rozwijanymi strategiami dostarczania analogów kapu jest wykorzystanie polimerowych nanokapsulek opartych o polipirol i jego modyfikacje.<sup>590, 591</sup>

#### 1.6.3.1.4. Fluorescencyjne analogi kapu

Pomimo tego, że znakowane fluorescencyjnie analogi kapu mogłyby znaleźć bardzo wiele zastosowań w badaniach mechanizmu inicjacji translacji oraz ścieżek degradacji mRNA to w literaturze jest bardzo mało doniesień na temat syntezy i badań z udziałem takich związków.

Do tej pory opisano tylko jeden znakowany fluorescencyjnie analog kapu, którym jest analog m<sup>7</sup>GTP zmodyfikowany przez wprowadzenie grupy antranilowej (Ant) do pierścienia rybozy, Ant-m<sup>7</sup>GTP.<sup>592</sup> Autorzy uznali, że spośród niedużych znaczników fluorescencyjnych grupa Ant ma najbardziej pożądane właściwości takie jak znaczna odporność na fotowysyblanie. Ponieważ wcześniejsze badania nad wiązaniem analogów kapu przez eIF4E pokazały, że modyfikacje w pierścieniu rybozy mają marginalne znaczenie w rozpoznaniu przez eIF4E to znacznik fluorescencyjny został przyłączony do pierścienia w pozycji 2' lub 3'. Podobnie jak w przypadku innych nukleotydów znakowanych grupą Ant na rybozie Ant-m<sup>7</sup>GTP występuje jako mieszanina równowagowa 2' (35%) oraz 3' (65%) regioizomerów. Właściwości spektralne tego związku zostały dość dobrze opisane. Intensywność fluorescencji nie zmienia się znacząco pod wpływem pH (zmiany sięgają ~20%, maksimum dla pH 7,0) ale zwiększa się ona znacząco gdy w środowisku obecne są rozpuszczalniki takie jak etanol lub DMF. Przyrost siły jonowej (do 0,5 M KCl) nie wpływa na zmiany charakterystyki spektralnej związku. Zaobserwowano także, że Ant-m<sup>7</sup>GTP wiąże się z eIF4E, wiązanie jest silniejsze niż dla m<sup>7</sup>GpppG (~1,4 razy większe) ale słabsze niż w przypadku niemodyfikowanego m<sup>7</sup>GTP. Pomiary wygaszania fluorescencji sugerowały, że fluorofor jest przynajmniej częściowo ulokowany w kieszeni hydrofobowej białka.<sup>592</sup>

Ant-m<sup>7</sup>GTP wykorzystano także do badań nad wiązaniem się PABP do kompleksu eIF4F w ekstrakcie roślinnym. Zauważono, że wiązanie kapu przez eIF4F znacznie zwiększa siłę interakcji tego kompleksu z PABP, badano także rolę białka eIF4B w tworzeniu kompleksu inicjującego translację.<sup>593, 594</sup>

## 1.7 Metody stosowane w pracy doktorskiej

Rozdział ten przedstawia w nieco szerszym zakresie techniki biologiczne, biochemiczne oraz biofizyczne stosowane podczas realizacji projektu doktoranckiego. Metody syntezy, znakowania oraz oczyszczania analogów kapu zostały opisane we wcześniejszych rozdziałach.

### 1.7.1. Techniki pracy z DNA i RNA

#### 1.7.1.1. Podstawowe techniki inżynierii genetycznej

Od czasu swojego powstania w latach 70<sup>tych</sup> dwudziestego wieku inżynieria genetyczna stanowi jedno z podstawowych narzędzi stosowanych w biochemii, biologii molekularnej oraz pokrewnych dyscyplinach. Do podstawowych metod stosowanych w inżynierii genetycznej należą techniki klonowania molekularnego, reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), sekwencjonowania kwasów nukleinowych oraz ich wprowadzania do komórek i żywych organizmów. Obecnie istnieje bardzo wiele metod (oraz ich modyfikacji) stosowanych w badaniach podstawowych oraz aplikacyjnych. Z uwagi na szerokość zagadnienia opisanie ich tutaj nie jest możliwe, natomiast dobry przegląd podstaw inżynierii genetycznej można znaleźć w szeregu książek akademickich.<sup>1, 147</sup>

#### 1.7.1.2. Izolacja i oczyszczanie RNA

Obecnie najpowszechniejszymi technikami izolacji RNA jest wykorzystanie komercyjnie dostępnych zestawów (kitów), które zastępują standardowe procedury laboratoryjne. Dokładna procedura jest zależna od producenta jednakże można wyróżnić podstawowe etapy.<sup>595, 596</sup> Jeżeli RNA jest izolowany z materiału biologicznego (bakterie, hodowle komórkowe, materiał roślinny lub zwierzęcy) to materiał musi być dokładnie zhomogenizowany, do czego wykorzystuje się zarówno narzędzia mechaniczne (moździerz, homogenizatory szklane) jak i ultradźwięki. Z uwagi na duże rozpowszechnienie (zarówno w samym materiale biologicznym jak i otoczeniu) rybonukleaz zaleca się dodawanie inhibitorów tych enzymów. Rozdrobniony materiał jest wirowany (<10.000 rpm) a supernatant jest dalej oczyszczany przy użyciu komercyjnych kolumn chromatograficznych, które w większości przypadków pozwalają na uzyskanie czystego RNA. W zależności od potrzeb można w ten sposób oczyszczać całkowity RNA z materiału biologicznego lub jego frakcje o określonej wielkości lub właściwościach.

#### 1.7.1.3. Wysokorozdzielcza elektroforeza SDS PAGE

Cienkie (< 1 mm) żele poliakrylamidowe są stosowane do rozdzielania elektroforetycznego krótkich (< 500 nukleotydów) fragmentów DNA lub RNA.<sup>597, 598</sup> Istnieje szereg technik przygotowania i elektroforezy takich żeli, jednak najczęściej stosowana jest elektroforeza w warunkach denaturujących z użyciem mocznika jako czynnika denaturującego. Wysoka rozdzielczość takich żeli pozwala w wielu przypadkach uzyskać rozdzielczość jednego nukleotydu, co sprawia, że często nazywane są „żelami sekwencyjnymi” i przed rozwojem technik takich jak elektroforeza kapilarna były one standardowo wykorzystywane w sekwencjonowaniu DNA.<sup>597</sup> Do rozdzielania krótkich fragmentów RNA stosuje się żele zawierające 6-8 M stężenie mocznika i zawartość akrylamidu w zakresie 8-16%. Stężenie akrylamidu powyżej 10% zapewnia bardzo dobrą separację oligonukleotydów nawet na poziomie różnic w jednym nukleotydzie ale znacząco wydłuża czas elektroforezy (> 6 h).

Poza podstawową techniką w niektórych przypadkach stosowane są modyfikacje takie jak wykorzystanie gradientu buforu<sup>599</sup> lub poliakrylamidu w żelu<sup>600</sup> oraz dodatek formamidu. Użycie gradientów pozwala na poprawę rozdzielczości żelu podczas gdy formamid może chronić przed zaburzeniami migracji kwasów nukleinowych podczas elektroforezy.<sup>597</sup>

#### 1.7.1.4. Transkrypcja *in vitro*

Transkrypcja *in vitro* jest procesem syntezy cząsteczki RNA przeprowadzanym przez polimerazę RNA w oparciu o liniową matrycę DNA zawierającą odpowiedni promotor oraz sekwencję która ma zostać poddana transkrypcji. Pierwotnie większość tego typu technik była oparta o wykorzystanie ekstraktów pochodzących z komórek eukariotycznych (drożdży<sup>601</sup>, komórki ssaczych<sup>602</sup> lub z embryonów *Drosophila* sp.<sup>603</sup>) jednakże obecnie coraz częściej wykorzystuje się systemy oparte o wirusowe lub bakteryjne polimerazy RNA, nie wymagające stosowania drogich i trudnych do uzyskania ekstraktów komórkowych. Typowa reakcja transkrypcji wymaga obecności matrycy DNA, polimerazy RNA, trifosforanów rybonukleozydów, inhibitorów rybonukleaz oraz odpowiedniego buforu.<sup>604</sup> Zazwyczaj wykorzystywane są wirusowe polimerazy RNA takie jak T7 lub SP6.<sup>605</sup> Transkrypcja *in vitro* pozwala na otrzymywanie wysokiej czystości RNA na potrzeby badań splicingu, interferencji RNA czy też produkcji szczepionek RNA. Z uwagi na to, że do wielu zastosowań potrzebne są transkrypty imitujące funkcjonalne mRNA to konieczne jest poszerzenie podstawowej metody transkrypcji o dodanie struktury kapu oraz ogona poliA.<sup>570</sup> Dołączenie struktury kapu może mieć miejsce po zakończeniu transkrypcji przy pomocy odpowiednich enzymów lub też kotranskrypcyjnie przy pomocy analogów kapu dołączanych przez polimerazę RNA. Pierwsza metoda wykorzystuje zwykle enzym kapujący pochodzący z wirusa *Vaccinia*, który dodaje m<sup>7</sup>Guo do 5' końca RNA używając GTP oraz S-adenozylometioniny jako donora grupy metylowej.<sup>606</sup> Zaletą tej metody jest duża wydajność oraz możliwość selektywnego znakowania radioaktywnego kapu. Druga metoda opiera się na dodaniu nadmiaru (minimum 5-krotnego) analogu kapu względem rybonukleozydów gdyż w takich warunkach statystycznie większość transkryptów będzie posiadała wbudowany analog kapu na swoim 5' końcu. Niewątpliwą zaletą tej metody jest możliwość dołączania nietypowych analogów kapu, które zazwyczaj nie mogą zostać uzyskane przy pomocy enzymów kapujących, a często modyfikujących w istotny sposób właściwości RNA.<sup>607, 608</sup> Innym podejściem do syntezy transkryptów RNA jest synteza chemiczna lub „chemiczno-enzymatyczna”, gdzie struktura kapu także jest dołączana enzymatycznie do otrzymanych na drodze chemicznej, odpowiednio modyfikowanych fragmentów RNA.<sup>609</sup> Z uwagi na duże koszty oraz stopień komplikacji obecnie znajduje ona zastosowanie jedynie w syntezie krótkich transkryptów.

#### 1.7.1.5. Translacja *in vitro*

Translacja *in vitro* jest procesem pozwalającym na otrzymanie białka w oparciu o wybraną sekwencję mRNA (wyizolowanego z materiału biologicznego lub uzyskanego *in vitro*) wprowadzona do układu w którym znajdują się komponenty potrzebne do inicjacji i podtrzymania procesu translacji takie jak czynniki inicjacji i elongacji translacji, rybosomy i syntetazy aminoacylo-tRNA. Metoda ta znajduje szereg zastosowań takich jak identyfikacja i charakteryzacja naturalnych mRNA, mutagenesa połączona z PCR, badania przesiewowe leków przy pomocy fagowej lub rybosomowej ekspresji białek (ang. *phage display*) czy też pomiar wydajności translacji dla modyfikowanych transkryptów RNA.<sup>570, 610, 611</sup> Najbardziej rozpowszechnionymi systemami eukariotycznymi są układy bazujące na lizacie z retikulocytów króliczych (RRL) oraz lizacie z kielków pszenicy. Obecnie wprowadza się także nowsze systemy wykorzystujące komórki *Leishmania* sp.<sup>612</sup> lub komórki HeLa.<sup>613</sup> Ponadto dostępny jest szereg systemów prokariotycznych opartych na *E. coli*<sup>614</sup>, *Thermus thermophilis*<sup>615</sup> oraz bardzo wydajnego systemu PURE opartego o koncepcje biologii syntetycznej.<sup>616</sup>

W najprostszej wersji do układu wprowadza się wcześniej otrzymane transkrypty RNA, które mogą być zarówno zawierać 5' kap jak i sekwencję IRES a wydajność translacji jest mierzona albo poprzez autoradiografię (wykorzystywane są radioaktywnie znakowane aminokwasy, zwykle [<sup>35</sup>S]metionina) lub przez wykorzystanie biotynylowanych aminokwasów.<sup>611</sup> Jeżeli celem eksperymentu nie jest uzyskanie określonego białka a jedynie ocena wydajności translacyjnej transkryptów RNA to dobrą metodą jest wykorzystanie do tego celu transkryptów lucyferazy.<sup>617</sup> Powstałe białko jest zdolne do przeprowadzanie enzymatycznej konwersji lucyferyny do oksolucyferyny w wyniku której dochodzi do emisji fotonów w zakresie widzialnym.<sup>618</sup> Pomiar intensywności emisji w luminometrze pozwala na wyznaczenie stężenia białka co przekłada się na wydajność jego translacji.

## 1.7.2. Wybrane techniki pracy z komórkami

### 1.7.2.1. Nokauty genetyczne i wyciszanie genów

Nokaut genetyczny polega na wyłączeniu funkcjonowania danego genu w genomie zazwyczaj przez fizyczne usunięcie DNA lub uszkodzenie fragmentu genomowego DNA. Jeżeli jednak nie zachodzi konieczność całkowitej inaktywacji genu na poziomie genomu (co w wielu przypadkach jest kłopotliwą technicznie procedurą) a jedynie redukcja poziomu ekspresji to częściej stosowaną techniką jest wyciszanie genów na poziomie RNA, które często w literaturze jest tożsamy z nokautem genetycznym, mimo, że nie jest związane z modyfikacją genomu komórki.<sup>147</sup> Istnieje kilka metod wyciszania genów w komórkach eukariotycznych, większość obecnie stosowanych opiera się na wykorzystaniu zjawiska interferencji RNA.<sup>619</sup> W jednej z metod do komórek wprowadza się wektory wirusowe (oparte często na adenowirusach lub lentiwirusach)<sup>620</sup>, które stanowią nośniki dla sekwencji shRNA (ang. *short hairpin RNA*), które umożliwiają wyciszenie ekspresji danego genu przez wykorzystanie RNAi.<sup>621</sup> Inne techniki opierają się na dostarczaniu do komórek sekwencji krótkich sekwencji siRNA przeciw wybranym genom.<sup>622</sup> Ponadto od kilku lat wzrasta zainteresowanie prokariotycznymi systemami CRISPR i TALEN, które mogą być wykorzystane do precyzyjnego edytowania genomów organizmów eukariotycznych.<sup>623</sup>

### 1.7.2.2. Wprowadzanie kwasów nukleinowych do komórek

Większość komórek eukariotycznych nie jest zdolna do samoistnego pobierania kwasów nukleinowych z otoczenia. W celu dostarczenia cząsteczek DNA i RNA do cytoplazmy opracowano szereg technik transfekcji takich jak nukleofekcja lub lipofekcja. Lipofekcja opiera się na związaniu cząsteczek kwasu nukleinowego z lipofilowym polimerem przez co mogą one przeniknąć przez błonę komórkową.<sup>624</sup> Natomiast nukleofekcja, uważana za jedną z najbardziej efektywnych metod transfekcji komórek eukariotycznych, jest metodą mieszaną wykorzystującą zarówno zmianę potencjału elektrycznego jak i szereg związków chemicznych ułatwiających wnikanie kwasów nukleinowych.<sup>625</sup> Ponadto istnieją metody biofizyczne, wykorzystujące magnetyczne cząsteczki (magnetofekcja) lub tzw. działło genowe (ang. *gene gun*) wprowadzające cząsteczki pokryte kwasami nukleinowymi do cytoplazmy.<sup>626</sup>

## 1.7.3. Znakowanie izotopowe biopolimerów

### 1.7.3.1. Podstawowe rodzaje znaczników izotopowych

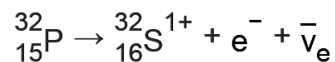
Znakowanie izotopowe jest techniką, w której określone atomy są zastępowane przez ich izotopy w celu uzyskania zmodyfikowanych cząsteczek, których los może być dalej monitorowany za pomocą technik biochemicznych lub biofizycznych. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w biochemii (badanie mechanizmów reakcji enzymatycznych, ścieżek metabolicznych) oraz biologii komórki. W zależności od rodzaju izotopu zwykle wyróżnia się znakowanie stabilnymi izotopami (np. <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) jak i radioaktywnymi (<sup>31</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I etc.).<sup>3</sup> Obecność i zachowanie takich znaczników może być mierzone różnymi technikami takimi jak spektroskopia NMR, spektroskopia IR, spektrometria mas lub autoradiografia. Radionuklid to atom posiadający niestabilne jądro, podlegające jednym z podstawowych rozpadów radioaktywnych ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , wychwyt K) a jego intensywność promieniowania w jednostce czasu jest zależna od czasu połowicznego rozpadu danego izotopu. Większość izotopów stosowanych w badaniach chemicznych i biologicznych cechuje się stosunkowo krótkim czasem połowicznego rozpadu (~kilka minut do ~kilkanaście dni) oraz emisją promieniowania o małej przenikliwości (niskoenergetyczne elektrony, cząstki  $\alpha$ ). Emiterzy wysokoenergetycznych elektronów lub promieniowania  $\gamma$  są stosowane rzadziej.

### 1.7.3.2. Radioaktywne znakowanie kwasów nukleinowych

Izotopami powszechnie stosowanymi w znakowaniu kwasów nukleinowych są <sup>3</sup>H (tryt, T), <sup>35</sup>S, <sup>33</sup>P, <sup>32</sup>P. Z uwagi na wysoką energię emisji oraz niskie koszt uzyskiwania izotop <sup>32</sup>P znajduje najszersze zastosowanie



w badaniach kwasów nukleinowych. Wykazuje on czas połowicznego rozpadu 14.3 dnia i ulega rozpadowi zgodnie z następującym równaniem:



Jednakże wysokoenergetyczne elektrony powstające w czasie jego rozpadu wymagają dodatkowej ochrony miejsca pracy (ekrany pleksiglasowe o grubości > 1 cm) dlatego obecnie dąży się do zastępowania go izotopem  ${}^{33}\text{P}$ , który emituje elektrony o niższej energii i może być stosowany bez dodatkowych ekranów ochronnych. Najczęściej radioaktywne izotopy fosforu są wprowadzane enzymatycznie, podczas syntezy kwasów nukleinowych *in vitro* lub przez wykorzystanie odpowiednich kinaz. W tym celu wykorzystuje się znakowane radioaktywnie substraty dla tych enzymów, zwykle GTP lub ATP. Nukleotydy te albo ulegają inkorporacji do kwasu nukleinowego albo są wykorzystywane jako donory wyznakowanej radioaktywnie grupy fosforanowej.<sup>627</sup>

Radioaktywne znakowanie kwasów nukleinowych zwykle ma na celu ich wizualizację oraz oznaczenie ilościowe po rozdzielaniu elektroforetycznym w żelu lub po transferze na polimeryczną membranę. W tym przypadku najpowszechniejszymi technikami są autoradiografia z wykorzystaniem filmu X-ray oraz użycie ekranów wzmacniających lub fosforoobrazowania.

Autoradiografia wykorzystuje filmy fotograficzne wrażliwe na promieniowanie elektromagnetyczne lub elektrony. W zależności od izotopu można użyć filmów o różnej wrażliwości. Zwykle filmy dobrze działające z izotopem  ${}^{32}\text{P}$  są zbyt mało wrażliwe by wykorzystać je w pracy z  ${}^{14}\text{C}$ ,  ${}^{35}\text{S}$ ,  ${}^{33}\text{P}$ . Alternatywnie można wtedy wydłużyć czas ekspozycji lub wykorzystać fluorografię w celu zwiększenia czułości filmu. W tej metodzie promieniowanie pochodzące od izotopu wzbudza cząsteczki związku organicznego dodanego do próbki, które emitują drugorzędowe promieniowanie w zakresie UV/VIS rejestrowane na filmie fotograficznym.<sup>628</sup> Inną metodą poprawienia czułości jest użycie ekranów wzmacniających zapewniających także bardziej liniową odpowiedź. Minusem tej metody jest mniejsza uniwersalność – ekrany są kompatybilne jedynie z izotopami emitującymi promieniowanie  $\gamma$  ( ${}^{125}\text{I}$ ) lub wysokoenergetyczne elektrony ( ${}^{32}\text{P}$ ). W niektórych przypadkach dochodzi też do spadku rozdzielczości przestrzennej na skutek rozpraszania promieniowania.<sup>629</sup>

Innym często stosowanym rozwiązaniem są ekrany do fosforoobrazowania, które mogą wykrywać izotopy takie jak  ${}^{32}\text{P}$ ,  ${}^{125}\text{I}$ ,  ${}^{14}\text{C}$ ,  ${}^{35}\text{S}$  a nawet  ${}^3\text{H}$ . Ekrany takie składają się z kryształów  $\text{BaFBr:Eu}^{2+}$ .<sup>630</sup> Gdy ekran wystawiony jest na działanie promieniowania jonizującego elektrony z  $\text{Eu}^{2+}$  są więzione w centrach F kompleksu  $\text{BaFBr}$  co prowadzi do powstania kationów  $\text{Eu}^{3+}$  w sieci krystalicznej. Taki ekran po ekspozycji na światło lasera o długości fali 690 nm emituje fotony w zakresie widzialnym (powrót do stanu utlenienia (II) europu związany jest z uwolnieniem fotonu). Rejestracja tej emisji prowadzi do uzyskania obrazu badanego obiektu o rozdzielczości wyższej niż w przypadku filmu fotograficznego. Opisana technika posiadają szereg zalet w porównaniu do filmów fotograficznych. i) Liniowy zasięg dynamiczny w zakresie 5 rzędów wielkości (film ma jedynie 1.5 rzędu). ii) Czas ekspozycji skrócony 10 do 250 razy. iii) Duża prostsza densytometryczna analiza ilościowa iv) Duża czułość powoduje, że metody takie jak fluorografia lub ekrany wzmacniające nie są potrzebne. v) Ekrany mogą być bardzo długo używane bez zauważalnego spadku jakości obrazowania.<sup>631</sup>

Obraz uzyskany za pomocą powyższych metod może zostać poddany analizie densytometrycznej. Polega ona na porównaniu emisji światła przenikającego przez próbkę z intensywnością światła padającego bezpośrednio na powierzchnię. Natężenie światła przenikającego przez próbkę powinno być proporcjonalne do poziomu radioaktywności żelu. Częstym problemem jest przesylenie próbki podczas zbierania sygnału od radionuklidu co zaburza liniową odpowiedź i może być źródłem błędów.<sup>631</sup>

### 1.7.3.3. Znakowanie białek na potrzeby spektroskopii NMR

Większość obecnie przeprowadzonych eksperymentów NMR opiera się złożonych sekwencjach impulsów i pomiarów wzajemnych interakcji spinów należących do różnych jąder aktywnych w spektroskopii NMR ( ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{15}\text{N}$ ). Z powodu bardzo małej zawartości izotopów  ${}^{13}\text{C}$  i  ${}^{15}\text{N}$  w materiale biologicznym oraz ograniczenia czułości aparatury bez dodatkowego znakowania izotopowego byłoby możliwe rejestrowanie sygnałów dla tych jąder. W większości przypadków (poza wykorzystaniem systemów ekspresji białek *in vitro*) znakowanie izotopowe

prorowadzone jest *in vivo*, przez białka ekspresjonowane w bakteriach. Znaczniki izotopowe są inkorporowane do białek ponieważ bakterie są hodowane na pożywce minimalnej zawierającej sole mineralne i pierwiastki śladowe potrzebne do przetrwania oraz ściśle określone źródła węgla i azotu, przez co możliwa jest kontrola nad procesem znakowania izotopowego.

Najprostszym schematem znakowania jest znakowanie azotem  $^{15}\text{N}$ . Jest ono osiągnięte przez hodowlę bakterii na pożywce minimalnej z dodatkiem  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  oraz naturalnej glukozy. Taka procedura jest wystarczająca do rejestracji prostych eksperymentów  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Dodatkowo możliwe jest przeprowadzenie niektórych eksperymentów relaksacyjnych oraz N-H RDC. W przypadku małych białek eksperymenty  $^{15}\text{N}$ -NOESY oraz  $^{15}\text{N}$ -TOCSY umożliwiają przyporządkowanie sygnałów do reszt aminokwasowych (patrz Rozdział 1.7.8).<sup>632</sup>

Bardziej złożone schematy znakowania uwzględniają także wymianę jąder węgla  $^{12}\text{C}$  na węgiel  $^{13}\text{C}$ , co jest osiągnięte przez dodanie do pożywki  $^{13}\text{C}$ -glukozy. Takie znakowanie jest standardowo stosowane do bardziej złożonych eksperymentów z potrójnym rezonansem stosowanych w rozwiązywaniu struktur białek oraz ich kompleksów.<sup>632</sup> W niektórych przypadkach (wydłużone czasy relaksacji dużych białek prowadzące do znacznego poszerzenia i rozmycia ich sygnałów) stosuje się też potrójne znakowanie ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Deuteracja redukuje te negatywne efekty przez co możliwe jest otrzymanie dobrej jakości widm. Deuterowanie białka do 70-80% jest osiągalne przez hodowlę bakterii w  $\text{D}_2\text{O}$ , jeżeli konieczna jest deuteracja powyżej 95% to do pożywki dodaje się  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ -glukozę. Ponieważ protony amidowe w łańcuchu polipeptydowym są wymienialne to na potrójnie znakowanym białku możliwe jest przeprowadzenie większości eksperymentów uwzględniających proton amidowy.<sup>633</sup>

W niektórych przypadkach stosuje się także selektywne znakowanie izotopowe. Jednym z przykładów jest znakowanie IVL, gdzie całe białko jest wyznakowane  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  za wyjątkiem reszt Ile, Val, Leu gdzie jedna z grup metylowych jest ma następującą sygnaturę izotopową  $^2\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ , a druga  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  co zmienia intensywność ich sygnałów na widmie. Efekt ten jest uzyskiwany przez hodowlę na pożywce minimalnej z  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ -glukozie oraz  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Na krótko przed indukcją ekspresji białka do pożywki dodaje się selektywnie wyznakowane prekursorzy metaboliczne Leu, Ile i Val. Takie znakowanie znajduje zastosowanie w badaniach nad dużymi białkami w celu uzyskania dodatkowych informacji więzów przestrzennych z NOE.<sup>634</sup>

## 1.7.4. Metody wykorzystujące absorbancję i fluorescencję białek

### 1.7.4.1. Fluorescencyjne reszty aminokwasowe

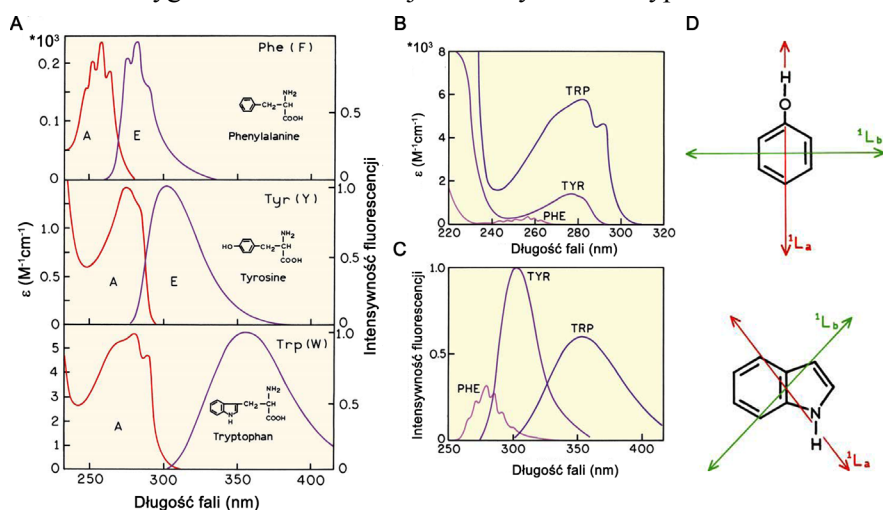
Naturalnie występujące aminokwasy aromatyczne wykazują właściwości fluorescencyjne (Phe, Trp, Tyr) jednakże są one relatywnie rzadkie w porównaniu do innych aminokwasów. Widma absorpcyjne i emisyjne tych aminokwasów przedstawiono na **Rys. 1.55**. Emisja białek jest zdominowana przez tryptofan, absorbujący przy najdłuższej długości fali i mający największy współczynnik ekstynkcji. Energia pobrana przez inne reszty aminokwasowe jest często przenoszona na reszty tryptofanu.<sup>113</sup>

Ponieważ tryptofan stanowi ~1% wszystkich reszt aminokwasowych w białkach to wiele białek posiada tylko jedną resztę Trp, co może znacznie ułatwić interpretację danych spektroskopowych. Ważną cechą fluorescencji Trp jest silna wrażliwość na lokalne zmiany środowiska (**Rys. 1. 56**) takie jak zmiany konformacyjne, wiązanie liganda lub denaturacja.<sup>113, 635</sup> Co więcej, jest on silnie podatny na wygaszanie kolizyjne oraz zmiany geometrii wiązań wodorowych.<sup>636, 637</sup> Właściwości emisyjne tyrozyny i fenyloalaniny są znacznie mniej podatne na zmiany środowiska.<sup>113</sup>

W przypadku gdy badane białko posiada kilka aminokwasów aromatycznych interpretacja danych spektralnych staje się utrudniona, zwłaszcza biorąc pod uwagę, że otoczenie chemiczne każdej z reszt aminokwasowych jest odmienne. Dodatkową komplikacją jest to, że wiele reszt Trp wykazuje wielowykładniczy zanik fluorescencji. Jest to spowodowane występowaniem dwóch stanów wzbudzonych o bardzo podobnych energiach  $^1\text{L}_a$  oraz  $^1\text{L}_b$  (**Rys. 1.55**), ich przejścia elektronowe prowadzą do różnych widm emisyjnych, absorpcyjnych oraz mają odmienną podatność na polarność rozpuszczalnika.<sup>637</sup> Z tego powodu często stosowaną metodą upraszczania widm emisyjnych białek jest użycie ukierunkowanej mutagenyzy w celu redukcji liczby reszt Trp w białku albo modyfikacja środowiska chemicznego wokół tych reszt aminokwasowych.<sup>113</sup>

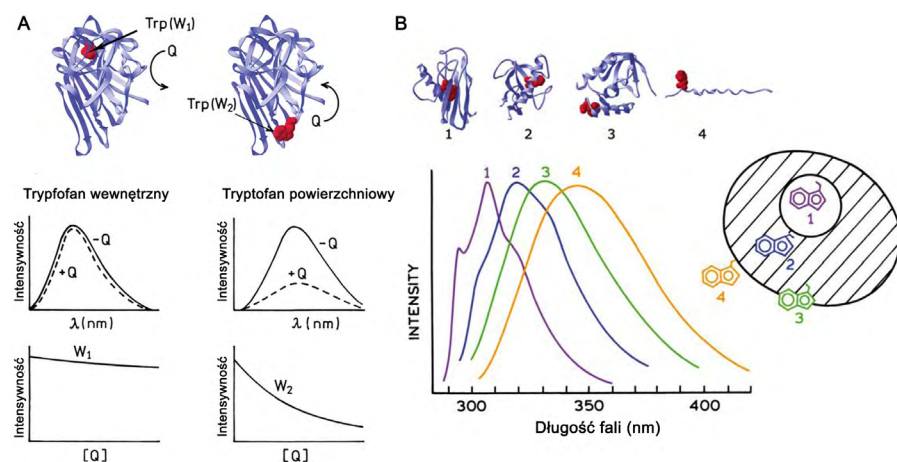
### 1.7.4.2. Właściwości fluorescencji białek

Jak wspomniano wcześniej różne reszty tryptofanu mają odmienny wkład do widma emisyjnego białka, ich maksima absorpcji, wydajności kwantowe oraz czasy życia fluorescencji mogą wykazywać istotne różnice. Są one wywołane czynnikami strukturalnymi ponieważ zdenaturowane białka mają bardzo podobne widma emisyjne (**Rys. 1.55**). Należy zauważyć, że jeżeli dane białko występuje w kilku różnych konformacjach to mają one zwykle odmienne widma emisyjne.<sup>638, 639</sup> Z tego powodu badanie emisji tryptofanu znalazło zastosowanie w badaniach nad mechanizmem zwijania się białek.<sup>113, 640</sup> Dokładne przyczyny występowania tych różnic nie zostały całkowicie poznane ale obecnie można wyróżnić kilka czynników determinujących właściwości spektralne danej reszty Trp. i) Wygaszanie przez transfer protonu z pobliskich naładowanych grup aminowych. ii) Wygaszanie przez akceptory elektronów takie jak uprotonowane grupy karboksylowe. iii) Wygaszanie przez transfer elektronu wywołane przez grupy disulfidowe i amidowe w łańcuchach bocznych oraz wiązania peptydowe w szkieletcie białka. iv) Rezonansowy transfer energii pomiędzy różnymi resztami Trp. Opisane interakcje są mocno zależne od odległości oraz obecności naładowanych grup funkcyjnych, w niektórych przypadkach obserwuje się prawie całkowite wygaszenie fluorescencji dla danych reszt tryptofanu.<sup>113, 641</sup>



**Rys. 1.55.** Właściwości absorpcyjne i fluorescencyjne białek. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2007.

Dostępność danej reszty Trp dla rozpuszczalnika może być często oszacowana przez pomiar jej podatności na wygaszanie kolizyjne (patrz **Rys. 1.56A**). Jeżeli jest ona ukryta w rdzeniu białka to jej podatność na wygaszanie będzie znacząco mniejsza niż dla reszty znajdującej się na powierzchni białka (**Rys. 1.56B**).<sup>642</sup>



**Rys. 1.56.** Wybrane właściwości emisyjne tryptofanu. Zaczerpnięto i zmodyfikowano na podstawie *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2007.

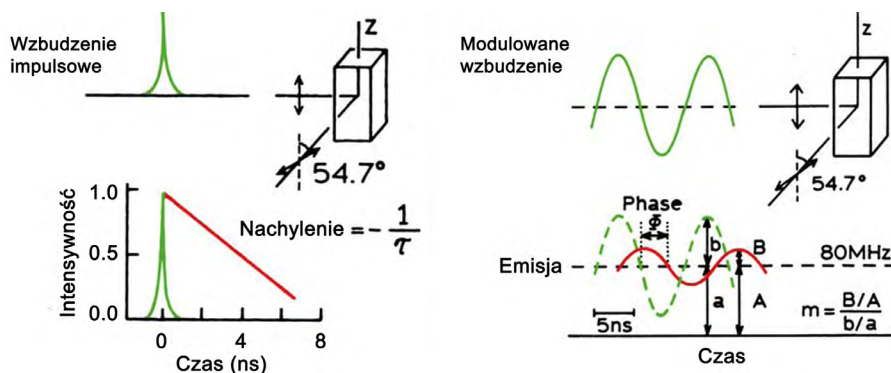
### 1.7.4.3. Miareczkowanie fluorescencyjne

Badanie powinowactwa białek do analogów kapu lub kapowanych oligonukleotydów może zostać przeprowadzone z wykorzystaniem metody miareczkowania fluorescencyjnego synchronizowanego w czasie, TST (ang. *Time-Synchronised Titration*). Polega ona polega na czasowej rejestracji zmian natężenia fluorescencji w funkcji czasu, wynikłych z dodawania do roztworu białka określonej ilości analogu kapu. Jest to możliwe ponieważ białka z rodziny eIF4E posiadają w strukturze wszystkie typy aminokwasów aromatycznych wykazujących zdolność do fluorescencji, natomiast ich fluorescencja zdominowana jest przez wkład pochodzący z reszt tryptofanu. Obserwowane w metodzie wygaszenie fluorescencji (dla białek eIF4E) jest skutkiem bezpośredniego oddziaływania analogu kapu z resztami tryptofanu w miejscu wiązania ligandu. Interakcje te prowadzą do wygaszenia fluorescencji tych reszt Trp oraz do lokalnych zmian konformacyjnych w otoczeniu pozostałych reszt Trp oddalonych od miejsca aktywnego co także ma przyczynek do zmian intensywności fluorescencji.<sup>584</sup>

### 1.7.5. Spektroskopia czasowo-rozdzielcza

#### 1.7.5.1. Wprowadzenie do metody

Obecnie w powszechnym użyciu znajdują się dwie metody pomiarów czasowo-rozdzielczych: pomiary w domenie czasu oraz domenie częstotliwości. Pierwsza z nich polega na wzbudzeniu próbki za pomocą impulsu światła, o czasie krótszym niż czas życia fluorescencji (**Rys. 1.57**). Następnie mierzona jest niezależna od czasu intensywność a czas życia jest wyznaczany matematycznie z nachylenia krzywej  $\log I(t)$  w funkcji czasu. Pomiar intensywności poprzez polaryzator zorientowany pod kątem  $54.7^\circ$  pozwala na uniknięcie efektów dyfuzji rotacyjnej i anizotropii fluorescencji. Alternatywną metodą pomiaru jest pomiar w domenie częstotliwości (metoda modulacji fazy), gdzie próbka wzbudzana jest przez światło o intensywności modulowanej w sposób falowy (**Rys. 1.57**). Intensywność światła zmienia się z dużą częstotliwością ( $\sim 100$  MHz), zbliżonej do odwrotności długości czasu życia fluorescencji. Działanie w ten sposób na badaną próbkę prowadzi do tego, że emisja także zachodzi z modulowaną częstotliwością. Jednakże czas życia stanu wzbudzonego powoduje pewne opóźnienie emisji w czasie, (w stosunku do wzbudzenia) co przedstawiono na **Rys. 1.56** jako przesunięcie w fazie ( $\phi$ ) pozwalające na wyznaczenie czasu zaniku. Obecnie obydwie metody są często używane jednakże metoda pomiarów w domenie czasu jest bardziej intuicyjna i zostanie dalej omówiona dokładniej.<sup>113</sup>



**Rys. 1.57.** Spektroskopia czasowo-rozdzielcza. Zaczepnięto i zmodyfikowano na podstawie *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2007.

Wzbudzenie próbki nieskończenie krótkim impulsem światła (funkcja  $\delta$ ) prowadzi do uzyskania początkowej populacji ( $n_0$ ) w stanie wzbudzonym, która zanika w czasie zgodnie z równaniem:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t) \quad \text{Rów. 1.15}$$

gdzie  $n(t)$  jest liczbą wzbudzonych fluoroforów w czasie  $t$  po wzbudzeniu,  $\Gamma$  jest stałą emisji a  $k_{nr}$  jest stałą zaniku bezpromienistego. Emisja jest procesem przypadkowym i każdy fluorofor może podlec temu zjawisku z takim samym prawdopodobieństwem co prowadzi do wykładniczego zaniku populacji stanów wzbudzonych. W

eksperymentem obserwuje się globalną intensywność proporcjonalną do  $n(t)$ . Całkowanie **Rów. 15** po zastąpieniu ilości fluoroforów przez intensywność fluorescencji prowadzi do następującego wyrażenia na monowykładniczy zanik fluorescencji:

$$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)} \quad \text{Rów. 1.5}$$

gdzie  $I_0$  oznacza początkową intensywność a  $\tau$  jest odwrotnością całkowitego czasu zaniku,  $\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}$ .<sup>113</sup> Jednakże, jak wspomniano w poprzednich rozdziałach białka i inne złożone próbki zwykle wykazują wiele różnych czasów zaniku. Dlatego w praktyce czas życia fluorescencji wyznacza się przez dopasowanie danych do założonego modelu zaniku, zazwyczaj jest to model wielowykładniczy opisany następującym wzorem:

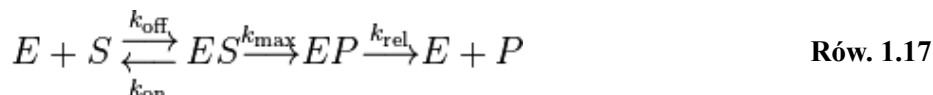
$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau) \quad \text{Rów. 1.16}$$

gdzie  $\sum \alpha_i$  jest normalizowane do jedności. Wadą takiego podejścia jest utrudnione wyznaczanie amplitud oraz czasów zaniku z danych doświadczalnych co wynika z matematycznej obróbki danych. Okazuje się, że na podstawie danej krzywej  $I(t)$  można wyznaczyć kilka zupełnie odmiennych rozkładów wielowykładniczych, prowadzących do innych rozkładów populacji i czasów życia. Dlatego też krytycznym parametrem w tego rodzaju pomiarach jest wysoki stosunek sygnału do szumu, jeżeli dane są zaszumione to wyznaczenie faktycznych danych opisujących populację fluoroforów może być niemożliwe.<sup>643</sup> By poradzić sobie z tym problemem zaproponowano szereg metod analizy danych, z których najczęściej stosowane są nieliniowa metoda najmniejszych kwadratów<sup>643</sup> oraz metoda maksymalnej entropii.<sup>644</sup> Ponadto poza wspomnianym modelem wielowykładniczym stosuje się inne modele zaniku sygnału takie jak rozkład czasów życia oraz modele z rozciągniętym czynnikiem wykładniczym (ang. *stretched exponential*).<sup>113</sup>

## 1.7.6. Kinetyka enzymatyczna pojedynczego obrotu

### 1.7.6.1. Opis metody

Kinetyka pojedynczego obrotu pozwala na dogodne wyznaczenie szybkości powstawania produktów przejściowych reakcji. Można wykazać, że gdy stężenie enzymu  $[E]$  znacznie przekracza stężenie substratu  $[S]$  to szybkość procesu katalitycznego można mierzyć bezpośrednio. Rozróżnienie pomiędzy kinetyką pojedynczego i wielokrotnego obrotu jest dobrze widoczne jeżeli rozważy się następujący mechanizm reakcji enzymatycznej:



gdzie  $k_{max}$  to stała szybkości etapu katalitycznego,  $k_{rel}$  to stała szybkości uwalniania produktu a  $k_{on}$  i  $k_{off}$  to stałe szybkości wiązania i uwalniania substratu. W klasycznych warunkach ( $[S] \gg [E]$ ), stała  $k_{cat}$  jest wyznaczana na podstawie równania Michaelisa-Menten z prędkości początkowych ( $V_{max}$ ) zakładając, że wszystkie cząsteczki enzymu są wysyczone substratem. Dlatego też stała mierzona stała  $k_{cat}$  zawiera informacje nie tylko o szybkości etapu katalitycznego ( $k_{max}$ ):

$$k_{cat} = \frac{k_{max} k_{rel}}{k_{max} + k_{rel}} \quad \text{Rów. 1.18}$$

Interpretacja  $k_{cat}$  jest zależna od tego jaki etap jest limitujący: proces katalityczny czy uwalnianie produktu.<sup>645</sup> W kinetyce pojedynczego obrotu wyznaczone stałe szybkości nie zależą od szybkości uwalniania produktu a  $V_{max}$  zależy jedynie od efektywności procesu katalitycznego. Zachowanie warunku  $[E] \gg [S]$  zapewnia stałe stężenie enzymu przez co można zapisać  $[E] \equiv [E_T]$ , gdzie  $[E_T]$  oznacza całkowite stężenie enzymu. Można wtedy w prosty sposób wyprowadzić równanie wiążące obserwowaną stałą szybkości  $k_{obs}$  z  $[S]$ :

$$\frac{\partial}{\partial t}[S] = -k_{obs}[S] \quad [S] = [S]_0 e^{-k_{obs}t} \quad \text{Rów. 1.19}$$

W podobny sposób można uzyskać relację wiążącą zmianę stężenia produktu  $[P]$  z obserwowaną szybkością reakcji:

$$[P] = [S]_0 (1 - e^{-k_{\text{obs}}t}) \quad \text{Rów. 1.20}$$

Za pomocą regresji nieliniowej wyznacza się parametr  $k_{\text{obs}}$  z danych doświadczalnych. Stałe kinetyczne  $K'_M$  oraz  $k_{\text{max}}$  wyznacza się poprzez pomiar  $k_{\text{obs}}$  dla kilku różnych  $[E]$  przy stałym  $[S]$  wykorzystując poniższe relacje:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{max}}E_T}{K'_M + E_T} \quad \text{Rów. 1.21} \quad K'_M = \frac{k_{\text{off}} + k_{\text{max}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{Rów. 1.22}$$

$K'_M$  wyznaczona w warunkach pojedynczej ilości obrotów różni się od  $K_M$  wyznaczonej w warunkach wielokrotnej ilości obrotów ponieważ wartość  $K_M$  zależy także od stałej szybkości uwalniania produktu  $k_{\text{rel}}$ . W przypadku gdy  $k_{\text{max}} \ll k_{\text{off}}$  lub gdy etap katalityczny jest znacznie wolniejszy od szybkości dysocjacji kompleksu  $K'_M$  jest bardzo zbliżone do  $K_d$ , co można zweryfikować przez pomiary wiązania niehydrolizowalnego analogu substratu.<sup>645, 646</sup>

Stała szybkości etapu katalitycznego jest zależna od wszystkich procesów zachodzących po związaniu substratu a przed utworzeniem produktu, wliczając w to zarówno etap katalityczny jak i zmiany konformacyjne enzymu. Pomimo swojej użyteczności w pomiarach bezpośredniej szybkości etapu katalitycznego metody pojedynczego obiegu nie pozwalają na stwierdzenie czy jest on etapem limitującym w kontekście biologicznym (wiele obrotów enzymu). Szybkość etapu uwalniania produktu może być oznaczona na trzy sposoby. i) Jeżeli  $k_{\text{cat}}$  wyznaczona w warunkach wielu obrotów jest taka sama jak  $k_{\text{max}}$  mierzona w warunkach pojedynczego obrotu to uwalnianie produktu nie jest czynnikiem limitującym. ii) Także gdy  $K_M$  mierzona w warunkach wielu obrotów jest tożsama z  $K_d$  dla odpornego na hydrolizę analogu substratu to uwalnianie produktu nie jest czynnikiem limitującym iii) Szybkość uwalniania produktu może być mierzona bezpośrednio i gdy  $k_{\text{rel}} > k_{\text{max}}$  to uwalnianie produktu nie jest etapem limitującym.

### 1.7.6.2. Wykorzystanie w badaniach inhibicji

Podobnie jak w przypadku klasycznej kinetyki M-M dane kinetyczne uzyskane w eksperymentach pojedynczego obrotu mogą zostać wykorzystane do badania mechanizmu inhibicji oraz wyznaczenia podstawowych parametrów kinetycznych ją opisujących. Ogólny mechanizm inhibicji w przybliżeniu M-M jest przedstawiony na **Rys. 1.24**. Zakładając, że inhibitor  $I$ , może się wiązać szybko i odwracalnie zarówno do wolnego enzymu  $E$  jak i kompleksu  $ES$  oraz dodatkowo, że kompleks  $EIS$  nie jest aktywny katalitycznie to można zapisać.

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$[E_{\text{tot}}] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$[S_{\text{tot}}] = [S] + [ES] + [ESI]$$

Następnie odpowiednio zastępuje się  $[EI]$  oraz  $[ESI]$  by otrzymać następujące wyrażenia na  $[E_{\text{tot}}]$  oraz  $[S_{\text{tot}}]$ , gdzie  $\lambda = (1 + [I]/K_I)$  oraz  $\lambda' = (1 + [I]/K_I')$ :

$$[E_{\text{tot}}] = [E]\lambda + [ES]\lambda' \quad (1)$$

$$[S_{\text{tot}}] = [S] + [ES]\lambda' \quad (2)$$

Wprowadzenie (1) oraz (2) do wyrażenia na  $[ES]$  wyprowadzonego na podstawie modelu M-M prowadzi do następującego równania:

$$[ES] = \frac{([E_{tot}] - [ES]\lambda')([S_{tot}] - [ES]\lambda')}{\lambda K_M}$$

gdzie  $\lambda K_M$  jest tożsama z  $K_M^{app}$ . Rozwiązanie tego równania dla [ES] prowadzi do równania kwadratowego:

$$[ES]^2 \lambda'^2 - [ES]([E_{tot}]\lambda' + [S_{tot}]\lambda' + K_M \lambda) + [E_{tot}][S_{tot}] = 0 \quad (3)$$

które można przekształcić do następującej postaci:

$$[ES]^2 \lambda'^2 - [ES] K_M^{app} \left( \frac{[E_{tot}]\lambda'}{K_M^{app}} + \frac{[S_{tot}]\lambda'}{K_M^{app}} + 1 \right) + [E_{tot}][S_{tot}] = 0$$

W warunkach granicznych, gdy enzym nie jest wysycony substratem można założyć, że i) obserwowana stała Michaelisa jest znacznie większa niż całkowite stężenie enzymu,  $[E_{tot}] \ll K_M^{app}$  ii) większość substratu nie jest związana,  $[S_{tot}] \ll K_M^{app}$ . Prowadzi to do sytuacji gdzie [ES] jest bardzo małe, przez co człony  $[E_{tot}]\lambda'/K_M^{app}$ ,  $[S_{tot}]\lambda'/K_M^{app}$  oraz  $[ES]^2 \lambda'^2$  zmierzają do zera i mogą zostać zaniedbane w powyższym równaniu. Po ich usunięciu i uporządkowaniu otrzymuje się następujące równanie:

$$[ES] = \frac{[E_{tot}][S_{tot}]}{K_M^{app}}$$

Wykorzystanie tego wyrażenia na [ES] w równaniu kinetycznym pierwszego stopnia daje:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{-\partial[S]_{tot}}{\partial t} = k_2 [ES] = k_2 \frac{[E_{tot}][S_{tot}]}{K_M^{app}}$$

Całkowanie  $[S_{tot}]$  względem czasu prowadzi do:

$$frac\ m7GDP(t) = 1 - e^{\left(\frac{-k_2[E_{tot}]}{K_M^{app}t}\right)}$$

oraz:

$$k_{obs} = \frac{[E_{tot}]k_2}{K_M^{app}} = \frac{[E_{tot}]k_2}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

wyznaczenie stosunku  $k_{obs}$  do  $k_{obs}([I]=0)$  prowadzi do:

$$\frac{k_{obs}}{k_{obs}([I]=0)} = \frac{1}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{Rów. 1.23}$$

Równanie krzywej wykreślonej w układzie współrzędnych:  $k_{obs} / k_{obs}([I]=0)$  względem  $[I]$  w warunkach gdy  $[E_{tot}] \ll K_M^{app}$  pozwala na numerycznie wyznaczenie wartości  $K_I$ .

## 1.7.8. Spektroskopia NMR

### 1.7.8.1. Wprowadzenie teoretyczne

Spektroskopia NMR to technika badawcza wykorzystująca właściwości magnetyczne określonych typów jąder atomowych. Jądrowy rezonans magnetyczny (NMR) to zjawisko fizyczne polegające na absorpcji i reemisji promieniowania elektromagnetycznego przez jądro atomowe. Częstotliwość absorpcji jest zależna od częstości rezonansowej danego jądra i mieści się w zakresie fal radiowych (60-1000 MHz). Zjawisko NMR pozwala na badania kwantowych właściwości jądra atomowego a zdobyte w ten sposób informacje mogą być pomocne w poznaniu struktury oraz właściwości dynamicznych cząsteczek, fizyce jądra atomowego oraz obrazowaniu medycznym.<sup>647</sup>

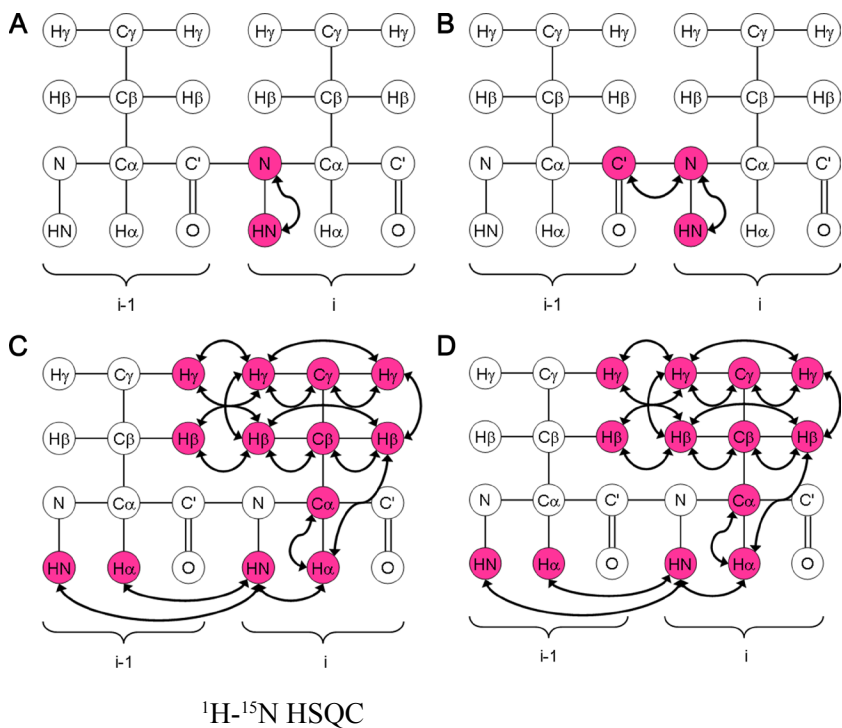
Obecnie większość eksperymentów NMR prowadzi się za pomocą techniki impulsowej. Zamiast przemiatania próbki promieniowaniem o różnej częstotliwości stosuje się krótki impuls promieniowania wzbudzający próbkę. Po

zbudzeniu próbka przechodzi do stanu podstawowego a rejestrowany wtedy sygnał FID (ang. *free induction decay*) poddawany jest obróbce przy wykorzystaniu szybkiej transformacji Fouriera co pozwala na uzyskanie widma NMR w domenie częstotliwości. Opisana procedura dotyczy jedynie prostych technik jednoimpulsowych. W badaniach biocząsteczek wykorzystywane są znacznie bardziej złożone eksperymenty w których próbka poddawana jest szeregowi rozdzielonych w czasie impulsów promieniowania. Obserwacja ewolucji stanu kwantowego układu w czasie dostarcza informacji umożliwiających m.in. na poznanie struktury, dynamiki konformacyjnej czy też właściwości termodynamicznych badanego układu.<sup>647, 648</sup>

Dokładny opis teoretyczny zjawiska NMR oraz jego wykorzystania w badaniach strukturalnych jest złożony. Poza najprostszymi przypadkami (proste techniki jednoimpulsowe) przybliżenie klasyczne nie zdaje egzaminu i dla zrozumienia procesów zachodzących w badanej próbce konieczne jest wykorzystanie formalizmu macierzowej mechaniki kwantowej. Dokładny opis można znaleźć w szeregu podręczników.<sup>649, 650</sup>

### 1.7.8.2. Wykorzystanie NMR w badaniach strukturalnych

W chwili obecnej istnieje co najmniej kilkaset różnych wieloimpulsowych eksperymentów NMR, z których niektóre mają bardzo specjalistyczne zastosowania (np. wyznaczanie współczynników dyfuzji lub entropii konformacyjnej). Tym niemniej w standardowych badaniach strukturalnych (interakcje białko-ligand, ustalanie struktury małych białek i badanie ich dynamiki konformacyjnej) stosuje się szereg podstawowych technik (**Rys. 1.57**). Poniżej zostaną krótko zarysowane wybrane eksperymenty NMR typowo stosowane w badaniach białek.



**Rys. 1.58.** Schematy obrazujące transfer magnetyzacji dla eksperymentów NMR opisywanych w tekście. Sąsiadujące reszty aminokwasowe (*i* oraz *i-1*) zostały przedstawione w uproszczony sposób, zaznaczono jądra atomowe ważne z punktu widzenia spektroskopii NMR. Eksperymenty: (A) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC, (B) HNCQ, (C) <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC, (D) <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC. Zaczerpnięte i zmodyfikowane z [www.protein-nmr.org.uk](http://www.protein-nmr.org.uk).

Jest to najprostsza technika dwuwymiarowa, wymagająca znakowanie jedynie z użyciem azotu <sup>15</sup>N. Magnetyzacja jest przenoszona z protonu na jądro azotu poprzez stałą sprzężenia  $J_{1H-15N}$ , zachodzi ewolucja przesunięcia chemicznego na jądrze azotu i następnie magnetyzacja jest przenoszona ponownie na proton, gdzie ma miejsce detekcja sygnału (**Rys. 1.58**).<sup>651</sup> Na widmie widoczne są wszystkie korelacje H-N, poza grupami amidowymi w łańcuchu polipeptydowym często widoczne są grupy aminowe w łańcuchach bocznych aminokwasów. Uzyskane z takiego eksperymentu informacje pozwalają ocenić czy białko nadaje się do dalszych badań strukturalnych z użyciem NMR oraz to jakie schematy znakowania należy zastosować. Ponadto ta technika znajduje szerokie zastosowania do badań oddziaływań białko-ligand.



## HNCO

Jest to bardziej złożona technika, wymaga znakowania  $^{13}\text{C}$  oraz  $^{15}\text{N}$ . Magnetyzacja jest przenoszona z protonu na azot amidowy a następnie na karbonylowy atom węgla przez stałą  $J_{^{15}\text{NH}-^{13}\text{CO}}$  (**Rys. 1.58**). Następnie magnetyzacja przechodzi przez  $^{15}\text{N}$  do  $^1\text{H}$ , gdzie sygnał jest rejestrowany. Ponieważ ewolucja przesunięcia chemicznego zachodzi na wszystkich trzech jądrach to uzyskane widmo jest trójwymiarowe. Technika ta cechuje się dużą czułością i jest pomocna w przyporządkowaniu reszt aminokwasowych.<sup>652</sup>

## $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC

Techniki wykorzystujące NOE są istotne w rozwiązywaniu struktur białek ponieważ dostarczają informacji o odległościach przestrzennych pomiędzy jądrami w cząsteczce. W opisywanej technice magnetyzacja jest wymieniana pomiędzy wszystkimi protonami poprzez NOE. Następnie zachodzi transfer magnetyzacji do pobliskich jąder  $^{15}\text{N}$  oraz z powrotem do  $^1\text{H}$  w celu detekcji. Uzyskane z widma informacje dostarczają więzów przestrzennych dla obliczenia struktury.<sup>653</sup>

## $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC

Jest to technika analogiczna do  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC jednakże angażująca jądra  $^{13}\text{C}$ . Dostarcza ona więzów strukturalnych do obliczania struktury oraz bywa pomocna w przypisaniu sygnałów do aromatycznych reszt aminokwasów.<sup>653</sup>

### 1.7.8.3. Badanie oddziaływań białko-ligand za pomocą NMR

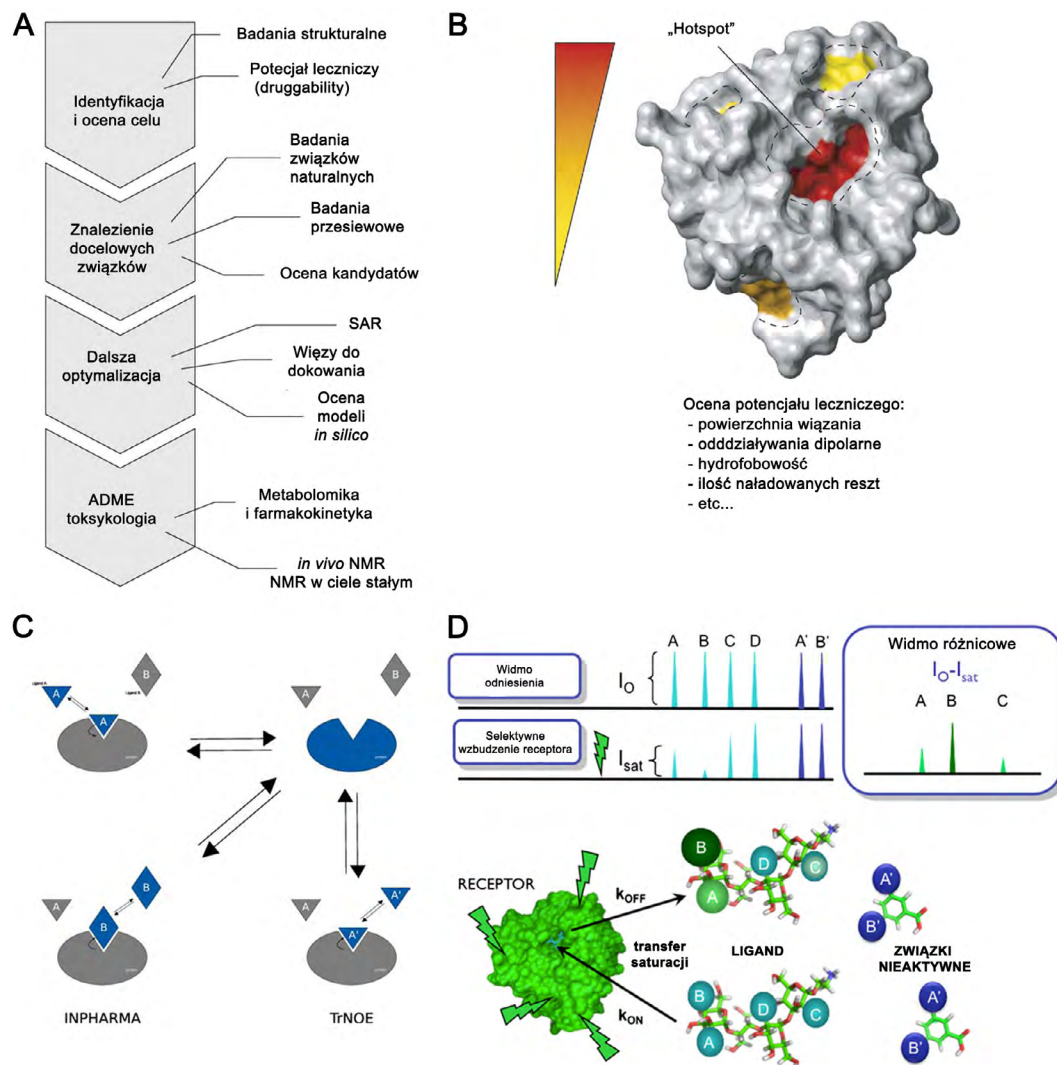
#### 1.7.8.3.1. Zastosowania

Wyznaczanie powinowactwa ligandów do białek i kwasów nukleinowych stanowi jedno z istotnych zastosowań spektroskopii NMR w biochemii. Eksperymenty te są relatywnie proste i szybkie w porównaniu do innych technik NMR (takich jak wyznaczanie struktury przestrzennej makrocząsteczek) dzięki czemu są coraz powszechniej stosowane w wysokoprzepustowych poszukiwaniach nowych związków aktywnych biologicznie (**Rys. 1.59**). Jednym z zastosowań NMR jest poszukiwanie miejsc wiązania ligandu na powierzchni białka (ang. *druggability*), co może zostać osiągnięte przy użyciu prostych technik 2D takich jak  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Szersze znaczenie spektroskopia NMR znalazła w metodach pomiaru wiązania ligandów, które nie wymagają analizy strukturalnej a jedynie analizy wybranych parametrów fizykochemicznych takich jak przesunięcie chemiczne czy szybkość relaksacji.<sup>654, 655</sup>

#### 1.7.8.3.2. Wybrane metody

W ogólności metody badania interakcji białko-ligand mogą zostać podzielone na zależne od białka lub ligandu. Metody zależne od białka polegają na pomiarze NMR białka i wykorzystaniu tych informacji do wyznaczenia powinowactwa liganda. Jedną z podstawowych technik jest spektroskopia korelacyjna  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Eksperyment tego rodzaju jest stosunkowo szybki i wymaga prostego znakowania izotopowego. Pomiar przesunięcia wybranych reszt aminokwasowych w funkcji stężenia ligandu umożliwia wyznaczenie mikroskopowych stałych dysocjacji tych reszt aminokwasowych do liganda. Dodatkowym plusem jest to, że HSQC pozwala na zmapowanie, które fragmenty powierzchni białka oddziałują z ligandem co może być pomocne w zrozumieniu mechanizmu wiązania. Dużym minusem technik opartych na białku jest konieczność kosztownego znakowania izotopowego białka, oraz długi czas pomiarów.<sup>656 657</sup>

Obecnie wzrasta zainteresowanie metodami opartymi na pomiarach ligandów. Ich niewątpliwymi zaletami jest mniejsze zapotrzebowanie na białko, które nie wymaga znakowania izotopowego co obniża koszty procedury czyniąc ją bardziej przydatną w badaniach przesiewowych. Minusem jest brak informacji o zachowaniu białka



**Rys. 1.59.** Wykorzystanie spektroskopii NMR w badaniach wiązania białko-ligand. **(A)** Schemat obrazujący wkład NMR do poszukiwania związków aktywnych biologicznie. **(B)** W celu przewidzenia potencjału leczniczego prowadzi się poszukiwania oczekiwanych miejsc wiązania ligandu na powierzchni białka. Parametry opisujące miejsce wiążące takie jak hydrofobowość, kształt i rozkład ładunku są obliczane i wprowadzane do równania empirycznego i poddawane analizie statystycznej w celu wybrania najbardziej obiecujących celów. **(C)** Schemat działania metod Tr-NOE oraz INPHARMA. Magnetyzacja jest przenoszona z liganda **A** poprzez białko albo z powrotem do ligandu (Tr-NOE) albo do konkurencyjnego liganda **B** (INPHARMA). W obydwu przypadkach sygnały z widma NMR są stosowane do ustalenia konformacji związanego liganda (Tr-NOE) albo wyznaczenia względnej orientacji ligandów **A** i **B** (INPHARMA). **(D)** Schemat eksperymentu  $^1\text{H}$  STD zastosowanego względem próbki zawierającej receptor białkowy oraz testowane ligandy w nadmiarze molowym. Rejestrowane są dwa widma NMR – widmo odniesienia bez selektywnego wzbudzenia białka oraz widmo z selektywnym wzbudzeniem grup metylowych w cząsteczce białka. Magnetyzacja protonów białka zostaje częściowo przeniesiona na protony liganda poprzez międzycząsteczkowy NOE (gdy odległości proton-proton są mniejsze niż 6 Å). Oznacza to, że zjawisko NOE zachodzi jedynie dla związków przejściowo wiążących się z receptorem. Widmo różnicowe pokazuje jedynie sygnały liganda wiążącego się z białkiem. Zaadaptowane i zmienione na podstawie *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10, 219-225; *European Biophysical Journal*, 2011, 40, 1357-1369 oraz *Frontiers in Bioscience*, 2009, 14, 4565-4574.

po związaniu liganda co w pewien sposób ogranicza zastosowanie tych metod w badaniach strukturalnych i biofizycznych. Do powszechnie stosowanych metod zależnych od ligandu należą techniki relaksacyjne oparte na zmianie szybkości relaksacji poprzecznej ( $R_1$ ) oraz podłużnej ( $R_2$ ) w zależności od tego czy ligand jest związany z białkiem czy jest w stanie wolnym. Pomiar zmiany wartości  $R_1$  lub  $R_2$  w funkcji stężenia ligandu pozwala na wyznaczenie stałej dysocjacji liganda.<sup>658</sup> Metody dyfuzyjne opierają się na pomiarze współczynnika dyfuzji translacyjnej  $D_t$ , na którego podstawie można wyznaczyć stałą wiązania ligandu przy założeniu że współczynniki dyfuzji białka oraz kompleksu białko-ligand są takie same.<sup>656, 659</sup>

$$D_{\text{obs}} = x_{\text{free}}D_{\text{free}} + x_{\text{bound}}D_{\text{bound}} \quad \text{Rów. 1.24; gdzie } x_i \text{ są ułamekami molowymi}$$

Inna grupa metod polega na wykorzystaniu transferu magnetyzacji pomiędzy cząsteczkami liganda oraz białka. Z uwagi na możliwość stosowania w badaniach dużych kompleksów oraz małe zapotrzebowanie na białko techniki te znalazły największe zastosowanie w badaniach wiązania ligandów pośród metod NMR. Jedną z wcześniejszych technik, Tr-NOE wykorzystuje efekt NOE zachodzący pomiędzy wolnym a ligandem związanym z białkiem.<sup>660</sup> Odmienne warianty tej techniki opierają się na wykorzystaniu dodatkowego liganda konkurującego o dostęp do białka (**Rys. 1.58C**).<sup>656</sup> Metoda transferu różnicy saturacji (ang. STD, *saturation transfer difference*), zobrażona na **Rys. 1.58D**, w podobny sposób umożliwia wyznaczenie powinowactwa ligandu. W dużym przybliżeniu opiera się ona na transferze magnetyzacji pomiędzy wzbudzonym białkiem a ligandem.<sup>661</sup> Pomiar międzycząsteczkowego efektu NOE dla różnych stężeń ligandu pozwala na obliczenie stałej  $K_d$ . W pierwotnej wersji metody bezpośrednie wyznaczanie stałych z użyciem izoterm wiązania opartych na sygnale STD było utrudnione z uwagi na zależność mierzonego sygnału od właściwości badanej próbki. W ostatnich latach opracowano jednak technikę pozwalającą na ominięcie tych problemów co znacząco uprościło wyznaczanie stałych wiązania.<sup>662, 663</sup> Do tej pory opracowano bardzo wiele wariantów STD i obecnie jedynym ograniczeniem STD jest brak czułości względem związków o bardzo dużym powinowactwie ( $K_d > 10 \text{ mM}$ ).<sup>656</sup> Metodą, która może być skutecznie zastosowana w takich przypadkach jest WaterLOGSY. Opiera się ona na transferze magnetyzacji z białka na ligand za pośrednictwem cząsteczek wody w sferze solwatacyjnej białka. Co więcej niektóre warianty tej metody (technika SALMON) umożliwiają także mapowanie miejsca wiązania liganda w białku.<sup>664</sup>

## 1.7.9. Spektroskopia dichroizmu kołowego

### 1.7.9.1. Opis metody

Technika opiera się na zjawisku dichroizmu kołowego (CD) polegającego na różnej absorpcji prawo- i lewoskrętnej składowej w wiązce kołowo spolaryzowanego światła. Cząsteczki posiadające atomy stereogeniczne wykazują efekt CD przez co możliwe jest wykorzystanie tej techniki do badania ich struktury oraz dynamiki. Teoretyczny opis zjawiska CD jest dość skomplikowany ponieważ uwzględnia zarówno elektronowy jak i magnetyczny moment przejścia, czego efektem jest wzbudzenie elektronu w sposób helikalny co w przypadku związków chiralnych prowadzi do obserwowalnego dichroizmu.<sup>648</sup>

### 1.7.9.2. Wykorzystanie w badaniach zmian konformacyjnych białek

Spektroskopia CD znajduje przede wszystkim szerokie zastosowanie do badań nad strukturą drugorzędową białek (zakres 200-230 nm). Obok spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramana jest główną techniką eksperymentalną wyznaczania udziału poszczególnych struktur drugorzędowych w cząsteczkach białek. W przypadku kwasów nukleinowych pomiary CD także pozwalają na poznanie typu helisy oraz badanie struktury kwadrupleksów DNA. Natomiast spektroskopia CD w zakresie dalszego ultrafioletu (250-300 nm) jest stosowana do badania dynamiki konformacyjnej cząsteczek w szczególności wiązania się ligandów, fałdowania białek oraz charakterystyki spektralnej grup prostetycznych takich jak kompleksy metali z hemem.<sup>648, 665</sup> Ponadto, efekt CD przy dłuższych falach (światło widzialne, podczerwień) także znajduje coraz szersze znaczenie w badaniach kompleksów metali przejściowych oraz fałdowania się białek.<sup>666</sup>

## 1.7.10. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

### 1.7.10.1. Opis teoretyczny

Metoda DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*) opiera się na zjawisku rozpraszania Rayleigha przez roztwór makrocząsteczek mniejszych niż długość fali padającego światła. Źródłem monochromatycznej wiązki

promieniowania jest laser, najczęściej wykorzystywana długość fali to 650 nm. Z uwagi na ruchy termiczne cząsteczek w roztworze intensywność rozpraszania jest zmienna w czasie – rozpraszane światło ulega interferencji konstruktywnej lub destruktywnej z otaczającymi cząsteczkami. Informacja o dynamicznym zachowaniu badanych cząsteczek jest wyznaczana z pomiaru autokorelacji intensywności sygnału. Krzywa korelacji drugiego rzędu jest wyznaczana na podstawie poniższego wzoru:

$$g^2(q; \tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{Rów. 1.25}$$

gdzie  $g^2(q; \tau)$  to funkcja autokorelacji danego wektora falowego  $q$  i czasu opóźnienia  $\tau$  natomiast  $I$  stanowi intensywność.<sup>648</sup>

Do uzyskania informacji na temat cząsteczek w roztworze opisana krzywa może zostać poddana różnym procedurom matematycznym. W najprostszym przypadku funkcja autokorelacji traktowana jest jako funkcja monowkładnicza co pozwala w prosty sposób wyznaczyć współczynnik dyfuzji translacyjnej  $D_t$  a na jego podstawie promień hydrodynamiczny  $R_h$ . Wielkość ta znajduje przełożenie na rozmiar cząsteczki (przy założeniu, że jest globularna) oraz pozwala w pośredni sposób oszacować jej masę molową.<sup>648</sup> Próbkę polidispersyjną są znacznie trudniejsze w analizie, często stosowane metody to metoda kumulant oraz analiza regularyzacji jednak ich opis teoretyczny wykracza poza ramy pracy.<sup>667</sup>

#### 1.7.10.2. Zastosowania w badaniach białek

DLS jest jedną z podstawowych technik oceny jakości preparatów białkowych. Z uwagi na swoją czułość pozwala na łatwą detekcję agregacji białka.<sup>668</sup> Z podobnych powodów znajduje zastosowanie w badaniach oligomeryzacji białek a także dużych zmian konformacyjnych związanych z wiązaniem liganda<sup>669</sup> lub fałdowaniem/denaturacją białka.<sup>670</sup>

# BADANIA WŁASNE

## 2.1. Założenia projektu doktoranckiego

Głównym celem projektu doktorskiego była synteza chemiczna oraz zbadanie właściwości biologicznych serii analogów 5' mRNA kapu jako narzędzi do badań biologicznych nad enzymami hydrolizującymi kap, takimi jak kompleks Dcp1/2 oraz białko DcpS, w szczególności ich rolę w degradacji mRNA. Regulacja metabolizmu mRNA odgrywa istotne znaczenie dla funkcjonowania komórki, dlatego też lepsze zrozumienie tego procesu jest bardzo istotne. Enzymy degradujące kap odgrywają ważną rolę w regulacji obiegu mRNA, jednakże ich dokładny mechanizm działania nie został jeszcze wyjaśniony. Ponadto coraz więcej doniesień wskazuje na ich potencjalną rolę w etiologii szeregu chorób układu nerwowego.

Z punktu widzenia pracy najbardziej istotne było ustalenie czy otrzymane analogi kapu wykazują działanie inhibitorowe względem enzymów hydrolizujących kap. Odkrycie, że domena regulatorowa Dcp2 wiąże m<sup>7</sup>GDP (produkt reakcji dekapingu) zasugerowało, że syntetyczne analogi kapu mogą być wiązane przez to białko oraz być jego potencjalnymi inhibitorami. Odporne na degradację inhibitory enzymów hydrolizujących kap mogą być niezwykle cennymi narzędziami zarówno w badaniach strukturalnych jak i funkcjonalnych nad tymi enzymami. Ponieważ wcześniejsze badania nad analogami kapu uwidocznily znaczenie łańcucha fosforanowego w wiązaniu przez czynniki białkowe oraz odporności na degradację to uznano, że wprowadzanie zmian chemicznych w tym fragmencie cząsteczki będzie najbardziej efektywną drogą do uzyskania założonego celu.<sup>488, 570</sup> Ponadto otrzymane w tym celu analogi kapu mogą znaleźć inne zastosowania takie jak otrzymywanie kapowanego mRNA o większej wydajności translacji i stabilności lub inhibicja zależnej od kapu translacji.

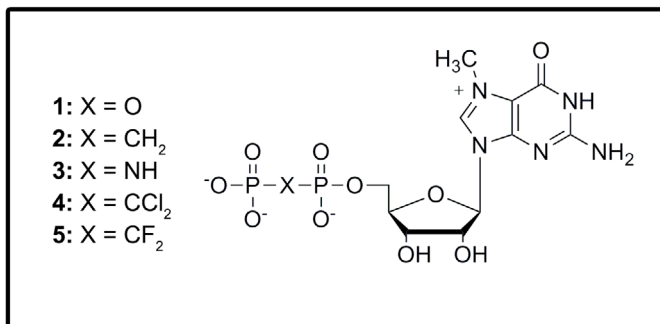
W pracy podjęto się także syntezy dinukleotydowych analogów znakowanych fluorescencyjnie. Wcześniej nikt nie otrzymał tak modyfikowanych analogów kapu. Związki takie mogą być wbudowane do mRNA co pozwala na selektywne znakowanie fluorescencyjne końca 5' mRNA. Takie transkrypty mogą znaleźć zastosowania do badania białek zaangażowanych w degradację mRNA oraz inicjację translacji. Ponadto fluorescencyjne analogi kapu, jako wolne cząsteczki, także mogą znaleźć zastosowania do badań biofizycznych nad białkami wiążącymi się z kapem.

Dodatkowymi celami pracy, wynikającymi wspomnianych wyżej założeń, są poszerzenie zakresu dostępnych metod syntezy nukleotydów zawierających modyfikacje w łańcuchu fosforanowym oraz dalsze badania nad zastosowaniami modyfikowanych analogów kapu w badaniach biologicznych. Jednym z przykładów może być opisane w pracy wykorzystanie niehydrolizowalnych analogów kapu w celu lepszego poznania mechanizmów degradacji histonowego mRNA.

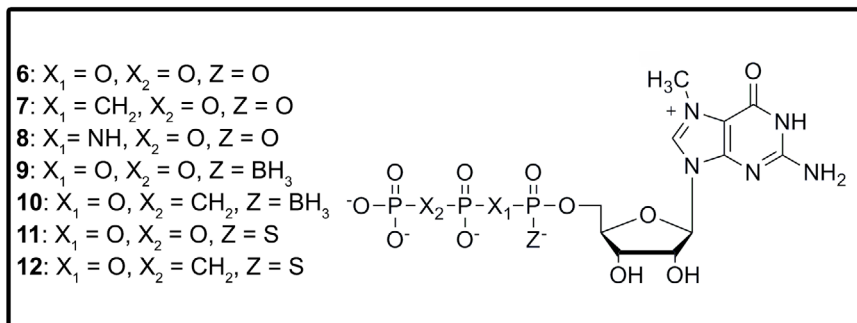
## 2. 2. Synteza chemiczna

### 2.2.1. Cele syntetyczne

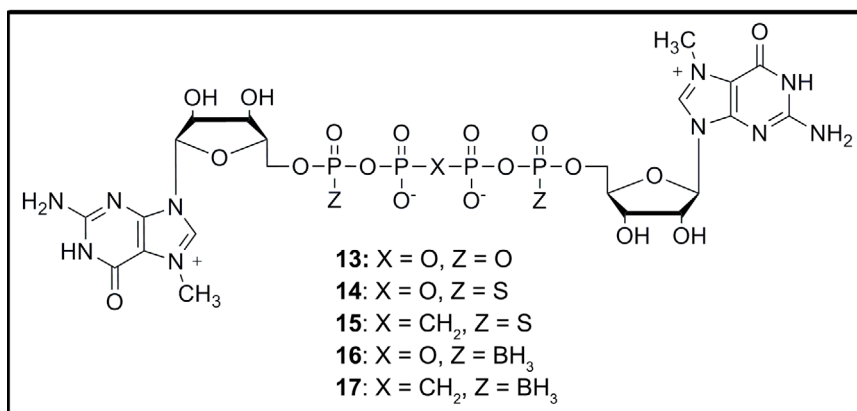
W celu lepszego zrozumienia funkcjonowania enzymów usuwających strukturę kapu podjęto się syntezy szeregu modyfikowanych analogów kapu, mających być narzędziami do badań biochemicznych oraz biofizycznych nad tymi białkami (**Rys. 2.1-2.4**). Otrzymane związki posiadają szereg modyfikacji chemicznych (głównie w łańcuchu fosforanowym) mających na celu zmianę ich właściwości względem enzymów dekapujących oraz innych białek oddziałujących ze strukturą kapu. Dodatkowo niektóre z otrzymanych związków posiadają przyłączony znacznik fluorescencyjny pozwalając na efektywne wykorzystanie metod fluorescencyjnych do badań wiązania kapu przez różne czynniki białkowe. Poniżej przedstawiono cele syntetyczne, których otrzymania podjęto się w badaniach w ramach projektu doktorskiego. Dokładny opis syntezy poszczególnych klas związków zawarty jest w dalszych rozdziałach rozprawy.



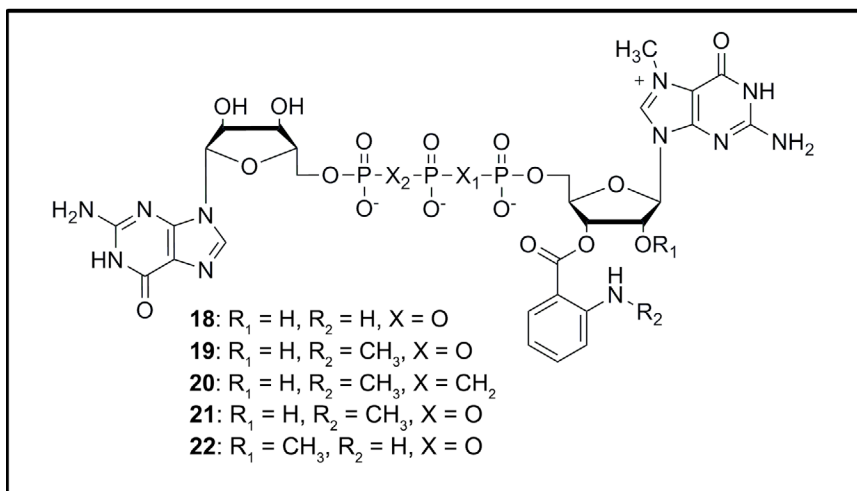
**Rys 2.1.** Difosforany m<sup>7</sup>Guo modyfikowane w łańcuchu fosforanowym. Za wyjątkiem m<sup>7</sup>GDP (1) związki te posiadają modyfikacje chemiczną w łańcuchu fosforanowym w pozycji α/β zastępującą mostkowy atom tlenu.



**Rys 2.2.** Trifosforany m<sup>7</sup>Guo modyfikowane w łańcuchu fosforanowym. Za wyjątkiem m<sup>7</sup>GTP nukleotydy te mogą posiadać modyfikacje chemiczne w łańcuchu fosforanowym zarówno w pozycji α/β i β/γ (pozycje mostkowe) oraz/lub w pozycji α (pozycja niemostrkowa). Obecność ostatniej modyfikacji prowadzi do zjawiska *P*-diastereomerii, dlatego też związki 9-12 występują jako para diastereoizomerów.



**Rys 2.3.** Dinukleotydowe tetrafosforany m<sup>7</sup>Guo modyfikowane w łańcuchu fosforanowym. Nukleotydy te mogą posiadać modyfikacje chemiczne w łańcuchu fosforanowym zarówno w pozycji β/γ (pozycje mostkowe) oraz/lub w pozycjach α i δ (jednocześnie w dwóch pozycjach mostkowych). Obecność ostatniej modyfikacji prowadzi do zjawiska *P*-diastereomerii, dlatego też związki 14-17 występują jako mieszanina diastereoizomerów. Z uwagi na symetrię cząsteczki typu C<sub>2</sub> ilość izomerów jest zredukowana do trzech.



**Rys 2.4.** Znakowane fluorescencyjnie analogi kapu. Związki te posiadają grupę antranoilową (Ant) lub mantranoilową (Mant) dołączoną do pierścienia rybozy przy m<sup>7</sup>G. Niektóre z tych nukleotydów posiadają także wprowadzoną do mostka fosforanowego grupę metylenową w pozycji α/β lub β/γ co zapewnia selektywną odporność na hydrolizę przez enzymy degradujące strukturę kapu.

## 2.2.2. Strategia syntezy analogów kapu

### 2.2.2.1. Ogólne uwagi o syntezie analogów kapu

Z uwagi na wrażliwość chemiczną 7-metyloguanozyny stosowane metody syntetyczne muszą być relatywnie łagodne i nie wymagać stosowania agresywnych reagentów. Większość reakcji stosowanych w syntezach analogów kapu takich jak fosforylacja i jej odpowiedniki, aktywacja nukleotydów, wprowadzanie i usuwanie grup zabezpieczających oraz selektywna metylacja zostały przedstawione w części literaturowej. Nowe metody syntetyczne rozwinięte w niniejszej pracy zostaną opisane w odpowiednich rozdziałach dotyczących syntezy danych związków.

### 2.2.2.2. Wydłużanie łańcucha fosforanowego w mononukleotydach

Proces elongacji już istniejącego łańcucha fosforanowego osiąga się przez reakcję grupy fosforanowej (*P*-nukleofil) z aktywowaną grupą fosforanową drugiego związku (*P*-elektrofil). Jeden związek z pary jest nukleotydem, a drugi jest pochodną nieorganicznego fosforanu (orto- lub pirofosforanu). Opisane wcześniej syntezy analogów kapu zwykle polegały na aktywacji nukleotydu i jego sprzęganiu z nieorganicznym fosforanem. Jednakże w prezentowanej pracy większość trifosforanów nukleozydów uzyskano przez sprzęganie di- lub monofosforanów nukleozydów z aktywowanymi fosforanami nieorganicznymi. Dokładna metodologia syntez zostanie przedstawiona w następnych rozdziałach.

### 2.2.2.3. Synteza dinukleotydów zawierających mostek 5', 5' oligofosforanowy

Dokładniejsze informacje na temat syntezy dinukleotydów przedstawiono w *Części literaturowej*. Z punktu widzenia syntezy analogów m<sup>7</sup>GpppG kluczowe znaczenie ma sprzęganie ze sobą dwóch jednostek fosforanowych. Jedna z nich posiada dołączoną grupę aktywującą (w pracy wykorzystano wyłącznie pochodne imidazolowe) i zachowuje się jak *P*-elektrofil podczas gdy druga jest *P*-nukleofilem i dokonuje ataku na aktywowaną grupę fosforanową w wyniku której formuje się nowe wiązanie pirofosforanowe. Synteza innych analogów kapu odbywa się zwykle w taki sam sposób. Jednakże tetrafosforanowe analogi kapu prezentowane w rozprawie (związki **13-17**) otrzymano w nietypowy sposób wykorzystując aktywne pochodne nieorganicznych difosforanów, co zostanie opisane później.

### 2.2.2.4. Wprowadzanie modyfikacji chemicznych do struktury kapu

Z funkcjonalnego punktu widzenia można wyróżnić dwa typy modyfikacji wprowadzanych do struktury kapu. Pierwszy z nich zakłada zmianę właściwości chemicznych lub biologicznych modyfikowanego analogu. Przykładem może być zwiększone powinowactwo do określonego białka lub uzyskanie odporności na degradację enzymatyczną. Pomimo, że w ogólności cel ten może zostać zrealizowany na kilka sposobów (modyfikacje łańcucha fosforanowego, pierścienia cukrowego lub zasady azotowej) to w niniejszej pracy położono nacisk na zmianę właściwości biologicznych analogów kapu poprzez modyfikację w grupie 5' oligofosforanowej. Otrzymano związki posiadające następujące modyfikacje w łańcuchu: metylenobisfosfonianową, imidodifosforanową, tiofosforanową oraz boranofosforanową. Dokładne informacje, zarówno na temat właściwości fizykochemicznych i metod wprowadzania tych modyfikacji oraz ich wpływu na własności analogów kapu zostały przedstawione w *Części literaturowej*.

Drugi typ modyfikacji zakłada zapewnienie cechy umożliwiającej monitorowanie zachowania analogu kapu (lub kapowanego RNA) w określonym układzie biologicznym w warunkach *in vitro* lub *in vivo*. Dodatkowo pożądanym jest by wprowadzenie takiego znacznika zmieniło w jak najmniejszy sposób właściwości biologiczne tak zmienionego analogu kapu. Jednym z przykładowych sposobów na uzyskanie takiej sondy molekularnej jest wprowadzenie fluoroforu do struktury kapu, co będzie szerzej omówione w dalszej części niniejszej rozprawy. Natomiast podstawowe informacje na temat fluoroforów, ich wprowadzanie do nukleotydów a także zastosowaniach takich związków zostały wcześniej omówione w *Części literaturowej*.

### 2.2.2.5. Rozdział diastereoizomerów

Związki zawierające grupy tio- lub boranofosforanowe występują zwykle jako mieszanina co najmniej dwóch *P*-diastereoizomerów (wyjątkiem jest sytuacja w której cząsteczka posiada dwa identyczne podstawniki w zmodyfikowanym fosforanie). Rozdział takich mieszanin za pomocą kolumnowej chromatografii jonowymiennej jest zazwyczaj niemożliwy i konieczne jest wykorzystanie półpreparatywnego RP-HPLC do rozdziału izomerów. Jednakże nawet w takim przypadku nie zawsze możliwa jest pełna separacja diastereoizomerów na większą skalę, co jest spowodowane niedużymi różnicami w ich czasach retencji.

## 2.2.3. Opis syntez analogów kapu

### 2.2.3.1. Informacje ogólne

Modyfikowane chemicznie di- oraz trifosforany nukleozydów znajdują szerokie zastosowanie w badaniach enzymatycznych, strukturalnych oraz stanowią potencjalne leki. Mononukleotydydowe analogi kapu także znajdują zastosowania w badaniach nad białkami wiążącymi kap oraz w procesach angażujących te białka. Z tego powodu potrzebne są proste i efektywne metody wprowadzania modyfikacji w obrębie różnych fragmentów cząsteczki nukleotydydów. Niniejsza praca koncentruje się na syntezie i badaniach związków posiadających modyfikacje w obrębie łańcucha fosforanowego.

### 2.2.3.2. Difosforany nukleozydów

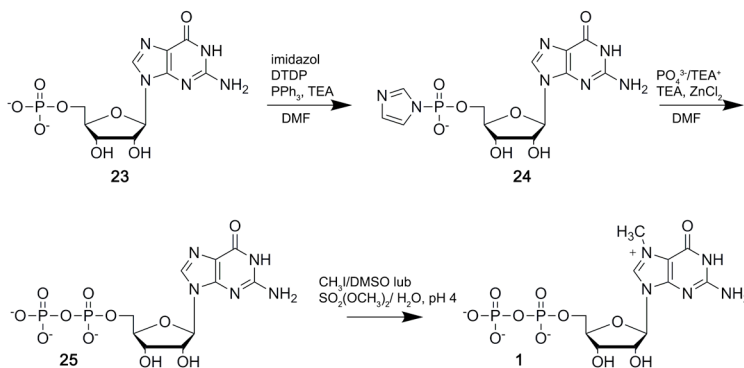
#### 2.2.3.2.1. Cel syntezy

Na potrzeby badań opisanych w pracy przeprowadzono syntezę m<sup>7</sup>GDP oraz kilku jego analogów zawierających modyfikację w łańcuchu fosforanowym (**Rys. 2.1**). Zarówno m<sup>7</sup>GDP jak i jego analogi są ligandami oddziałującymi z białkami wiążącymi kap takimi jak eIF4E oraz DcpS, przez co znajdują zastosowanie w badaniach nad wspomnianymi białkami. Ponieważ wykazano wiązanie się m<sup>7</sup>GDP z domeną regulatorową Dcp2 co oznacza, że pochodne tego związku mogą być potencjalnie wiązane przez to białko i należy je przebadać pod kątem właściwości inhibitorowych. Dodatkowo, niektóre z opisanych związków wykorzystano do badań przesiewowych mających na celu poszukiwanie inhibitorów DcpS. Poza wykorzystaniem już istniejących metod syntezy difosforanów nukleozydów podjęto się opracowania nowych metod wprowadzania zmodyfikowanego łańcucha fosforanowego do nukleozydów.

#### 2.2.3.2.2. Synteza m<sup>7</sup>GDP

Synteza m<sup>7</sup>GDP (**1**) została już wielokrotnie opisana w literaturze<sup>521, 671</sup>. Na potrzeby pracy związek ten został otrzymany w krótkiej syntezie wychodząc od GMP (**23**) (**Schemat 2.1**). Ponieważ komercyjnie dostępne sole sodowe **23** są nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych to konieczna była zamiana na sól TEA przeprowadzona na żywicy jonowymiennej. **23** przekształcono do pochodnej imidazolowej GMP-Im (**24**) a następnie poddano sprzęganiu z ortofosforanem TEA w celu uzyskania GDP (**25**, **Tab. 2.1**). Reakcja ta często prowadzi do powstawania produktu ubocznego, GpppG powstałego ze sprzęgania się ze sobą cząsteczek **25** i **24**. Związek ten jest bardzo trudny do oddzielenia od właściwego produktu i w celu ograniczenia jego powstawania sprzęganie prowadzi się w obecności TEA, co spowalnia przebieg reakcji ale poprawia selektywność. W ostatnim etapie **25** poddano selektywnej metylacji za pomocą CH<sub>3</sub>I uzyskując oczekiwany produkt.





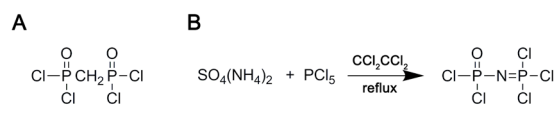
Schemat 2.1. Synteza m<sup>7</sup>GDP.

### 2.2.3.2.3. Synteza związków z modyfikacjami mostkowymi

Synteza analogów m<sup>7</sup>GDP zawierających grupę metylenobisfosfonianową lub imidodifosforanową w łańcuchu fosforanowym jest relatywnie prosta gdy zastosuje się odpowiedni reagent fosforylujący. Wówczas wprowadzenie do nukleozydu tych modyfikacji odbywa się w jednym kroku syntetycznym (Schemat 2.2 & 2.3).<sup>45, 51</sup> Jednakże z uwagi na brak komercyjnie dostępnych odczynników pozwalających na wprowadzenie modyfikowanych dihalogenobisfosfonianów (np. zawierających grupę CCl<sub>2</sub> lub CF<sub>2</sub>) w pozycję 5' nukleozydów konieczne było wypróbowanie innych strategii opisywanych w literaturze lub też podjęcie prób opracowania nowych metod syntezy. Wyniki reakcji fosforylacji przedstawiono w Tab. 2.1.

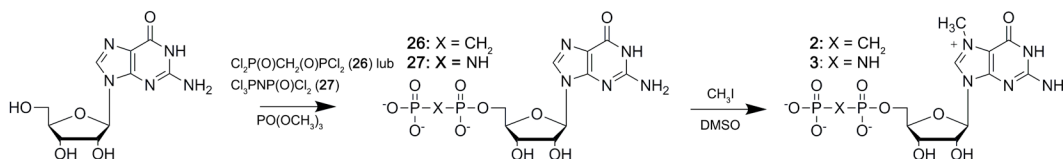
#### 2.2.3.2.3.1. Synteza przez aktywne jednostki fosforanowe

Wykorzystanie już istniejących metod syntetycznych takich jak bisfosfonylacja oraz imidodifosforylacja pozwala na syntezę difosforanów nukleozydów, modyfikowanych odpowiednio grupą metylenobisfosfonianową lub imidodifosforanową w pozycji mostkowej, w jednym kroku syntetycznym wychodząc z odpowiedniego nukleozydu.<sup>45, 51, 486</sup> Z uwagi na dużą labilność chemiczną 7-metyloguanozyny korzystniejsze jest prowadzenie wspomnianych reakcji na guanozynie i w następnym kroku syntetycznym przeprowadzenie selektywnej metylacji powstałych difosforanów. W syntezie GpCH<sub>2</sub>p (26) wykorzystano komercyjnie dostępny odczynnik, którego 4-krotny nadmiar molowy zapewnia właściwy przebieg reakcji i powstawanie jedynie minimalnych ilości produktów ubocznych takich jak GpCH<sub>2</sub>pG. Natomiast synteza GpNHp (27) wymagała otrzymania reaktywnego imidodifosforanu, trichloro-[(dichlorofosfonyl)imino]fosforanu (Schemat 2.2). Związek ten otrzymano poprzez ogrzewanie mieszaniny siarczanu (VI) amonu i pentachlorku fosforu w tetrachloroetanie. Po odsączeniu i usunięciu rozpuszczalnika uzyskano gęstą ciecz składającą się głównie z Cl<sub>3</sub>PNP(O)Cl<sub>2</sub> oraz resztek rozpuszczalnika.



Schemat 2.2. (A) Struktura tetrachlorumetylenobisfosfonianowego. (B) Synteza trichloro-[(dichlorofosfonyl)imino]fosforanu, Cl<sub>3</sub>PNP(O)Cl<sub>2</sub>.

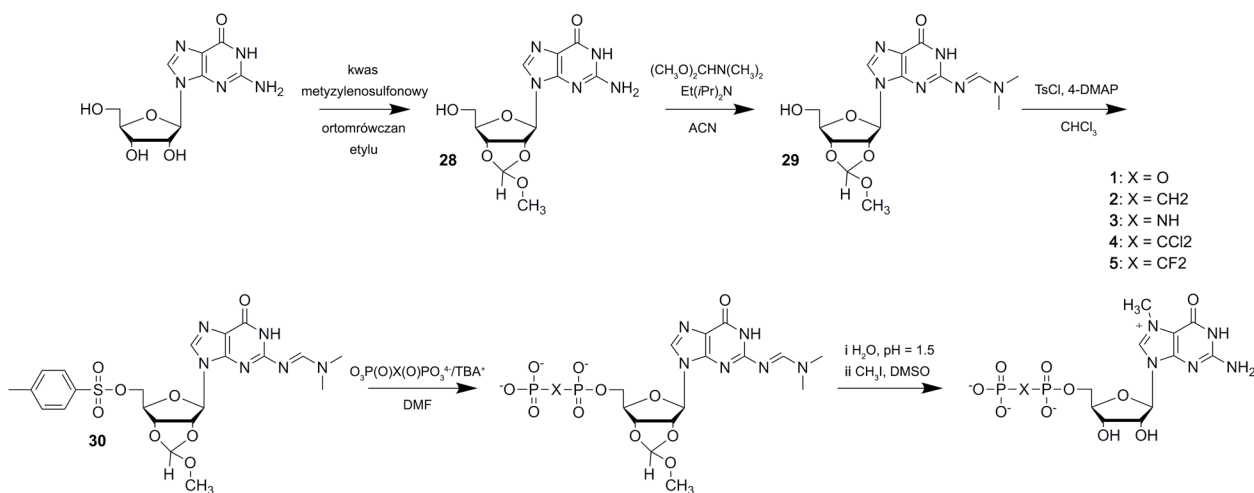
Ponieważ niemożliwe było uzyskanie czystego związku w postaci krystalicznej wykorzystano uzyskany olej i empirycznie dobrano proporcję objętość odczynnika imidodifosforylującego do ilości moli substratu nukleozydowego. Zarówno 26 jak i 27 otrzymano z dobrymi wydajnościami (odpowiednio 67% oraz 58%) a następnie poddano metylacji przy użyciu CH<sub>3</sub>I uzyskując 2 (wyd. 51%) oraz 3 (wyd. 37%) co jest przedstawione na Schemacie 2.3. Ponadto w analogiczny sposób otrzymano modyfikowane chemicznie difosforany adenozyne, będące substratami w syntezie pochodnych ATP, opisanej w rozdziale 2.2.3.2.3.1. (patrz Tab. 2.1).



Schemat 2.3. Synteza analogów m<sup>7</sup>GDP poprzez aktywne jednostki fosforanowe.

### 2.2.3.2.3.2. Synteza poprzez aktywowane nukleozydy

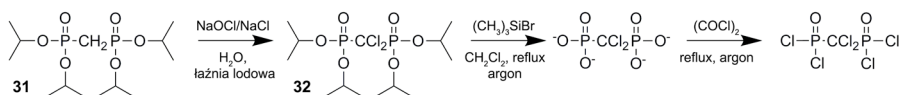
W celu uzyskania związków **4-5** postanowiono zastosować metodę syntezy poprzez aktywację grupy 5' hydroksylowej resztą tosyłową w reakcji podstawienia nukleofilowego (**Schemat 2.4**). Ponieważ zarówno grupy hydroksylowe w pierścieniu rybozy jak i grupa aminowa w zasadzie azotowej także podlegają substytucji grupą tosyłową to konieczne jest wprowadzenie odpowiednich grup zabezpieczających.<sup>50</sup> W tym celu guanozyna została przekształcona do 2'3'-metoksymetylidenoguanozyny (**28**), do której wprowadzono zabezpieczenie grupy 2-aminowej. Tak powstały związek **29** poddano tosyłowaniu. Oczyszczony 5'-tosylan guanozyny poddano reakcji z pirofosforanem lub jego analogiem. Podejście to przetestowano na syntezie GDP. Otrzymaną wcześniej sól TBA pirofosforanu rozpuszczono w bezwodnym DMF i w atmosferze argonu dodano do osuszonego tosyłanu. Mimo, że dane literaturowe wskazują, że taka metoda syntezy jest efektywna<sup>50</sup> to nie udało się uzyskać oczekiwanego produktu. Reakcja była powtarzana w kilku wariantach używając różnych rozpuszczalników (DMF lub ACN) jednak nigdy nie udało się uzyskać większej wydajności niż 5-10%. Podobne rezultaty zaobserwowano dla sprzęgania z solą TBA metylenobisfosfonianu. Prawdopodobną przyczyną niepowodzenia było niedostateczne osuszenie soli TBA, które są związkami silnie higroskopijnymi.



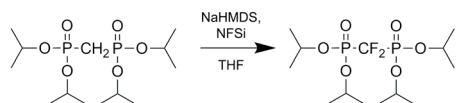
**Schemat 2.4.** Planowana synteza analogów m<sup>7</sup>GDP poprzez aktywne pochodne 5'tosylanowe.

### 2.2.3.2.3.3. Synteza aktywnych pochodnych dichloro- i difluorometylenobisfosfonianów

Ponieważ próba syntezy analogów m<sup>7</sup>GDP **4 i 5** poprzez pochodne tosyłowe zakończyła się niepowodzeniem to rozważono inną strategię syntezy w oparciu o uzyskanie chloropochodnych, modyfikowanych C-fosfonianów. Związki takie są zazwyczaj uzyskiwane z odpowiednich kwasów fosfonianowych z użyciem odpowiedniego reagenta chlorującego (PCl<sub>5</sub>, (COCl)<sub>2</sub> etc.), który po zakończeniu reakcji jest usuwany z mieszaniny reakcyjnej.<sup>41, 672</sup> Planowana synteza Cl<sub>2</sub>P(O)CCl<sub>2</sub>P(O)Cl<sub>2</sub> została przedstawiona na **Schemacie 5**. Ester izopropylowy **31** poddany został chlorowaniu w środowisku wodnym<sup>673</sup> prowadzącym do związku **32**, którego strukturę potwierdzono za pomocą widm MS oraz MS/MS. W kolejnym etapie udało się uzyskać odbezpieczony C-fosfonian, co potwierdzono za pomocą MS. W następnym etapie postanowiono przetestować zarówno PCl<sub>5</sub>, oraz chlorek oksalilu. Niestety obydwa podejścia zakończyły się niepowodzeniem. Podjęto także próby uzyskania difluorometylenobisfosfonianu ale na skutek niepowodzeń syntezy (**Schemat 6**) zaniechano dalszych prób. Ponieważ próbne syntezy związków **4 i 5** zakończyły się niepowodzeniem to zaniechano dalszych prób.



**Schemat 2.5.** Planowana synteza aktywnej pochodnej dichlorometylenobisfosfonianu, Cl<sub>2</sub>P(O)CCl<sub>2</sub>P(O)Cl<sub>2</sub>.



**Schemat 2.6.** Wprowadzanie grupy difluorometylowej do bisfosfonianu.

**Tab. 2.1.** Substraty i produkty, współczynniki absorpcji oraz wydajności fosforylacji dla difosforanów nukleozydów

Produkt (No)	$\epsilon_{\lambda,260}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Substrat (No)	Czynnik fosforylujący (No)	Wydajność preparatywna [%]
GDP (25)	12000	GMP-Im (24)	Ortofosforan (sól TEA)	65
GpCH <sub>2</sub> p (26)	12000	gwanozyna	Cl <sub>2</sub> P(O)CH <sub>2</sub> P(O)Cl <sub>2</sub>	58
GpNHp (27)	12000	gwanozyna	Cl <sub>3</sub> PNP(O)Cl <sub>2</sub>	67
GpCCl <sub>2</sub> p <sup>a</sup>	12000	gwanozyna	Cl <sub>2</sub> P(O)CCl <sub>2</sub> P(O)Cl <sub>2</sub>	-
GpCF <sub>2</sub> p <sup>a</sup>	12000	gwanozyna	-	-
ApCH <sub>2</sub> p (37)	15000	adenozyna	Cl <sub>2</sub> P(O)CH <sub>2</sub> P(O)Cl <sub>2</sub>	44
ApNHp (38)	15000	adenozyna	Cl <sub>3</sub> PNP(O)Cl <sub>2</sub>	61

<sup>a</sup>Syntezy zakończone niepowodzeniem.

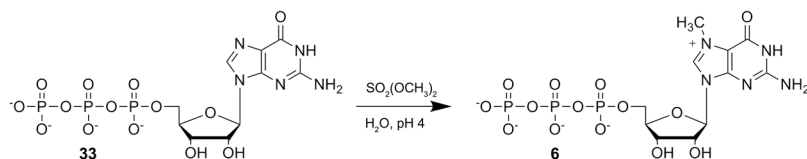
## 2.2.3.2. Trifosforany nukleozydów

### 2.2.3.2.1. Cel syntezy

Na potrzeby badań opisanych w pracy przeprowadzono syntezę m<sup>7</sup>GTP oraz kilku jego analogów zawierających modyfikację w łańcuchu fosforanowym. Zarówno m<sup>7</sup>GTP jak i jego analogi oddziałują z białkami wiążącymi kap takimi jak eIF4E oraz DcpS, przez co znajdują zastosowanie w badaniach nad tymi białkami.<sup>570</sup> Na podstawie wcześniejszych badań z użyciem m<sup>7</sup>GDP uznano, że m<sup>7</sup>GTP oraz jego pochodne także mogą być potencjalnymi inhibitorami kompleksu enzymatycznego Dcp1/2 i należy je przebadać pod tym kątem. Dodatkowo, niektóre z opisanych związków wykorzystano do badań mających na celu poszukiwanie inhibitorów eIF4E oraz DcpS. Ponadto na potrzeby syntezy trifosforanów m<sup>7</sup>Guo udoskonalono metody wydłużania łańcucha fosforanowego nukleotydu oparte o sprzężanie z *P*-imidazolidowymi pochodnymi nieorganicznych fosforanów, co zostanie dokładniej opisane w następnych rozdziałach rozprawy.

### 2.2.3.2.2. Synteza m<sup>7</sup>GTP

m<sup>7</sup>GTP (**6**) został otrzymany z GTP (**33**) w reakcji metylacji za pomocą siarczanu dimetylu z dobrą wydajnością (63%). Synteza GTP została przedstawiona w następnym rozdziale przy opisie wykorzystania bisfosforoimidazolidów w syntezie nukleotydu.



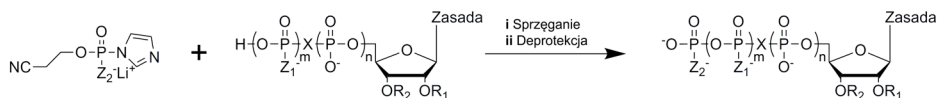
**Schemat 2.7.** Synteza m<sup>7</sup>GTP

### 2.2.3.2.3. Synteza związków z modyfikacjami mostkowymi

W celu uzyskania analogów m<sup>7</sup>GTP zawierających modyfikację metylenobisfosfonianową oraz imidodifosforanową zastosowano nową procedurę syntezy opartą na wykorzystaniu pochodnej *P*-imidazolowej  $\beta$ -cyjanofosforanu. W czasie pracy nad rozwojem tej metody otrzymano także kilka innych trifosforanów nukleotydu z modyfikacjami mostkowymi.

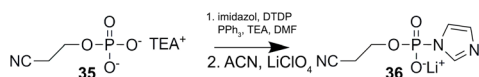
### 2.2.3.2.3.1. Syntezy z wykorzystaniem pochodnej *P*-imidazolowej $\beta$ -cyjanofosforanu

W celu usprawnienia syntezy nukleotydów zawierających modyfikowany łańcuch fosforanowy rozwinięto nową metodę syntezy opartą na wykorzystaniu imidazolowej pochodnej fosforanu  $\beta$ -cyjanoetylu. (**Rys. 2.5**) pełniącej rolę odczynnika elektrofilowego (*P*-elektrofil). Ulega on efektywnemu sprzęganiu z różnorodnymi nukleotydami, w tym także posiadającymi modyfikacje w łańcuchu fosforanowym (np. grupa imidodifosforanowa lub metylenobisfosfonianowa w pozycji mostkowej). Podobnie jak w przypadku innych sprzęgań *P*-imidazolidów z (oligo)fosforanem lub jego pochodną proces ten wspomagany jest obecnością chlorków metali dwuwartościowych takich jak  $MgCl_2$  lub  $ZnCl_2$ .



**Rys 2.5.** Wykorzystanie pochodnych *P*-imidazolidów cyjanofosforanów w syntezie nukleotydów.

Z jednej strony synteza złożonego łańcucha polifosforanowego, zawierającego więcej niż jedną modyfikację chemiczną, za pomocą prezentowanego podejścia wymaga kilkuetapowej syntezy, co w ogólności jest mniej efektywne niż metody oparte na przyłączaniu pochodnej pirofosforanu do aktywnej pochodnej monofosforanu nukleozydu (reakcja Ludwiga-Ecksteina i jej pochodne). Są one reakcjami typu *one pot* (reakcje zachodzące sekwencyjnie bez wydzielania produktów pośrednich). Jednak z drugiej strony synteza poprzez sprzęganie pozwala na bardziej precyzyjną kontrolę nad strukturą zaprojektowanego łańcucha fosforanowego, umożliwiając przykładowo łatwe wprowadzanie modyfikacji niemozkowych w pozycję  $\alpha$  lub  $\beta$  łańcucha. Wydłużanie łańcucha fosforanowego także może zostać łatwo przeprowadzone. Inną zaletą takiej strategii jest możliwość syntezy związków takich jak  $m^7GpCH_2pp$  (**7**) lub  $m^7GpNHpp$  (**8**), posiadających modyfikacje mostkowe w pozycji  $\alpha/\beta$ , które nie mogą zostać otrzymane poprzez wspomniane cykliczny trimetafosforan. Dlatego zwykle otrzymywane są one za pomocą enzymatycznej fosforylacji odpowiednich difosforanów nukleotydów.<sup>674, 675</sup> Jednak istotnym utrudnieniem dla wykorzystania kinaz w syntezie wspomnianych związków jest ich wysoka specyficzność substratowa, co uniemożliwia fosforylację pewnych substratów. Inną zaletą syntezy przez nieorganiczne *P*-imidazolidy jest to, że zachodzi w relatywnie łagodnych warunkach, przez co ryzyko rozpadu wrażliwych chemicznie substratów jest znacznie mniejsze. Z wyżej wymienionych powodów uważa się, że zaprezentowana metoda stanowi alternatywę dla modyfikacji w mostku trifosforanowym, zwłaszcza takich nukleotydów, które ze względu na posiadane modyfikacje nie ulegają aktywacji (przekształceniu w odpowiedni *P*-imidazolid).

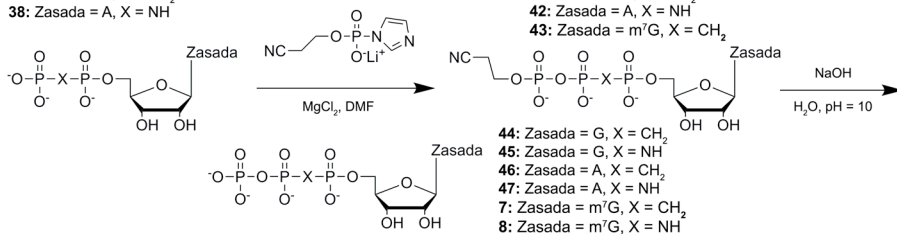


**Schemat 2.8.** Synteza *P*-imidazolidu  $\beta$ -cyjanofosforanu.

Opracowana procedura składa się z trzech etapów. Pierwszy etap polega na imidazolowaniu  $\beta$ -cyjanofosforanu w reakcji Mukaiyame-Hashimoto i zachodzi w analogiczny sposób jak dla aktywacji nukleotydów. Z uwagi na dobrą rozpuszczalność soli sodowych powstałego produktu w acetonie istnieje konieczność strącania pochodnej pod postacią soli litowej w bezwodnym acetonitrylu. Drugi etap to opisane wcześniej tworzenie wiązania pirofosforanowego zachodzące w DMF w obecności chlorków metali dwuwartościowych, natomiast ostatni etap polega na usunięciu grupy cyjanoetylowej (CE) w wyniku  $\beta$ -eliminacji prowadzonej w warunkach zasadowych (**Schemat 2.9**). Mimo pozornej prostoty zaproponowanej metody konieczne było przeprowadzenie szeregu kroków optymalizacyjnych w odniesieniu do warunków sprzęgania oraz deprotekcji takich jak dobór odpowiedniej zasady oraz temperatury prowadzenia reakcji. Grupa CE jest często stosowana jako grupa ochronna w syntezie oligonukleotydów gdzie jest wprowadzana do grupy fosforanowej. Jest ona łatwo usuwana w reakcji  $\beta$ -eliminacji prowadzonej w warunkach zasadowych. Usuwanie tej grupy z ujemnie naładowanego łańcucha fosforanowego wymaga dość drastycznych warunków, zwykle stosuje się 0,1 M roztwór NaOH w podwyższonej temperaturze. Z uwagi na wrażliwość  $m^7G$  na warunki zasadowe taka procedura nie mogła zostać zastosowana w przypadku analogów kapu.

26: Zasada = G, X = CH<sub>2</sub>  
 27: Zasada = G, X = NH  
 37: Zasada = A, X = CH<sub>2</sub>  
 38: Zasada = A, X = NH

39: Zasada = G, X = CH<sub>2</sub>  
 40: Zasada = G, X = NH  
 41: Zasada = A, X = CH<sub>2</sub>  
 42: Zasada = A, X = NH  
 43: Zasada = m<sup>7</sup>G, X = CH<sub>2</sub>



44: Zasada = G, X = CH<sub>2</sub>  
 45: Zasada = G, X = NH  
 46: Zasada = A, X = CH<sub>2</sub>  
 47: Zasada = A, X = NH  
 7: Zasada = m<sup>7</sup>G, X = CH<sub>2</sub>  
 8: Zasada = m<sup>7</sup>G, X = NH

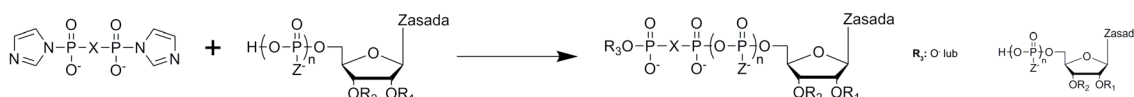
**Schemat 2.9.** Synteza trifosforanów nukleozydów modyfikowanych grupą metylenobisfosfonianową lub imidodifosforanową poprzez zastosowanie *P*-imidazolidu β-cyjanofosforanu.

W przypadku trifosforanów nukleozydów **39-43** napotkano problemy z opracowaniem jednoetapowej metody pozwalającej na wydajne sprzęganie i deprotekcję w jednym naczyniu reakcyjnym. Mimo, że ostatecznie udało się znaleźć optymalne warunki dla tego procesu to związki otrzymane na potrzeby pracy doktorskiej zostały otrzymane przy użyciu procedury wymagającej wydzielenia trifosforanu nukleozydu z grupa CE a następnie usunięciu jej w kolejnym kroku syntetycznym (**Schemat 2.9**) stosując wspomniane wyżej zasadowe warunki. Z uwagi na dużą stabilność chemiczną związków posiadających modyfikacje mostkowe zastosowane zasadowe warunki nie doprowadziły do degradacji łańcucha fosforanowego. Mimo dość dużej wrażliwości pierścienia m<sup>7</sup>G na warunki zasadowe to w sytuacji gdy pH reakcji nie wzrasta powyżej 10,0 to nie obserwuje się otwarcia pierścienia, nawet gdy deprotekcja jest prowadzona przez kilka godzin. Dzięki temu, związki końcowe (**39-43**) uzyskano z dobrymi wydajnościami (78-72%, **Tab. 2.2**), jedynie związek **7** został uzyskany z niższą wydajnością (33%). Analogi kapu **7** i **8** potrzebne do badań biochemicznych zostały uzyskane albo na drodze metylacji odpowiednich trifosforanów albo bezpośrednio na drodze opisanej metody elongacji łańcucha fosforanowego. Warto zaznaczyć, że mimo szeroko opisywanej podatności na rozpad m<sup>7</sup>G analogi m<sup>7</sup>GTP okazały się na tyle odporne chemicznie na niskie pH, że możliwe było usunięcie grupy CE z m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>ppCE (**43**) w warunkach zasadowych bez obserwowalnych strat wynikłych z otwarcia pierścienia 7-metyloguanozyny.

#### 2.2.3.2.4. Synteza związków z modyfikacjami niemostkowymi

##### 2.2.3.2.4.1. Syntezy z udziałem pochodnych *P*-imidazolowych difosforanów

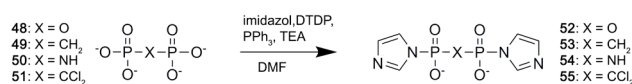
Jak zostało wspomniane w części literaturowej rozprawy, do tej pory opracowano szereg metod umożliwiających syntezę nukleotydu zawierających modyfikację tiofosforanową lub boranofosforanową. Jednakże, większość z nich nie jest odpowiednia do syntezy związków zawierających labilną chemicznie 7-metyloguanozynę, która jest podatna na rozpad w podwyższonej temperaturze lub ekstremalnym pH. By otrzymać trifosforany m<sup>7</sup>Guo **9-12** oraz tetrafosforanowe analogi kapu **13-17** zaadaptowano zachodzącą w łagodnych warunkach reakcję sprzęgania aktywowanego chemicznie nieorganicznego difosforanu z odpowiednio zmodyfikowanym nukleotydem (**Schemat. 2.10**). Metoda ta była znana w przeszłości ale nie została wcześniej zaaplikowana do syntezy tio- lub boranofosforanów, ponadto w niniejszej pracy zaproponowano odmienny sposób syntezy *P*<sub>1</sub>,*P*<sub>2</sub>-bisfosforoimidazolidów pirofosforanu i jego analogów niż opisano wcześniej (**Schemat 2.10, Tab. 2.3**, zobacz także *Część literaturową*).



**Schemat 2.10.** Ogólny zarys syntez nukleotydu z wykorzystaniem nieorganicznych pochodnych 1*P*,2*P* di(1-imidazolowych). Poprzez manipulację stężeniem imidazolidu można uzyskać zarówno 5', '5' dinukleotydy (stężenie imidazolidu powinno być w zakresie 0,50-0,75 równoważnika nukleotydu) jak i trifosforany nukleozydów (stężenie imidazolidu powinno wynosić ~4 równoważniki nukleotydu). W każdym z przypadków pierwszym produktem jest reaktywna imidazolowa pochodna trifosforanu nukleozydu, która może ulec reakcji z drugim nukleotydem co prowadzi do powstania wspomnianego tetrafosforanu. Z kolei bardzo duży nadmiar imidazolidu może prowadzić do powstania pentaforanów nukleozydów (dalsza dyskusja w tekście).

### 2.2.3.2.4.1.1 Synteza pochodnych 1*P*,2*P*-di(1-imidazolowych)

Pochodne 1*P*,2*P*- di(1-imidazolowe) **52-55** zostały otrzymane z odpowiednich difosforanów nieorganicznych **48-51** w reakcji Mukaiyama-Hashimoto (**Schemat 2.11**). Ich przygotowanie wymagało użycia większego nadmiaru imidazolu (20 equiv.), ditiopirydyny oraz tryfenylofosfiny (po 5 equiv.) w porównaniu do syntezy imidazolowych pochodnych nukleotydów. Związki **52-55** zostały uzyskane z dobrą wydajnością (> 63%) a ich czystość została potwierdzona za pomocą spektroskopii <sup>31</sup>P NMR (patrz **Tab. 2.2**). Dla porównania wszystkie próby syntezy imidazolowych pochodnych monofosforanów nukleotydów **58** oraz **59** zakończyły się niepowodzeniem. Reakcje były prowadzone przez 12 godzin, po których nie obserwowano powstawania zadowalających ilości produktu (~5 % wydajności) a przedłużanie reakcji prowadziło do rozpadu nukleotydów do guanozyny i nieorganicznych fosforanów. Poprzednio podjęte próby syntezy imidazolowych lub triazolowych pochodnych Gp<sub>3</sub> zakończyły się powodzeniem jednak same pochodne nie były aktywne w reakcjach sprzęgania. Dlatego też synteza analogów m<sup>7</sup>GTP **9-12** oraz analogów m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G **13-17** z modyfikacjami borano- lub tiofosforanową poprzez aktywne pochodne nieorganicznych difosforanów wydaje się najbardziej optymalnym rozwiązaniem.



**Schemat 2.11.** Synteza nieorganicznych bisfosforoimidazolidów.

**Tab. 2.2.** Substraty i produkty oraz wydajności syntezy imidazolowych pochodnych fosforanów.

Produkt (No) <sup>a</sup>	Substrat (No) <sup>b</sup>	Wydajność preparatywna [%]
Im-β-cyjanofosforan ( <b>36</b> ) <sup>b</sup>	β-cyjanofosforan	89
Im-pp-Im ( <b>52</b> )	pirofosforan ( <b>48</b> )	97
Im-pCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>53</b> )	metylenobisfosfonian ( <b>49</b> )	63
Im-pNHp-Im ( <b>54</b> )	imidodifosforan ( <b>50</b> )	84
Im-pCCl <sub>2</sub> p-Im ( <b>55</b> )	dichlorometylenobisfosfonian ( <b>51</b> )	71

<sup>a</sup>sól sodowa

<sup>b</sup>sól litowa

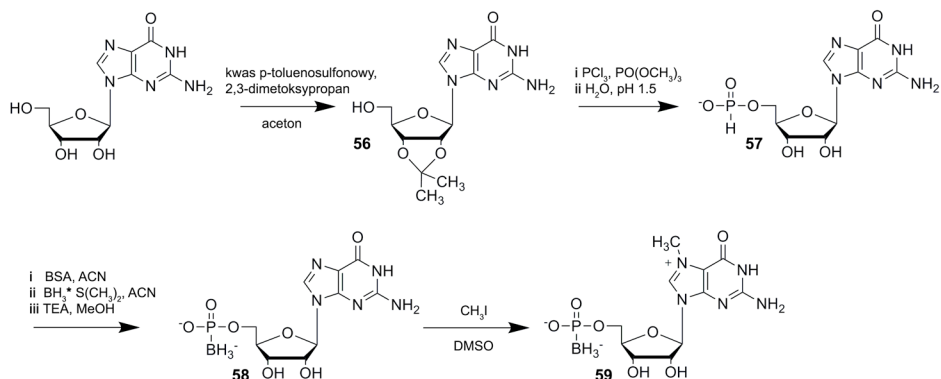
<sup>c</sup>sól TEA

### 2.2.3.2.4.1.2 Synteza boranofosforanów

Przed rozpoczęciem syntezy boranofosforanów przeprowadzono syntezę GTP wychodząc od GMP oraz diimidazolowej pochodnej pirofosforanu **52**. Wydajność sprzęgania była zadowalająca co skłoniło do zaadaptowania metody do syntezy borano- i tiofosforanowych analogów kapu. Z uwagi na większą wrażliwość chemiczną boranofosforanów warunki reakcji optymalizowano z myślą o tej klasie związków.

Nukleotydowe substraty Gp<sub>BH3</sub> (**58**) oraz m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub> (**59**) otrzymano w oparciu o opracowaną wcześniej strategię syntezy (**Schemat 2.12**).<sup>676</sup> Osuszona guanozyna została przekształcona do 2',3'-izopropylloguanozyny (**56**) i tak zabezpieczony związek poddano fosfitylacji przy użyciu PCl<sub>3</sub>, następcza hydroliza doprowadziła do powstania stabilnego *H*-fosfonianu (**57**) a ogrzewanie w 60 °C w kwaśnym środowisku pozwoliło na usunięcie grupy izopropylidenowej z pierścienia guanozyny. Otrzymany w ten sposób *H*-fosfonian guanozyny użyto w reakcji boranowania z użyciem kompleksu siarczku dimetylu z BH<sub>3</sub> prowadzącej do powstania związku **58**, który ewentualnie poddano metylacji z użyciem CH<sub>3</sub>I celem syntezy **59** (wydajność metylacji 54%).

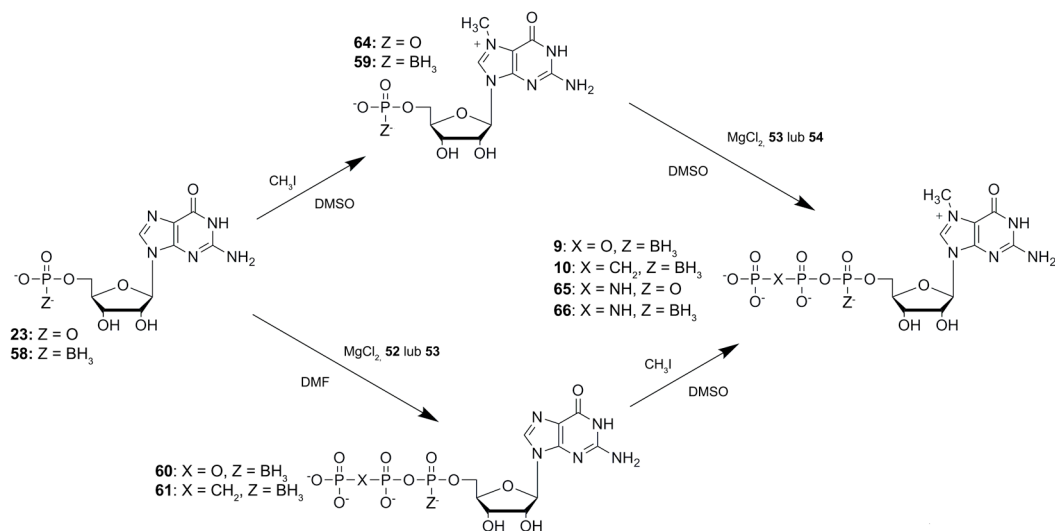
Ponieważ wcześniejsze doświadczenia z syntezą boranofosforanowych analogów kapu wskazywały, że sprzęganie aktywowanych fosforanów zachodzi efektywnie w obecności MgCl<sub>2</sub> to w przypadku syntezy boranofosforanowych pochodnych GTP oraz m<sup>7</sup>GTP także wykorzystaną tą sól jako mediator (**Schemat 2.13**). Reakcja sprzęgania Gp<sub>BH3</sub> z użyciem pochodnej pirofosforanowej **52** przebiegała w 60h, podczas gdy użycie bardziej reaktywnej pochodnej metylobisfosfonianowej **53** skracało czas sprzęgania do 5h. Wyniki te były zgodne z wcześniejszymi pracami



**Schemat 2.12.** Synteza boranofosforanowych monofosforanów nukleozydów **58** i **59**.

wskazującymi, że obecność wiązań P-C tłumaczy zwiększoną reaktywność bisfosfonianów w porównaniu do niemodyfikowanych fosforanów w reakcjach sprzęgania. Dla obydwu opisanych wyżej sprzęgań odnotowano zadowalające wydajności wynoszące 44% dla  $Gp_{BH_3}pp$  (**60**) oraz 39% dla  $Gp_{BH_3}pCH_2p$  (**61**). Należy zauważyć, że pierwotnym produktem tych reakcji sprzęgania jest wysoce reaktywna imidazolowa pochodna trifosforanu nukleozydu co może prowadzić do powstawania niepożądanych produktów ubocznych takich jak  $Gp_{BH_3}ppp_{BH_3}G$  lub  $Gp_{BH_3}pCH_2pp_{BH_3}G$ . Dlatego też w prowadzonych reakcjach sprzęgania zastosowano znaczny (4-krotny) nadmiar imidazolowej pochodnej względem nukleotydu. Taka proporcja substratów gwarantowała powstawanie jedynie nieznacznych ilości dinukleotydu natomiast dalsze jej zwiększanie na korzyść pochodnej imidazolowej prowadzi do formowania się pentafosforanów nukleozydów ( $Gp_{BH_3}pppp$  oraz  $Gp_{BH_3}pCH_2ppCH_2p$ ) jako produktów ubocznych.

Uzyskane boranofosforanowe analogi GTP **60** oraz **61** poddano metylacji w pozycji N7 z wykorzystaniem  $CH_3I$ , wydajności metylacji wyniosły odpowiednio 40% oraz 31% dla związków **9** i **10**. Zmniejszona wydajność reakcji związana jest z podatnością terminalnej grupy fosforanowej na metylację co prowadzi do powstania podwójnie metylowanych produktów ubocznych. Z drugiej strony w przypadku związków zawierających grupę boranofosforanową zastosowanie metylacji z użyciem siarczanu dimetylu może prowadzić do jeszcze większych strat ponieważ niskie pH, w którym prowadzona jest ta reakcja może prowadzić do rozpadu grupy boranofosforanowej.



**Schemat 2.13.** Synteza trifosforanów nukleozydów modyfikowanych grupą boranofosforanową lub imidodifosforanową.

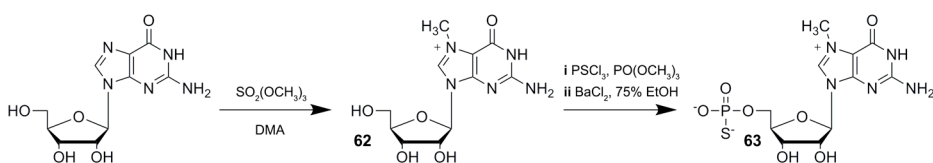
Z uwagi na wspomniane problemy występujące podczas metylacji trifosforanów nukleozydów **60** oraz **61** sprawdzono, czy alternatywna droga syntezy (**Schemat 2.13**) polegająca na sprzęganiu metylowanego monofosforanu,  $m^7Gp_{BH_3}$  (**59**) nie będzie dawać lepszych rezultatów. W tym celu wykorzystano otrzymany

wcześniej **59**, wydajność sprzęgania pochodnej bisfosfonianowej **53** z  $m^7Gp_{BH3}$  **59** była zbliżona jak dla sprzęgania z  $Gp_{BH3}$  (**58**) (36% vs 39%). Natomiast wydajność metylacji **58** jest lepsza niż **60**, dlatego też takie podejście (sprzęganie diimidazolidu z metylovanym w pozycji N7 substratem) uznano za lepsze. Niestety w przypadku mniej aktywnej dimidazolowej pochodnej pirofosforanu **52** reakcja zachodziła z bardzo niską wydajnością, w rezultacie zaniechano tego podejścia w syntezie związku **60**.

W ostatnim etapie syntezy analogi  $m^7GTP$  **9** i **10** wstępnie oczyszczone za pomocą chromatografii jonowymiennej zostały rozdzielone na diastereoizomery za pomocą półpreparatywnego HPLC a diastereoizomery zostały nazwane D1 oraz D2 w nawiązaniu do ich kolejności elucji z kolumny RP.

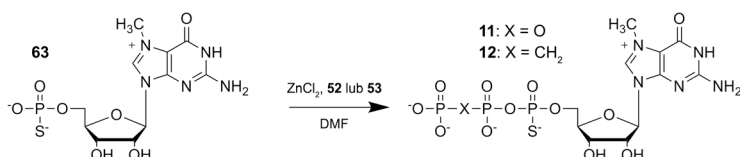
### 2.2.3.2.4.1.3. Synteza tiofosforanów

Analog  $m^7GTP$ ,  $m^7Gp_s pCH_2p$  (**12**) przygotowano w analogiczny sposób jak związki **9** oraz **10**, jednakże substratem nukleotydowym był  $m^7Gp_s$  (**63**), którego syntezę przedstawiono na Schemacie 2.14.  $m^7G$  (**62**) uzyskano na drodze selektywnej metylacji Guo w pozycji N7 za pomocą siarczany dimetylu. Produkt po przepłukaniu, odsączeniu i wysuszeniu *in vacuo* został od razu wykorzystany do syntezy **63** za pomocą reakcji tiofosforylacji w fosforanie trimetylu i w obecności 2,6-lutydyny. Bezpośrednie oczyszczanie tak powstałego związku za pomocą chromatografii jonowymiennej prowadziło do otrzymania produktu silnie (>80%) zanieczyszczonego mieszaniną soli nieorganicznych, których nie udało się usunąć. Co istotne, tiofosforylacja innych związków takich jak guanozyna czy adenozyne nie następuje takich trudności w oczyszczeniu produktu. Celem uzyskania czystego związku wprowadzono szereg zmian do procedury tiofosforylacji. Mianowicie, gdy pomiar na HPLC wskazał znaczący stopień konwersji do produktu reakcja została zatrzymana przez dodanie 10% roztworu  $BaCl_2$  w dejonizowanej wodzie a pH szybko doprowadzono do 9,0 za pomocą TEA. Następnie produkt został wytrącony przez dodanie etanolu tak aby jego końcowe stężenie wyniosło 75%, wytrącony osad przepłukano 96% etanolem i poddano ekstrakcji z fazy stałej przy pomocy dejonizowanej wody.<sup>677</sup> Wykorzystano fakt, że nukleotydowa sól baru wykazuje znacznie lepszą rozpuszczalność w wodzie niż nieorganiczne sole baru przez co możliwe było uzyskanie roztworu **63** jedynie w niewielkim stopniu zanieczyszczonego związkami nieorganicznymi, które następnie łatwo usunięto podczas chromatografii jonowymiennej uzyskując czysty (> 95%) produkt. Mimo, że opisana procedura jest czasochłonna i prowadzi do spadku wydajności syntezy jest to jedyna metoda pozwalająca na uzyskanie czystego  $m^7Gp_s$ . Inne próby uzyskania tego związku pozbawionego zanieczyszczeń (takie jak ekstrakcja mieszaniny reakcyjnej z użyciem octanu etylu czy rechromatografia zanieczyszczonego  $m^7Gp_s$ ) nie przyniosły zadowalającego efektu.



Schemat 2.14. Synteza  $m^7Gp_s$ .

Czysty substrat poddano sprzęganiu z diimidazolidem **53** stosując  $ZnCl_2$  jako mediator reakcji (Schemat 2.15), po oczyszczeniu za pomocą chromatografii jonowymiennej związek **13** został uzyskany z 33% wydajnością.



Schemat 2.15. Synteza tiofosforanowych trifosforanów nukleozydów **11** i **12**.

Następnie obydwa diastereoizomery zostały rozdzielone za pomocą semipreparatywnego RP HPLC, co ciekawe różnice w czasach retencji pomiędzy izomerami były znacznie mniej znaczące niż dla boranofosforanowych pochodnych GTP lub  $m^7GTP$ . W celu pełniejszego sprawdzenia strategii syntetycznej opartej na sprzęganiu z bis(imidazolidami),  $m^7Gp_s pp$  (**11**), otrzymany wcześniej poprzez modyfikację reakcji Ludwiga-Ecksteina, został także otrzymany na tej drodze, poprzez sprzęganie **63** z **52**, jednak wydajność całej syntezy była niższa (20% vs 35%).



#### 2.2.3.2.4.1.4. Synteza imidofosforanów i dichlorobisfosfonianów

Z uwagi na to, że rezultaty sprzęgania z użyciem diimidazolowych pochodnych **52** oraz **53** były zachęcające to postanowiono sprawdzić czy na tej drodze możliwe jest wprowadzenie dodatkowych modyfikacji w pozycję  $\beta/\gamma$  łańcucha fosforanowego wykorzystując uprzednio otrzymane związki **54** oraz **55**. Próbné reakcje imidazolidu **54** z AMP lub GMP były pomyślne, oczekiwany trifosforan powstawał z zadowalającą wydajnością (konwersja HPLC > 50%), reakcja zachodziła w obecności zarówno  $MgCl_2$  oraz  $ZnCl_2$ . Wcześniejsze próby syntezy imidodifosforanów wskazywały, że metylacja GppNHp prowadzi do rozpadu tego związku. Dlatego też zdecydowano by prowadzić sprzęgania **54** ze związkami zawierającymi już grupę metylową w pozycji N7. Pierwsze próby sprzęgania z udziałem **64** lub **59** zakończyły się niepowodzeniem niezależnie czy w reakcjach wykorzystano  $MgCl_2$  lub  $ZnCl_2$ , dużym problemem była też niska rozpuszczalność **54** w DMF. Zmiana rozpuszczalnika na DMSO zaowocowała poprawieniem przebiegu reakcji, zarówno gdy substratem był **59** jak i **64**. Syntezę  $m^7Gp_{BH3}pNHp$  (**66**) przeprowadzono w obecności  $ZnCl_2$ , po 60h reakcję zakończono a pomiary na HPLC wskazały na wysoki (> 60%) stopień konwersji, jednakże po oczyszczeniu za pomocą chromatografii jonowymiennej wydajność spadła do 12% sugerując, że związek może być niestabilny w zasadowym pH. Dodatkowo zaobserwowano, że po rozdziale diastereoizomerów na RP HPLC znaczna część związku uległa rozpadowi. Dalsze badania za pomocą MS i NMR wskazały, że utrata terminalnego fosforanu (prowadząca do  $m^7Gp_{BH3}pNH$ ) jest jednym z istotnych wkładów do rozpadu, jednakże zarówno dokładny mechanizm degradacji jak i inne produkty nie zostały dokładnie zbadane.

Próby syntezy nukleotydów zawierających grupę dichlorometylenobisfosfonianową zakończyły się niepowodzeniem. Uzyskana dichlorobisfosfonianowa pochodna imidazolowa **55** nie wykazywała reaktywności w reakcjach sprzęgania. Sprawdzono różne rozpuszczalniki (DMF, DMSO), sole nieorganiczne ( $ZnCl_2$ ,  $MgCl_2$ ) oraz substraty (GMP,  $m^7GMP$ ,  $Gp_{BH3}$ ,  $m^7Gp_{BH3}$ ,  $m^7Gp_S$ ) jednak nigdy nie udało się uzyskać widocznych produktów sprzęgania nawet jeżeli reakcje były prowadzone przez okres kilku dni. Dlatego też zaniechano dalszych prób wykorzystania tego związku w syntezie.

**Tab. 2.3.** Substraty i produkty sprzęgań z imidazolidami, współczynniki absorpcji oraz wydajności fosforylacji dla trifosforanów nukleozydów.

Produkt (No)	$\epsilon_{\lambda,260}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	P-nukleofil (No)	P-elektrofil (No)	Wydajność preparatywna [%]
GTP ( <b>33</b> )	12000	GMP ( <b>23</b> )	Im-pp-Im ( <b>52</b> )	65
GpCH <sub>2</sub> p ( <b>44</b> )	12000	GpCH <sub>2</sub> p ( <b>26</b> )	Im-PO <sub>4</sub> - $\beta$ (CE) ( <b>36</b> )	78
GpNHpp ( <b>45</b> )	12000	GpNHp ( <b>27</b> )	Im-PO <sub>4</sub> - $\beta$ (CE) ( <b>36</b> )	72
Gp <sub>BH3</sub> pp ( <b>60</b> )	12000	Gp <sub>BH3</sub> ( <b>58</b> )	Im-pp-Im ( <b>52</b> )	44
Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p ( <b>61</b> )	12000	GpCH <sub>2</sub> p ( <b>26</b> )	Im-pCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>53</b> )	39
$m^7GpCH_2pp$ ( <b>7</b> )	11300	$m^7GpCH_2p$ ( <b>2</b> )	Im-PO <sub>4</sub> - $\beta$ (CE) ( <b>36</b> )	33
$m^7Gp_{BH3}pCH_2p$ ( <b>10</b> )	11300	$m^7Gp_{BH3}$ ( <b>59</b> )	Im-pCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>53</b> )	36
$m^7GppNHp$ ( <b>65</b> )	11300	$m^7GMP$ ( <b>64</b> )	Im-pNHp-Im ( <b>54</b> )	-
$m^7Gp_{BH3}pNHp$ ( <b>66</b> )	11300	$m^7Gp_{BH3}$ ( <b>59</b> )	Im-pNHp-Im ( <b>54</b> )	-
$m^7Gp_Spp$ ( <b>11</b> )	11300	$m^7Gp_S$ ( <b>63</b> )	Im-pp-Im ( <b>52</b> )	32
$m^7Gp_SpCH_2p$ ( <b>12</b> )	11300	$m^7Gp_S$ ( <b>63</b> )	Im-pCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>53</b> )	32
ApCH <sub>2</sub> p ( <b>46</b> )	15000	ApCH <sub>2</sub> p ( <b>37</b> )	Im-PO <sub>4</sub> - $\beta$ (CE) ( <b>36</b> )	76
ApNHpp ( <b>47</b> )	15000	ApNHp ( <b>38</b> )	Im-PO <sub>4</sub> - $\beta$ (CE) ( <b>36</b> )	77

### 2.2.3.3. Trifosforany dinukleozydów

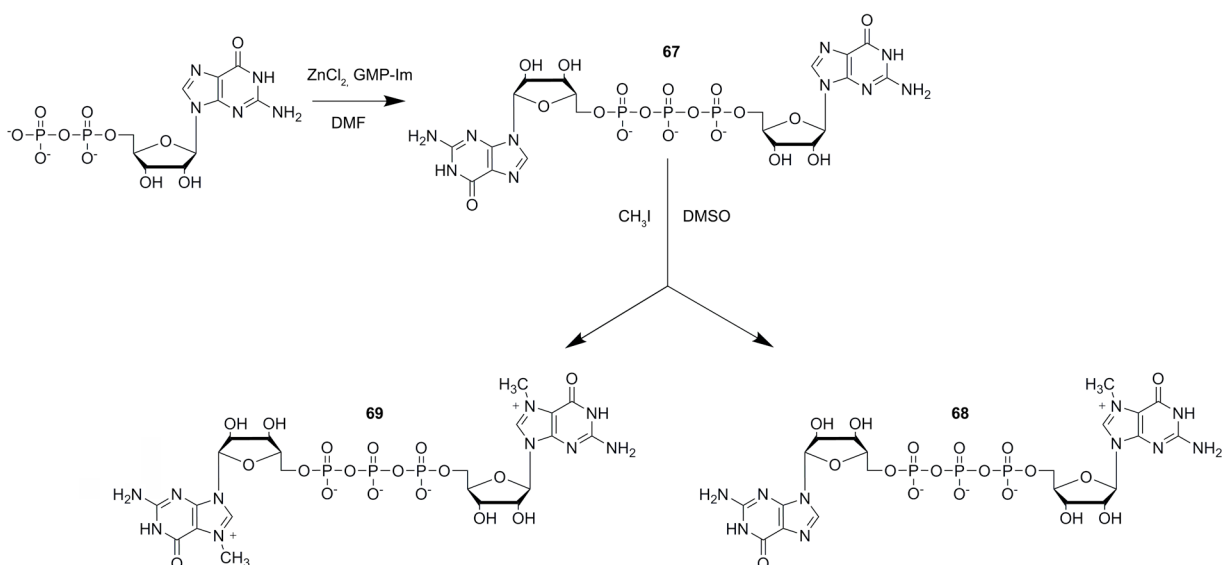
#### 2.2.3.3.1. Cel syntezy

Dinukleotydomowe analogi kapu  $m^7GpppG$  (**68**) oraz  $m^7Gpppm^7G$  (**69**) otrzymano jako kontrolę do badań nad wiązaniem się analogów kapu modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym do kompleksu Dcp1/2 i innych białek (ocena wpływu modyfikacji w szkieletcie fosforanowym na oddziaływanie białko-ligand).

#### 2.2.3.3.2. Synteza chemiczna

W teorii istnieje kilka sposobów na otrzymanie związków **68** oraz **69**. Z uwagi na prostotę i redukcję ilości przejść syntetycznych zdecydowano się zastosować strategię przedstawioną na **Schemacie 2.16**.

GDP został otrzymany jak poprzednio (**Schemat 2.1**) a następnie sprzęgnięty z GMP-Im. Tak powstały GpppG (**67**) został poddany metylacji z pomocą  $CH_3I$ . Ponieważ **67** ulega stopniowo metylacji w pierwszym oraz drugim pierścieniu G to możliwe jest uzyskanie związków **68** oraz **69** w jednym przejściu syntetycznym. Reakcja prowadzona było dopóki pomiary HPLC nie wskazały, że stosunek molowy obydwu związków wynosi  $\sim 1:1$ . Wtedy metylacja została zakończona a **68** i **69** rozdzielono od siebie za pomocą chromatografii jonowymiennej.



**Schemat 2.16.** Synteza trifosforanowych analogów kapu.

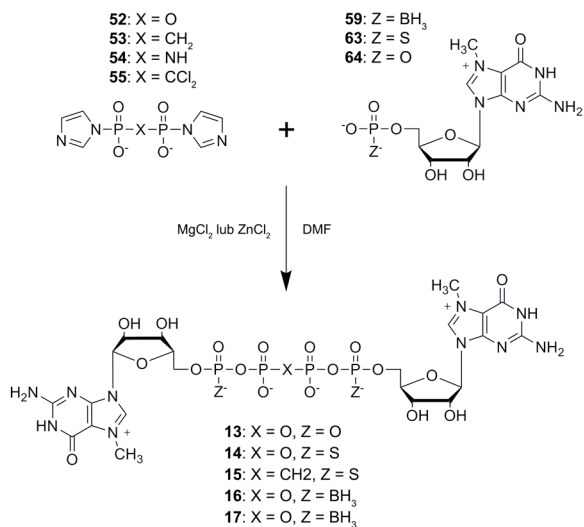
### 2.2.3.4. Tetrafosforany dinukleotydomów

#### 2.2.3.4.1. Cel syntezy

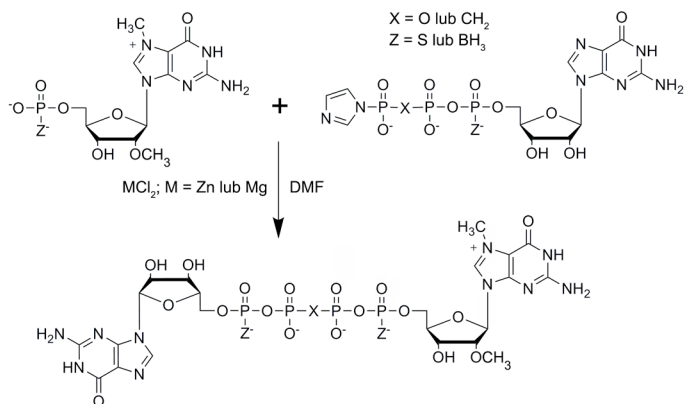
Na potrzeby badań opisanych w pracy przeprowadzono syntezę szeregu analogów kapu, będących pochodnymi  $m^7Gppppm^7G$  (**13**) zawierających znacznie zmodyfikowany mostek fosforanowy (**Rys. 2.3**). Z uwagi na obecność wspomnianych modyfikacji uznano, że związki **14-17** mogą znaleźć zastosowanie zarówno w syntezie kapowanych transkryptów mRNA o polepszonych właściwościach biologicznych (powinowactwo do eIF4E oraz zwiększona stabilność w ekstraktach komórkowych lub *in vivo*) jak i w badaniach nad kompleksem Dcp1/2. Na podstawie wcześniejszych badań nad tym kompleksem z użyciem niemodyfikowanych analogów kapu uznano, że tak modyfikowane związki mogą być potencjalnymi inhibitorami tego białka i należy przebadać je pod tym kątem. Ponadto na potrzeby syntezy związków **13-17** udoskonalono opisaną wcześniej metodę wydłużania łańcucha fosforanowego nukleotydomów opartą o sprzężenie  $P1,P2$ -bisfosforoimidazolidami nieorganicznych fosforanów, co zostanie dokładniej opisane w dalszej części pracy.

### 2.2.3.4.2. Syntezy z udziałem P1,P2-bisfosforoimidazolidów

Tetrafosforanowe analogi kapu **13-17** (o sumarycznym wzorze  $m^7Gp_pXpp_zm^7G$ ) posiadają dwie reszty  $m^7Guo$  przez co wykazują pewne elementy symetrii (symetria typu  $C_2$ ). Właściwość ta może w znaczny sposób ułatwić ich syntezę ponieważ związki te mogą powstać w jednym przejściu syntetycznym, wychodząc od odpowiednich diimidazolowych pochodnych opisanych w rozdziale 2.2.3.2.4.1.1 *Synteza pochodnych 1P,2P-di(1-imidazolowych)* oraz odpowiedniego monofosforanu nukleozydu (**Schemat 2.17**). W takiej reakcji sprzęgania jedna cząsteczka pochodnej diimidazolowej reaguje z dwoma cząsteczkami monofosforanu nukleozydu co skutkuje powstaniem symetrycznego dinukleotydu. Synteza takich związków (analogów  $m^7Gppppm^7G$ ) jest znacznie prostsza do przeprowadzenia niż otrzymanie podobnych związków będących analogami typu ARCA i mających taki sam zestaw modyfikacji w łańcuchu fosforanowym (np.  $m_2^{7,2'-O}Gp_sppp_sG$ ). Taka synteza wymagałaby sprzęgania imidazolowej pochodnej trifosforanu nukleozydu z monofosforanem nukleozydu (**Schemat 2.18**). Wcześniejsze doświadczenia wskazały na pewne problemy z takimi sprzęganiami, do których można wliczyć niską wydajność oraz kłopotliwe oczyszczanie produktów od nieprzereagowanych substratów. Ponadto imidazolowe pochodne trifosforanów nukleozydów są stosunkowo trudne w otrzymaniu oraz charakteryzują się mniejszą stabilnością w porównaniu do innych aktywowanych w ten sposób związków.<sup>500</sup>



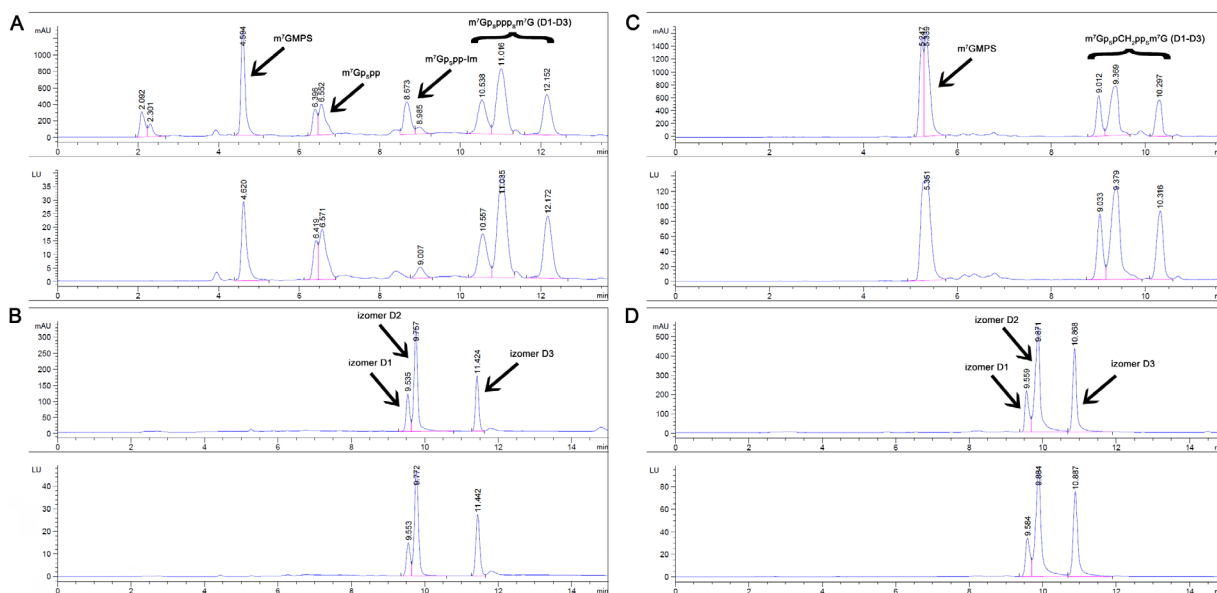
**Schemat 2.17.** Synteza  $m^7Gppppm^7G$  oraz jego analogów modyfikowanych w mostku fosforanowym.



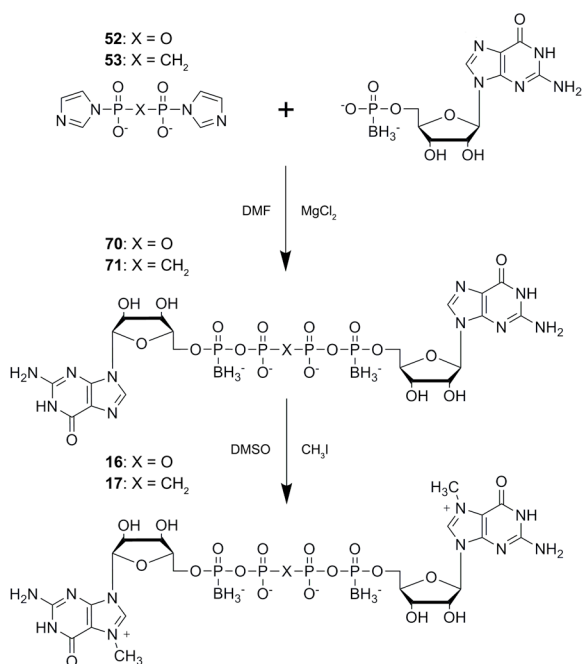
**Schemat 2.18.** Możliwa strategia syntezy tetrafosforanowych analogów ARCA z modyfikacjami w mostku fosforanowym.

Podobnie jak w poprzednich syntezach analogi tiofosforanowe sprzęgano w obecności  $ZnCl_2$  a analogi boranofosforanowe lub fosforanowe w obecności  $MgCl_2$  jako mediatorów reakcji. By minimalizować ilość produktów ubocznych podczas sprzęgania monofosforanów nukleozydów pochodne imidazolowe dodawano 3-4 krotnie, za każdym razem dodając 0.25 równoważnika pochodnej dopóki chromatogram HPLC nie wykazał konwersji do oczekiwanego produktu (**Rys. 2.6**). Ponieważ w czasie sprzęgania możliwa jest także częściowa

hydroliza bis(fosforoimidazolidów) oraz powstałych w wyniku reakcji imidazolidów nukleotydów to obserwuje się także powstawanie pewnych ilości trifosforanów nukleozydów jako produktów ubocznych (**Rys. 2.6A**). Wynika to z faktu, że jeżeli ma miejsce sprzężenie monofosforanu nukleozydu z difosforanem posiadającym tylko jedną grupę imidazolową to produktem jest nieaktywny trifosforan, który nie może ulec dalszemu sprzężeniu z kolejną cząsteczką monofosforanu.



**Rys. 2.6.** Profile HPLC dla wybranych reakcji sprzężenia monofosforanów  $m^7G$  z pochodnymi diimidazolowymi. **(A)** Sprzężenie  $m^7Gp_s$  z diimidazolową pochodną pirofosforanu ( $t = 48$  h). Z powodu dodania większej ilości imidazolidu ( $\sim 1$  equiv.) obserwuje się powstawanie izomerów  $m^7Gp_s,pp$  jako produktów ubocznych obok oczekiwanego produktu,  $m^7Gp_s,ppp,m^7G$ . **(B)** profil HPLC mieszaniny izomerów  $m^7Gp_s,ppp,m^7G$  uzyskanych po wydzieleniu związku z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej. **(C)** Sprzężenie  $m^7Gp_s$  z diimidazolową pochodną metylenobisfosfonianu ( $t = 48$  h). Mniejsza ilość dodanego imidazolidu ( $\sim 0.3$  equiv.) ogranicza powstawanie produktów ubocznych, by osiągnąć większą konwersję do  $m^7Gp_s,pp,CH_2,pp,m^7G$  należy do mieszaniny reakcyjnej dodać kolejną porcję pochodnej diimidazolowej. **(D)** profil HPLC mieszaniny izomerów  $m^7Gp_s,pp,CH_2,pp,m^7G$  uzyskanych po wydzieleniu związku z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej.



**Schemat 2.19.** Metoda syntezy związków **16** i **17** w oparciu o metylację dinukleotydu otrzymanego przez sprzężania  $GpBH_3$  z bisfosforoimidazolidami.

Ponieważ CH<sub>3</sub>I metyluje w pierwszej kolejności atom siarki w grupie tiofosforanowej to jedyną dostępną strategią syntezy tiofosforanowych analogów kapu **14** i **15** było wykorzystanie m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub> posiadającego grupę metylową w pozycji N7. Jednakże zarówno boranofosforanowe analogi **16**, **17** oraz m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G, **13** mogą powstać na drodze podwójnej metylacji tetrafosforanowego nukleotydu, odpowiednio Gp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pXpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G, (X = O lub CH<sub>2</sub>) lub GppppG. Ta alternatywna droga syntezy także została wzięta pod uwagę w przypadku związków **16** i **17** (Schemat 2.19). Pomimo, że sprzężanie **58** z imidazolidami było czasochłonne, wynosząc 25 h dla Gp<sub>BH<sub>3</sub></sub>ppp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G (**70**) oraz 150 h dla Gp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pCH<sub>2</sub>pp<sub>BH<sub>3</sub></sub>G (**71**), to charakteryzowało się dużą wydajnością (69-79%). Niestety zachodząca w następnym etapie syntezy metylacja nastroczała dużo problemów. Mimo, że wcześniejsze doświadczenia z takim podejściem wskazywały na pomyślny przebieg to metylacja związków **70** i **71** prowadziła do powstania mieszaniny mono- i dimetylowanych produktów oraz produktów ubocznych rozpadu substratu co znacznie utrudniło oczyszczenie produktów i doprowadziło do niezadowalających wydajności (14-24%). Z tego powodu zdecydowano się na syntezę z wykorzystaniem m<sup>7</sup>Gp<sub>BH<sub>3</sub></sub>, reakcje te były czasochłonne (~ 72h) ale zakończyły się powodzeniem (wydajności 48% dla **16** oraz 26% dla **17**, niższa wydajność dla drugiego związku wynikała z awarii kolektora frakcji a nie z gorszego przebiegu reakcji). Związek **13** został otrzymany z m<sup>7</sup>GMP oraz diimidazolowej pochodnej pirofosforanu z wydajnością 45% i żadna alternatywna droga syntezy nie była testowana.

**Tab. 2.4.** Substraty i produkty sprzężeń z imidazolidami, współczynniki absorpcji oraz wydajności fosforylacji dla 5'-5' dinukleotydu.

Produkt (No)	$\epsilon_{\lambda 260}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	P-nukleofil (No)	P-elektrofil (No)	Wydajność preparatywna [%]
GpppG ( <b>67</b> )	24000	GDP ( <b>23</b> )	GMP-Im ( <b>52</b> )	36
m <sup>7</sup> Gppppm <sup>7</sup> G ( <b>13</b> )	20000	m <sup>7</sup> GMP ( <b>64</b> )	Im-pp-Im ( <b>52</b> )	37
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G ( <b>14</b> )	20000	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ( <b>63</b> )	Im-pp-Im ( <b>52</b> )	48
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G ( <b>15</b> )	20000	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ( <b>63</b> )	Im-pCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>53</b> )	37
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ppp <sub>BH<sub>3</sub></sub> m <sup>7</sup> G ( <b>16</b> )	20000	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ( <b>59</b> )	Im-pp-Im ( <b>52</b> )	48
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH<sub>3</sub></sub> m <sup>7</sup> G ( <b>17</b> )	20000	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ( <b>59</b> )	Im-pCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>53</b> )	26
Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ppp <sub>BH<sub>3</sub></sub> G	24000	Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ( <b>58</b> )	Im-pp-Im ( <b>52</b> )	69
Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH<sub>3</sub></sub> G	24000	Gp <sub>BH<sub>3</sub></sub> ( <b>58</b> )	Im-pCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>53</b> )	79

### 2.2.3.5. Analogi kapu znakowane fluorescencyjnie

#### 2.2.3.5.1. Wybór znacznika fluorescencyjnego

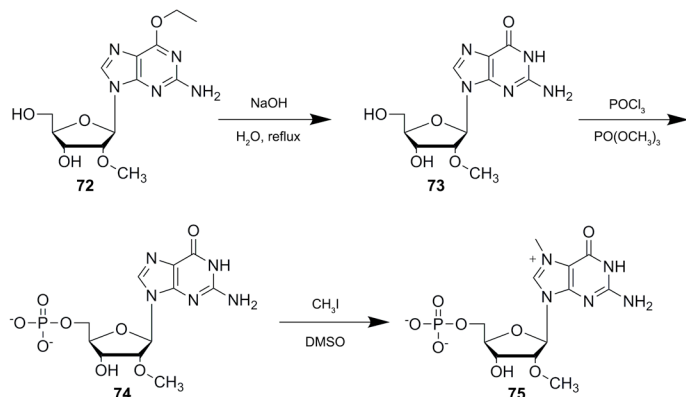
Z uwagi na to, że techniki fluorescencyjne pozwalają na badanie szerokiej gamy procesów w rozmaitych układach biologicznych w ramach projektu doktoranckiego podjęto się syntezy analogów kapu posiadających znaczniki fluorescencyjne. Z uwagi na niewielką zawadę steryczną, fotostabilność i pożądane właściwości fizykochemiczne zdecydowano się na otrzymanie analogów kapu znakowanych grupą antranoilową lub mantranoilową (metylo-N-antranoilową). Na podstawie wcześniejszych badań opisanych dokładniej w części literaturowej istnieje szereg przesłanek dla których związki mogą być przydatne do badań nad białkami odpowiedzialnymi za usuwanie struktury kapu. (i) Stosunkowo silna fluorescencja, której intensywność jest niezmienna w szerokim zakresie pH. (ii) Nieduży rozmiar, dzięki czemu ryzyko zaburzenia naturalnego mechanizmu oddziaływania kap-białko jest znacznie zredukowane. (iii) Zależność intensywności fluorescencji od polarności otoczenia, co pozwala na monitorowanie wiązania się znakowanego kapu do hydrofobowej kieszeni w badanym białku. (iv) Znaczna fotostabilność zapewniająca stabilny i niezmienny sygnał w funkcji czasu.

### 2.2.3.5.2. Cel syntezy

Przeprowadzono syntezę pięciu trifosforanowych dinukleotydujących analogów kapu zawierających znacznik fluorescencyjny (Ant lub Mant, **Schemat 2.22 & 2.23**). Dwa z tych związków (**18 i 19**) są pochodnymi kanonicznego dinukleotydu, m<sup>7</sup>GpppG, który nie zawiera żadnych modyfikacji chemicznych, podczas gdy dwa inne (**20 i 21**) posiadają jeden z mostkowych atomów tlenu zastąpiony przez grupę metylenową. Związek **22** posiada dodatkową grupę 2'-*O*-metylową w pierścieniu m<sup>7</sup>G, co blokuje izomeryzację prowadząc do zdefiniowanej pozycji znacznika Ant w obrębie pierścienia cukrowego. Podczas syntezy związków **18-22** dwie reakcje odgrywają kluczowe znaczenie: dołączenie znacznika oraz katalizowane ZnCl<sub>2</sub> sprzężanie znakowanego nukleotydu z pochodną imidazolową drugiego nukleotydu pozwalające na uformowanie mostka 5'-5' fosforanowego.

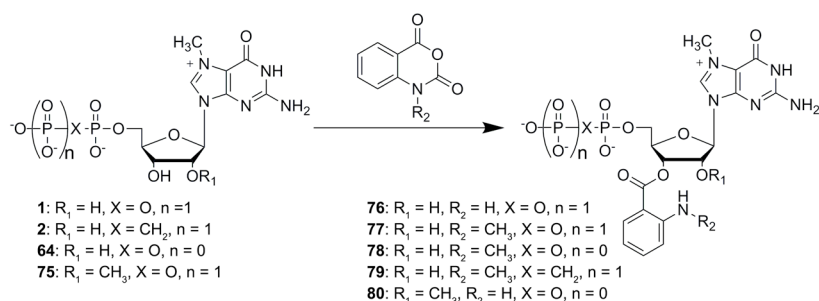
### 2.2.3.5.3. Wprowadzanie znacznika fluorescencyjnego

Synteza znakowanych substratów **76-80** jest przedstawiona na **Schemacie 2.21**. Za wyjątkiem m<sub>2</sub><sup>7,2'-*O*</sup>-GMP (**75**) synteza innych substratów do znakowania fluorescencyjnego została opisana wcześniej. Związek **75** został uzyskany z dostępną w laboratorium 6-*O*-etylo-m<sup>2</sup>-*O*-guanozyny (**72**) w sekwencji kilku reakcji (**Schemat 2.20**).



**Schemat 2.20.** Synteza m<sub>2</sub><sup>7,2'-*O*</sup>-GMP.

Po usunięciu grupy etylowej związek **73** oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej a następnie poddano fosforylacji Yoshikawy i metylacji w pozycji N7 guanozyny. Do przyłączenia znacznika wykorzystano procedurę podobną do stosowanej wcześniej przy syntezie antranoilo-m<sup>7</sup>GTP<sup>592</sup> oraz tetrafosforanów *N*-metyloantranoilo-diadenozyny<sup>678</sup>, jednakże do tej metody wprowadzono kilka modyfikacji, opisanych w dalszej części tekstu. W pierwszym podejściu nukleotydy zawierające 7-metyloguanozynę (mono- lub difosforany) rozpuszczono w roztworze wodnym o pH 9,5 i dodano nadmiar bezwodnika kwasowego Ant lub Mant. Do badania przebiegu reakcji wykorzystano RP HPLC, przykładowo gdy m<sup>7</sup>GDP zostało poddane znakowaniu z użyciem bezwodnika Ant, to pomiar HPLC wykazał powstawanie obydwu spodziewanych regioizomerów Ant-m<sup>7</sup>GDP. Jednakże wraz z upływem czasu obserwowano powstawanie kolejnego związku, mającego znacznie dłuższy czas retencji niż oczekiwane produkty. Badanie za pomocą MS wykazało, że związek ten stanowił 2',3'-diAnt-m<sup>7</sup>GDP, będący podwójnie znakowanym nukleotydem, gdzie prawdopodobnie obydwie grupy hydroksylowe w pierścieniu rybozy uległy podstawieniu. Analogiczny produkt uboczny obserwowano przy syntezie Mant-m<sup>7</sup>GDP, jednak szybkość jego powstawania była około 2 razy niższa niż dla diAnt-m<sup>7</sup>GDP. W celu uniknięcia powstawania znaczących ilości wspomnianych produktów ubocznych użyto około równomolowej ilości bezwodnika względem nukleotydu dodawanego w małych porcjach (~0,2 equiv.) w przeciągu kilku godzin. W tych warunkach jedynie niewielka ilość (ok. 10%) substratu ulegała podwójnemu podstawieniu. Z uwagi na zablokowanie pozycji 2' przez grupę metylową w substracie **75** podwójnie podstawiony produkt nie powstaje. Pozwoliło to na dodanie 1.5 równoważnika bezwodnika kwasowego w jednej porcji skracając jednocześnie czas syntezy. Do oczyszczenia otrzymywanych związków **76-80** wykorzystano chromatografię jonowymienną, jednakże procedura ta powoduje częściowy rozkład produktów do nieznakowanych substratów i wolnego kwasu (M)Ant podczas odparowywania buforu TEAB pod zmniejszonym ciśnieniem w temp ok 30 °C. Co więcej, znakowane nukleotydy wykazują tendencję do powolnego rozkładu, nawet jeżeli są przechowywane w niskiej temperaturze.

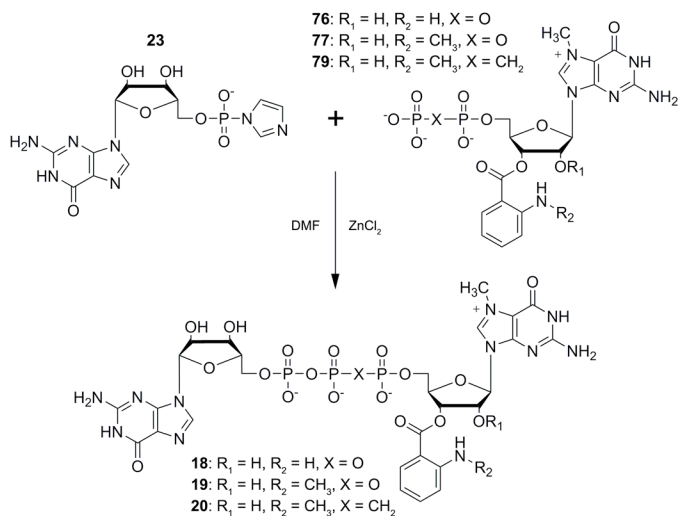


**Schemat 2.21.** Wprowadzanie grupy (M)Ant do nukleotydów.

By zminimalizować straty w wydajności nukleotydy **76-80** były wykorzystywane do sprzężenia natychmiastowo po oczyszczeniu. Natomiast w celu uzyskania tych związków w czystej i stabilnej postaci do pomiarów NMR wykorzystany został inny sposób oczyszczania – chromatografia wykluczania (sączenie molekularne) na żelu G-15. Dzięki różnicy w promieniach hydrodynamicznych substratu i produktów metoda ta pozwoliła na uzyskanie czystych soli sodowych wspomnianych związków. Niestety dużym minusem takiego podejścia jest niemożliwość wykorzystania soli sodowych substratów w dalszych etapach syntezy. Są one bowiem prawie całkowicie nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach stosowanych w reakcjach sprzężenia nukleotydów.

#### 2.2.3.5.4. Synteza znakowanych dinukleotydów

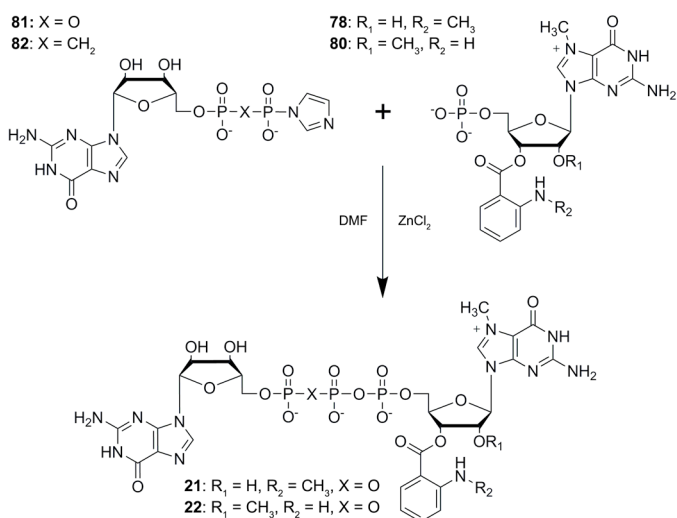
Do otrzymania dinukleotydowych analogów kapu wykorzystano opisaną wcześniej reakcję sprzężenia.<sup>513</sup> Jeden nukleotyd został przekształcony do aktywnej pochodnej *P*-imidazolowej natomiast drugi odgrywał rolę czynnika nukleofilowego pozwalającego na powstanie wiązania pirofosforanowego. W ogólności możliwe są trzy różne podejścia do utworzenia mostka trifosforanowego. Pierwsze (i) zakłada aktywację monofosforanu nukleotydu i sprzężenie ze znakowanym fluorescencyjnie difosforanem (lub metylenobisfosfonianem) 7-metyloguanozyny (**Schemat 2.22**). Drugie (ii) podejście zakłada aktywację m<sup>7</sup>GDP lub jego analogu fosfonianowego i sprzężenie ze znakowanym fluorescencyjnie monofosforanem (**Schemat 2.23**). Trzecie, teoretycznie możliwe podejście opiera się na aktywacji znakowanego fluorescencyjnie związku jednakże z uwagi na wrażliwość chemiczną użytych znaczników zostało uznane za mało obiecujące i nie zostało zastosowane.



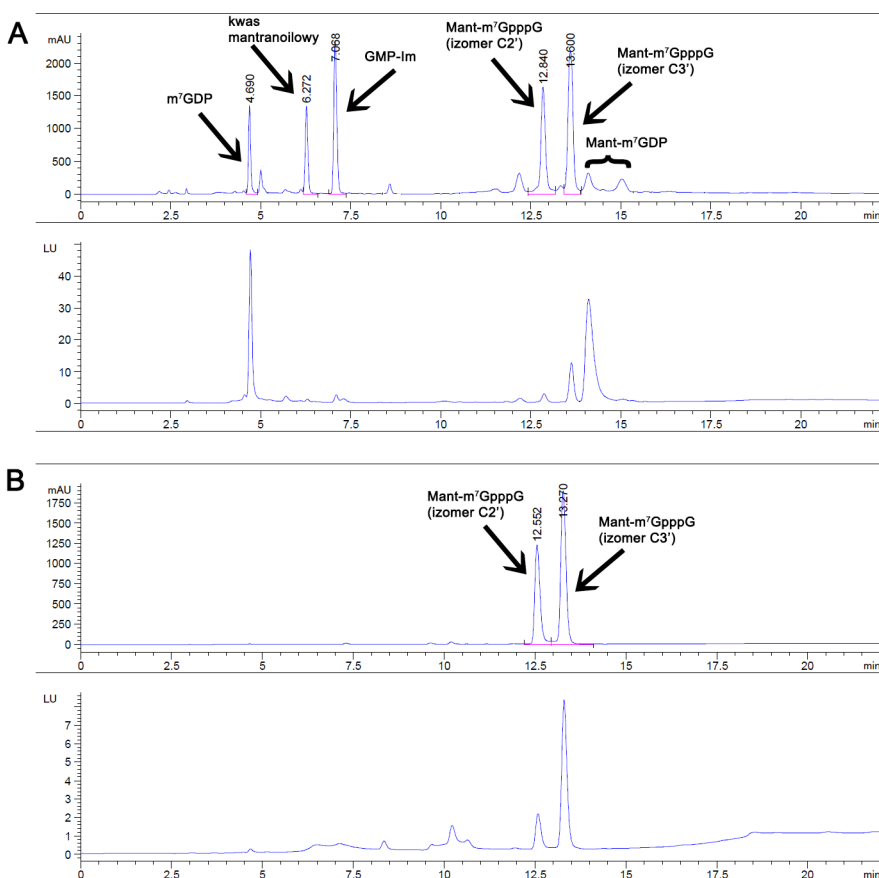
**Schemat 2.22.** Synteza związków **18-20** z użyciem GMP-Im.

Pierwsze z wymienionych podejść zostało zaaplikowane do syntezy związków **18-19**. Otrzymano je wychodząc od aktywowanego GMP (GMP-Im) i odpowiednio Ant-m<sup>7</sup>GDP lub Mant-m<sup>7</sup>GDP. W obydwu przypadkach stopień konwersji do produktów był wysoki: 92% dla Ant-m<sup>7</sup>GDP oraz 81% dla Mant-m<sup>7</sup>GDP (**Rys. 2.7**). Podobna strategia syntetyczna została wykorzystana do otrzymania związku **20**, posiadającego mostek metylenowy w pozycji

$\beta/\gamma$ , gdzie Mant- $m^7$ GpCH<sub>2</sub>p (**79**) został sprzęgnięty z **15**. Końcowa wydajność po dwóch etapach oczyszczania (chromatografia jonowymienna i półpreparatywnego RP HPLC) wyniosła 8%, czego przyczyną były duże straty na etapie HPLC.



**Schemat 2.23.** Synteza związków **21** i **22** z użyciem GDP-Im lub GpCH<sub>2</sub>p-Im.



**Rys. 2.7.** Profil HPLC dla reakcji sprzęgania Mant- $m^7$ GDP z GMP-Im. **(A)** Reakcja sprzęgania ( $t = 45$  min). Dodano niewielki nadmiar pochodnej imidazolowej względem nukleotydu. Widoczne są jeszcze sygnały pochodzące od substratów jak i od  $m^7$ GMP i kwasu mantranoilowego, które powstają na skutek rozkładu Mant- $m^7$ GDP. Związek ten (w postaci soli TEA uzyskanej po chromatografii jonowymiennej) jest stosunkowo niestabilny i powinien być szybko użyty do reakcji sprzęgania. **(B)** Profil Mant- $m^7$ GpppG po chromatografii jonowymiennej. Widoczne są piki pochodzące od obydwu regioizomerów. 5'-5' dinukleotydy znakowane grupami (M)Ant są znacznie stabilniejsze od mononukleotydów.



Związek **21**, posiadający mostek metylenowy w pozycji  $\alpha/\beta$  otrzymano przy wykorzystaniu strategii (ii) sprzęgając Mant- $m^7$ GMP (**78**) z GpCH<sub>2</sub>p-Im (**82**) co zostało zilustrowane na **Schemacie 2.23**. Pochodną imidazolową **82** przygotowano z guanozyny, którą przekształcono do GpCH<sub>2</sub>p za pomocą reakcji fosfonylacji z wykorzystaniem dichlorku metylenobisfosfonianu. Z tak powstałego nukleotydu uzyskano **82**. Pomiary MS wykazały, że związek ten był w niewielkim stopniu zanieczyszczony przez metylenobisfosfonian, który jest bardzo trudny do usunięcia i zwykle ulega ko-elucji podczas chromatografii jonowymiennej. Bezpośrednim skutkiem jego obecności było powstanie pewnych ilości imidazolidu bisfosfonianu w reakcji imidazolowania. Obecność tego zanieczyszczenia w reakcji sprzęgania **78** z **82** spowodowała pogorszeniem wydajności na skutek tworzenia się produktów ubocznych takich jak Mant- $m^7$ GppCH<sub>2</sub>p lub Mant- $m^7$ GppCH<sub>2</sub>ppm<sup>7</sup>G-Mant. Jednak pomimo tych utrudnień, po dwóch etapach oczyszczania związek **21** został uzyskany z końcową wydajnością 12%.

Związek **22** został otrzymany przez sprzęganie Ant- $m_2^{7,2'-O}$ -GMP z imidazolową pochodną GDP (**81**), którą uzyskano z GDP analogicznie do innych pochodnych imidazolowych, oraz uprzednio otrzymanym znakowanym nukleotydem **80**. Końcowa wydajność sprzęgania dla związku **22** wyniosła 26%.

Zarówno pomiary przy użyciu HPLC jak i NMR wykazały, że związki **18-21** występują jako mieszanina dwóch regioizomerów (znacznik w pozycji 2' lub 3' pierścienia cukrowego) w równowadze dynamicznej, co jest zgodne z danymi literaturowymi dla innych nukleotydu znakowanych przy użyciu (M)Ant.<sup>167, 169</sup> Substraty, produkty, stopnie konwersji HPLC oraz wydajności preparatywne dla związków **18-22** zostały podsumowane w **Tab. 2.4**.

**Tab. 2.4.** Substraty i produkty sprzęgań, współczynniki absorpcji oraz wydajności dla związków **18-22**.

Produkt (No)	$\epsilon_{\lambda,260}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	P-nukleofil (No)	P-elektrofil (No)	Konwersja HPLC [%]	Wydajność <sup>a,b</sup> [%]
Ant- $m^7$ GpppG ( <b>18</b> )	21700	Ant- $m^7$ GDP ( <b>76</b> )	GMP-Im ( <b>23</b> )	92	39/34
Mant- $m^7$ GpppG ( <b>19</b> )	26800	Mant- $m^7$ GDP ( <b>77</b> )	GMP-Im ( <b>23</b> )	81	36/17
Mant- $m^7$ GpCH <sub>2</sub> ppG ( <b>20</b> )	26400	Mant- $m^7$ GMP ( <b>78</b> )	GMP-Im ( <b>23</b> )	63	36/12
Mant- $m^7$ GpoCH <sub>2</sub> pG ( <b>21</b> )	24000	Mant- $m^7$ GpCH <sub>2</sub> p ( <b>79</b> )	GpCH <sub>2</sub> p-Im ( <b>82</b> )	72	23/8
Ant- $m_2^{7,2'-O}$ GpppG ( <b>22</b> )	21600	Ant- $m_2^{7,2'-O}$ GMP ( <b>80</b> )	GDP-Im ( <b>81</b> )	95	83/26

<sup>a</sup>wydajność preparatywna

<sup>b</sup>wydajność po dodatkowym oczyszczaniu na RP HPLC

## 2.3. Właściwości fizykochemiczne i biochemiczne

### 2.3.1. Podstawowa charakterystyka fizykochemiczna

#### 2.3.1.1. Stabilność chemiczna na zmiany pH

7-metyloguanozyna jest podatna na degradację w alkalicznym pH, jednakże nukleotydy wykazują większą odporność na degradację niż 7-metyloguanozyna.<sup>679</sup> Przykładowo kilkugodzinna ekspozycja na pH 9,5 lub wyższe w przypadku takich reakcji jak usuwanie grupy CE z terminalnego fosforanu lub znakowanie grupą (M)Ant w pierścieniu rybozy nie prowadziła do zauważalnego rozkładu związków. Ekspozycja na niskie pH (4,0 lub niższe) podczas reakcji takich jak metylacja w pozycji N7 przy użyciu siarczanu dimetylu także nie miała negatywnego wpływu na zasadę azotową. Wynika stąd, że wprowadzenie modyfikacji chemicznych do łańcucha fosforanowego nie miało znaczącego wpływu na stabilność pierścienia 7-metyloguanozyny.

Niemodyfikowany łańcuch fosforanowy jest stabilny w szerokim zakresie pH oraz temperatury. Obecność modyfikacji takich jak grupa tiofosforanowa lub metylenobisfosfonianowa nie wpływa negatywnie na stabilność łańcucha fosforanowego. Podobna sytuacja zachodzi dla grupy imidodofosforanowej w pozycji  $\alpha/\beta$  łańcucha. Jedynie grupa boranofosforanowa jest bardziej wrażliwa na zmiany pH niż wspomniane wcześniej modyfikacje. Dlatego też sprawdzono stabilność wybranych boranofosforanowych analogów kapu. W oparciu o dane literaturowe na temat stabilności boranofosforanowych analogów kapu oczekiwano, że analogi  $m^7$ GTP **9**, **10** oraz **66** będą stabilne w zakresie pH 3,0 – 9,0 w temperaturze pokojowej.<sup>33</sup> Nie zaobserwowano śladów rozpadu dla związków

9 i 10 zarówno w roztworze wodnym w podanych zakresach pH jak i pod postacią ciała stałego.

Jednakże zarówno m<sup>7</sup>GppNHp oraz obydwie diastereoizomery **66** wykazywały tendencję do rozpadu w obrębie łańcucha fosforanowego zarówno w kwaśnym, obojętnym jak i zasadowym środowisku. Całkowity rozpad związku **66** w buforze glicynowym (pH = 2,2) zachodził w ciągu 16 godzin. Co więcej w buforze fosforanowym o pH 7,0 lub buforze boranowym o pH 8,5 znacząca frakcja (~50%) uległa degradacji w przeciągu kilku godzin. Podobne obserwacje poczyniono dla m<sup>7</sup>GppNHp. Związki te rozpadały się do mieszaniny difosforanów m<sup>7</sup>Guo, co istotne obecność grupy imidowej w pozycji α/β nie prowadzi do destabilizacji łańcucha fosforanowego.<sup>486</sup> Ponadto dinukleotydy analogi kapu zawierające modyfikacje imidodifosforanową są stabilne w opisywanych warunkach.

Prawdopodobną przyczyną dla której udało się oczyścić chromatograficznie związek **66** oraz m<sup>7</sup>GppNHp był fakt, że procedury te przeprowadzane są w niskiej temperaturze (poniżej 10 °C) co mogło spowolnić rozpad łańcucha fosforanowego. Z powodu opisanej niestabilności trifosforanów m<sup>7</sup>Guo zawierających grupę amidową w pozycji β/γ nie było możliwe przeprowadzenie żadnych badań biochemicznych i biofizycznych z udziałem tych związków. Znaczniki fluorescencyjne (Mant lub Ant) są stabilne w szerokim zakresie pH ale dłuższa ekspozycja na zasadowe lub kwasowe środowisko może prowadzić do utraty znacznika. Taka sytuacja została zaobserwowana w przypadku odparowywania buforu TEAB po chromatografii jonowymiennej (pH zasadowe) lub podczas liofilizacji po chromatografii RP HPLC (pH kwaśne). W takich przypadkach mononukleotydy były dużo bardziej podatne na utratę znacznika, czego nie zaobserwowano w przypadku dinukleotydy.

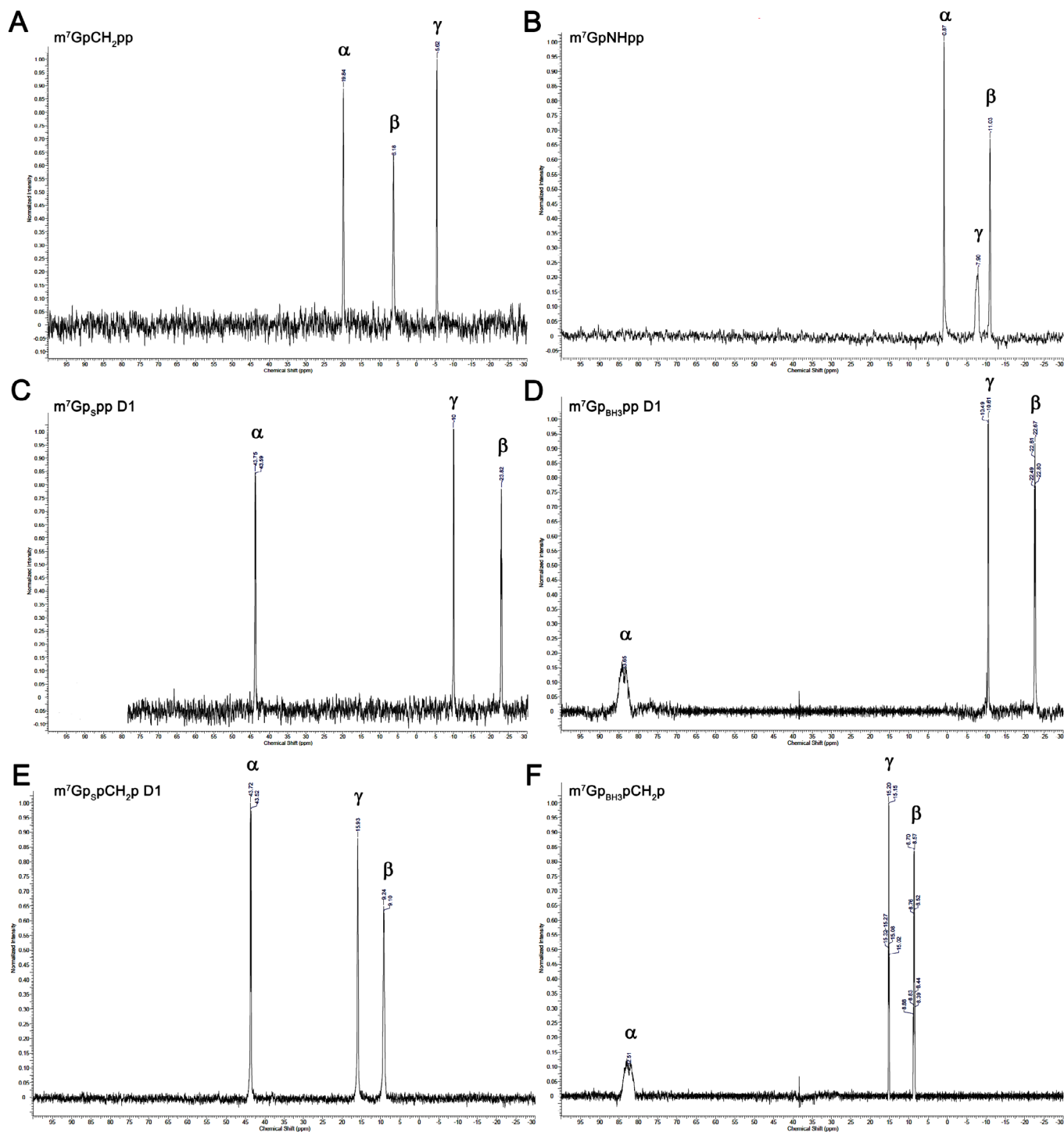
### 2.3.1.2. Spektroskopia NMR

#### 2.3.1.2.1. Analogi m<sup>7</sup>GTP oraz m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G.

Analizowano widma <sup>1</sup>H NMR oraz <sup>31</sup>P analogów m<sup>7</sup>TP oraz m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G posiadających modyfikacje w łańcuchu fosforanowym. Wprowadzenie modyfikacji do łańcucha fosforanowego ma nieznaczny wpływ na widma <sup>1</sup>H NMR, dlatego widma te nie będą tutaj dyskutowane, za wyjątkiem ich roli w ustalaniu stereochemii łańcucha fosforanowego (patrz rozdział *Stereochemia*). Duże większe zmiany są obserwowane natomiast w widmach <sup>31</sup>P NMR, które też dostarczają istotnych informacji pozwalających na potwierdzenie struktury związków jak i ocenę ewentualnego stopnia zanieczyszczenia innymi nukleotydami lub fosforanami nieorganicznymi. Duże znaczenie na zmianę przesunięcia chemicznego ma obecność modyfikacji w łańcuchu fosforanowym takich jak grupa metylenobisfosfonianowa, tiofosforanowa lub boranofosforanowa (**Rys. 2.8**). Przykładowo sygnał dla grupy tiofosforanowej jest obserwowany przy +40-50 ppm, a dla grupy boranofosforanowej przy +80-90 ppm. Przesunięcie chemiczne poszczególnych jąder fosforu zależy także od ich położenia w łańcuchu fosforanowym, jednakże dla dinukleotydy analogów kapu często obserwuje się nachodzenie na siebie dwóch sygnałów (pozycje β i γ w tetrafosforanach, takich jak związki **13-17**).

Sygnał od grupy boranofosforanowej dla wszystkich otrzymanych związków cechuje się silnym przesunięciem w dół pola. Jest to spowodowane niedużą polaryzowalnością grupy BH<sub>3</sub> i związaną z tym niezdolnością do indukowania silnego pola magnetycznego. Co więcej brak wiązania zwrotnego (ang. *back-bonding*) pomiędzy grupą BH<sub>3</sub> a atomem fosforu dodatkowo zwiększa jego przesunięcie chemiczne. Dla uzyskanych widm <sup>31</sup>P NMR analiza struktury subtelnej była utrudniona na skutek obecności pobliskich jąder (Pβ, H5', H5'') oddziałujących z jądrem fosforu. Dodatkowo związki **10** oraz **17** posiadają grupę metylenobisfosfonianową, która zawiera dwa protony sprzęgające się z jądrami fosforu co dodatkowo komplikuje ich interpretację. Dlatego też (poza kilkoma wyjątkami) nie udało się wyznaczyć dokładnych wartości stałych sprzężeń w widmie <sup>31</sup>P NMR.<sup>19</sup>

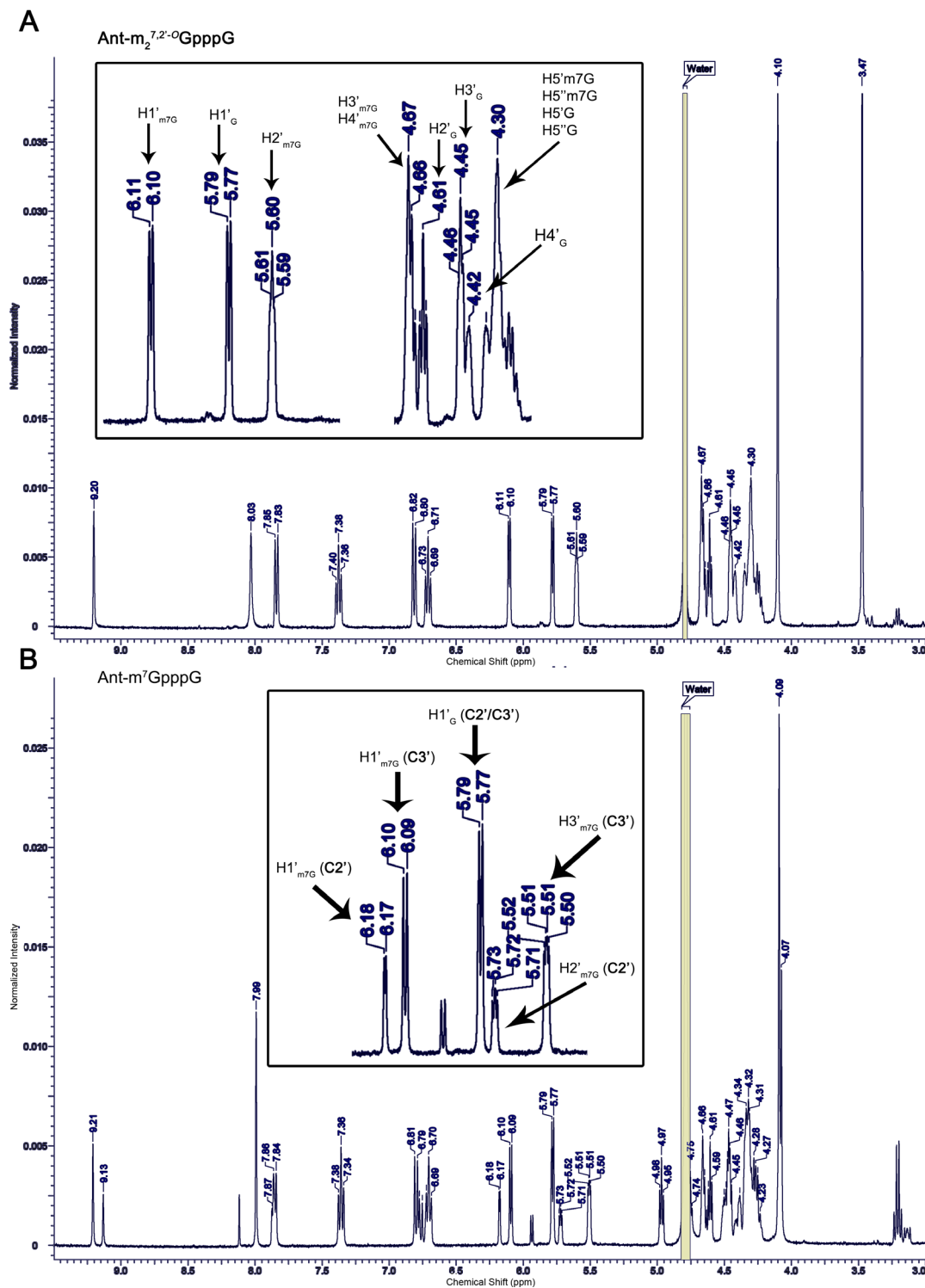
Silne przesunięcie chemiczne jądra <sup>31</sup>P w grupie tiofosforanowej wywołane jest przez efekt indukcyjny atomu siarki natomiast efekt odsłaniający grupy metylenobisfosfonianowej wynika z braku tworzenia się wiązania zwrotnego pomiędzy atomem węgla a atomami fosforu. Co więcej, po wprowadzeniu dodatkowej obecności grupy metylenobisfosfonianowej obserwuje się jej synergistyczny wpływ na przesunięcie chemiczne w dół pola dla jąder <sup>31</sup>P bezpośrednio połączonych z atomem węgla.<sup>588</sup> Znając takie empiryczne zależności w większości przykładów możliwe jest ustalenie budowy łańcucha fosforanowego oraz położenia w nim modyfikacji.



**Rys. 2.8.** Widma  $^{31}P$  NMR szeregu trifosforanów  $m^7Guo$  mających modyfikacje w łańcuchu fosforanowym. (A)  $m^7GpCH_2pp$  (7), (B)  $m^7GpNHpp$  (8), (C)  $m^7Gp_spp$  D1 (11), (D),  $m^7Gp_{BH_3}pp$  D1 (9), (E)  $m^7Gp_s pCH_2p$  (12), (F)  $m^7Gp_{BH_3} pCH_2p$  (10).

### 2.3.1.2.2. Znakowane fluorescencyjnie analogi kapu

Fakt, że znakowane fluorescencyjnie związki **18-21** istnieją jako mieszanina równowagowa regioizomerów 2' i 3' (nazwanych tutaj odpowiednio izomerami C2' oraz C3') w zależności od położenia grupy (M)Ant znajduje odzwierciedlenie w ich widmach  $^1\text{H}$  NMR (Rys. 2.9).



**Rys. 2.9.** Przykładowe widma  $^1\text{H}$  NMR analogów kapu znakowanych grupą Ant; (A) Ant- $m_2^{7,2'-O}$ GpppG, Ant- $m^7$ GpppG (B). Pierwszy z wymienionych związków posiada znacznik jedynie w pozycji 3' przez co na widmie  $^1\text{H}$  NMR obecne są sygnały pochodzące od izomeru C3'. Natomiast widmo drugiego ze związków składa się z nachodzących na siebie widm regioizomerów C2' i C3'. Ponieważ niektóre z sygnałów posiadają inne przesunięcie w zależności od rodzaju izomeru (B, wyszczególniony fragment) to na podstawie porównań intensywności sygnałów można wyznaczyć stosunek molowy obydwu regioizomerów.

Ponieważ pewne protony wykazują zmiany położenia chemicznego w zależności od tego czy przynależą do regioizomeru 2' lub 3' to możliwe było wyznaczenie stosunku obydwu regioizomerów poprzez analizę widm <sup>1</sup>H NMR mieszanin równowagowych i używając widma NMR stabilnego konfiguracyjnie związku **22** jako punktu odniesienia. W przypadku Ant-m<sup>7</sup>GpppG zawartość izomerów 2' i 3' wynosiła odpowiednio 32 ± 1% i 68 ± 1%. Podobna ma miejsce dla Mant-m<sup>7</sup>GpppG, gdzie ich zawartość wyniosła 42 ± 1% i 58 ± 1% (**Tab. 2.5**). Dane literaturowe potwierdzają podobne zależności dla innych nukleotydów znakowanych (M)Ant.<sup>167, 680</sup>

**Tab. 2.5.** Stosunek intensywności wybranych sygnałów <sup>1</sup>H NMR dla analogów kapu **18-19**.

Proton	Ant-m <sup>7</sup> GpppG (1)		Mant-m <sup>7</sup> GpppG (2)	
	2' izomer (%)	3' izomer (%)	2' izomer (%)	3' izomer (%)
N8	31,6	68,4	42,7	57,3
H1' (m <sup>7</sup> G)	32,1	67,9	42,9	57,1
H2'/H3' (m <sup>7</sup> G)	33,1	66,9	40,9	59,1
N-CH <sub>3</sub>	31,7	68,3	-	-
H3 (Ant)	32,6	67,4	-	-
H5 (Mant)	-	-	44,1	55,9
H6 (Mant)	-	-	43,1	56,9
N-CH <sub>3</sub> (Mant)	-	-	41,1	58,9

**Tab. 2.6.** Równowagi izomeryczne i konformacyjne dla wybranych związków znakowanych (M)Ant.

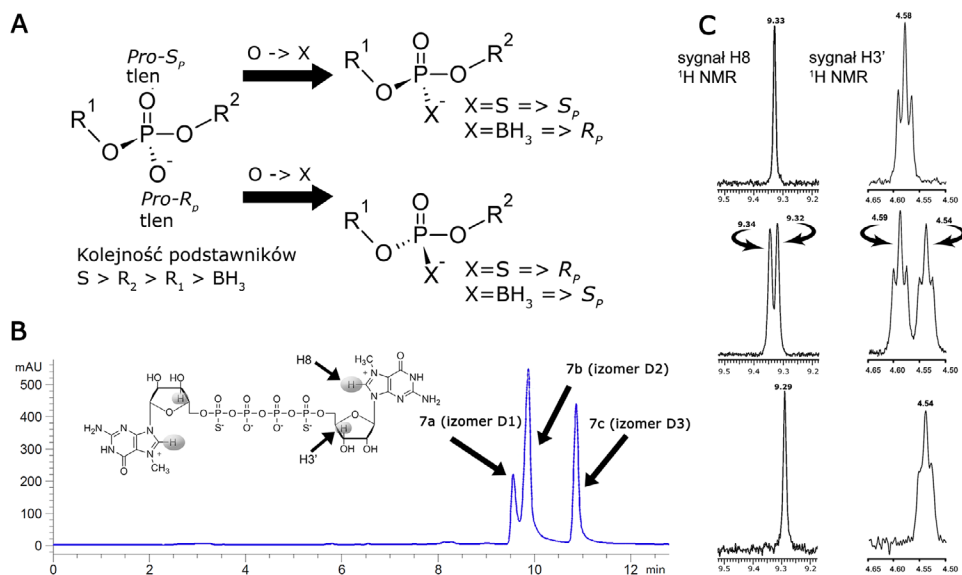
Związek	Stałe sprzężenia	Równowaga regioizomerów	udział konformacji N	Udział czynników wykładniczych z pomiarów czasu życia fluorescencji
Ant-m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GpppG ( <b>22</b> )	$J_{H1-H2} = 5,5$ $J_{H2-H3} = 3,2$ $J_{H3-H4} = 3,2$	3' izomer = 100%	41 %	$\alpha = 36,89\%$ $\alpha = 63,11\%$ (pH 5) $\alpha_1^1 = 39,03\%$ $\alpha_2^2 = 60,97\%$ (pH 9)
Ant-m <sup>7</sup> GpppG ( <b>18</b> )	$J_{H1-H2(3')} = 6,0$ $J_{H1-H2(2')} = 5,1$ $J_{H2-H3(3')} = 3,0$ $J_{H2-H3(2')} = 4,5$	2' izomer = 32% 3' izomer = 68%	2' izomer: 62% 3' izomer: 35% całkowita: 44%	$\alpha = 31,81\%$ $\alpha = 68,19\%$ (pH 5) $\alpha_1^1 = 31,72\%$ $\alpha_2^2 = 68,28\%$ (pH 9)
Mant-m <sup>7</sup> GpppG ( <b>19</b> )	$J_{H1-H2(3')} = 5,7$ $J_{H1-H2(2')} = 5,2$ $J_{H2-H3(3')} = 2,7$ $J_{H2-H3(2')} = 5,1$ $J_{H3-H4(2')} = 5,0$	2' izomer = 42% 3' izomer = 58%	2' izomer: 71% 3' izomer: 39% całkowita: 52%	$\alpha = 40,50\%$ $\alpha = 59,50\%$ (pH 5) $\alpha_1^1 = 44,98\%$ $\alpha_2^2 = 55,02\%$ (pH 9)
Ant-m <sup>7</sup> GDP ( <b>76</b> )	$J_{H1-H2(3')} = 5,6$ $J_{H1-H2(2')} = 1,8$ $J_{H2-H3(2')} = 5,9$	2' izomer = 52% 3' izomer = 48%	2' izomer: 81% 3' izomer: 40% całkowita: 61%	n. d
Ant-m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GMP ( <b>80</b> )	$J_{H1-H2} = 5,5$ $J_{H2-H3} = 2,7$ $J_{H3-H4} = 4,5$	3' izomer = 100%	40%	n. d
Mant-m <sup>7</sup> GMP ( <b>78</b> )	$J_{H1-H2(3')} = 5,6$ $J_{H1-H2(2')} = 4,8$ $J_{H2-H3(3')} = 3,0$ $J_{H2-H3(2')} = 4,2$ $J_{H3-H4(2')} = 5,0$	2' izomer = 42% 3' izomer = 58%	2' izomer: 55% 3' izomer: 40% całkowita: 46%	n. d

Oznacza to, że oddziaływania warstwowe pomiędzy pierścieniami aromatycznymi G i m<sup>7</sup>G w dinukleotydocowych analogach kapu mają minimalne znaczenie na udział poszczególnych regioizomerów w mieszaninie. Stosunek poszczególnych czasów fluorescencji jest podobny do wyznaczonego stosunku regioizomerów co mogłoby

sugerować, że krótki i długi komponent czasu fluorescencji są przypisane poszczególnym regioizomerom. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że związek **22** posiadający zdefiniowaną pozycję znacznika w pierścieniu także wykazuje dwa różne wkłady w czas życia fluorescencji (**Tab. 2.6**). Dlatego też bardziej prawdopodobne jest to, że obserwowane czasy życia wywodzą się z różnych konformacji pierścienia cukrowego w reszcie 7-metyloguanozyny. Dlatego też dokonano prostej analizy konformacyjnej pierścienia rybozy w analogu **22** by określić populację dwóch preferowanych konformacji N i S. Udział poszczególnych konformacji został wyznaczony na podstawie wyznaczonych doświadczalnie wycylnych stałych sprzężenia  $^3J_{\text{H,H}}$  dla protonów w pierścieniu cukrowym używając wcześniej opisanych równań empirycznych.<sup>524, 525</sup> Na tej podstawie wyznaczono, że procentowe udziały konformacji N i S wyniosły odpowiednio 37% i 63%. Wyniki te dość dobrze korelują z rozkładem czasów fluorescencji dla tego związku (**Tab. 2.6**) i sugerują, że dla związków istniejących w równowadze regioizomerycznej obserwowana empirycznie dystrybucja czasów życia fluorescencji może wywodzić się z kombinacji różnych stanów konformacyjnych pierścienia cukrowego oraz regioizomerii. Jednakże bez wykonania dodatkowych badań biofizycznych i obliczeń kwantowo-mechanicznych nie jest możliwe jednoznaczne rozstrzygnięcie tej kwestii.

### 2.3.1.3. Stereochemia

Jak wspomniano wcześniej analogi kapu zawierające ugrupowania tiofosforanowe lub boranofosforanowe występują zazwyczaj jako mieszanina co najmniej dwóch *P*-diastereoizomerów (poza sytuacją w której molekula posiada dwa identyczne podstawniki w zmodyfikowanym fosforanie). Związki **9-12** istnieją jako mieszanina dwóch diastereoizomerów a związki **14-17** trzech diastereoizomerów. Izomery zostały nazwane *Di*, gdzie numer *i* oznacza kolejność elucji z kolumny RP na HPLC. Przykładowo związek **9** ( $\text{m}^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{pp}$ ) posiada jedno centrum stereogeniczne w łańcuchu fosforanowym i występuje jako mieszanina dwóch diastereoizomerów D1 oraz D2. Bez dokładnych danych strukturalnych przypisywanie konfiguracji absolutnej modyfikowanych nukleotydów *de novo* jest możliwe jedynie poprzez wykorzystanie fosfatyzacji o dobrze poznanej specyficzności substratowej, jednak nawet wtedy zalecane jest wykonanie dodatkowych badań biofizycznych (krystalografia, spektroskopia NMR) celem potwierdzenia przypisanej konfiguracji (patrz *Część literaturowa*).



**Rys. 2.10.** Stereochemia mostka fosforanowego. **(A)** Stereochemia atomu fosforu w grupie tiofosforanowej i boranofosforanowej. Podstawienie atomu tlenu zarówno przez atom siarki jak i grupę boranową prowadzi do *P*-diastereoizomerii. Taka sama konfiguracja przestrzenna dla centrum stereogenicznego w grupie tio- lub boranofosforanowej prowadzi do przypisania odmiennej konfiguracji absolutnej ( $S_p$  lub  $R_p$ ) co jest wywołane inną kolejnością pierwszeństwa podstawników S i  $\text{BH}_3$  (nawiązując do reguł CIP). **(B)** Reprezentatywny chromatogram HPLC związków **15a-c** po oczyszczeniu za pomocą chromatografii jonowymiennej. **(C)** Sygnały protonów H8 oraz H3' w widmie  $^1\text{H}$  NMR dla następujących związków **15a** (górze), **15b** (środek) oraz **15c** (dół). Przesunięcie chemiczne sygnałów jest zależne od konfiguracji przestrzennej atomu fosforu w pobliżu pierścienia  $\text{m}^7\text{G}$ . Występowanie dwóch sygnałów w środkowym widmie jest spowodowane obecnością centrów stereogenicznych o konfiguracjach  $S_p$  oraz  $R_p$  w jednej cząsteczce.

W przypadku badanych analogów kapu posłużenie się wcześniejszymi danymi literaturowymi oraz pomiarami  $^1\text{H}$  NMR pozwoliło na przypisanie prawdopodobnej konfiguracji absolutnej dla wymienionych wcześniej związków. Każdy zestaw diastereoizomerów (**9-12**, **14-17**) wykazuje zauważalne różnice w przesunięciach chemicznych, zwłaszcza dla sygnałów protonów H8 w reszcie 7-metyloguanozyny oraz H3' w reszcie rybozy przyłączonej do  $m^7\text{Guo}$  (**Rys. 2.10**). Obydwa sygnały mogą mieć znaczenie diagnostyczne w ustalaniu konfiguracji. Dla wcześniej badanych analogów kapu przesunięcie chemiczne protonu H8 dla izomeru o krótszym czasie retencji (D1) jest większe niż dla drugiego diastereoizomeru. Wcześniej zostało też wykazane, że w przypadku tiofosforanowego analogu ATP, ATP $\alpha\text{S}$  szybciej migrujący izomer posiada konfigurację  $S_p$ .<sup>681</sup> Podobne korelacje pomiędzy czasem retencji, przesunięciem sygnału H8 oraz konfiguracją absolutną zostały poczynione dla szeregu innych nukleotydów.<sup>8, 495</sup> W opisywanych badaniach zauważono także, że przesunięcie sygnału H3' może być bardziej niezawodnym parametrem w określaniu stereochemii łańcucha fosforanowego w przypadku analogów kapu modyfikowanych w pozycji  $\alpha$  łańcucha fosforanowego.<sup>484</sup>

Inne badania wykazały też, że metylacja w pozycji N7 związku  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  skutkuje odwróceniem opisywanej wcześniej korelacji pomiędzy czasem retencji a przypisaną konfiguracją absolutną. Mianowicie metylacja izomeru D1  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  ( $R_p$ ) prowadzi do powstania izomeru D2  $m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  ( $R_p$ ) a metylacja izomeru D2  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  D2 ( $S_p$ ) prowadzi do powstania izomeru D2  $m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  ( $S_p$ ).<sup>484</sup> W opisywanej pracy zaobserwowano taki sam efekt w przypadku  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{pp}$  (**60a, b**) oraz  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{pCH}_2\text{p}$  (**61**). Nawiązując do wartości przesunięć sygnału H3' sugeruje się, że konfiguracja absolutna dla związków **9** i **10** jest następująca:  $R_p$  dla **9b** oraz **10b** oraz  $S_p$  dla **9a** oraz **10a** (**Tab. 2.7**). Ponieważ już wcześniej wykazano, że dla tiofosforanowych analogów kapu modyfikowanych w pozycji sąsiadującej z  $m^7\text{Guo}$  sygnały zarówno H8 jak i H3' są przesunięte bardziej dodatnio dla izomerów D1, mających konfigurację  $S_p$  to uznano za prawdopodobne, że ta reguła będzie także stosowalna dla związków **14** i **15**. W ich przypadku zakłada się też, że izomer D2 posiada w mostku fosforanowym jedno centrum stereogeniczne  $R_p$  oraz drugie  $S_p$ . Przemawia za tym następująca argumentacja i) w widmie  $^1\text{H}$  NMR związku **15b** (**Rys. 2.10C**) obserwowane są dwa sygnały dla H8 sugerując obecność dwóch centrów stereogenicznych na atomach fosforu posiadających odmienny układ podstawników ii) ze statystycznego punktu widzenia powstawanie w reakcji typu *one-pot* związku posiadającego dwa różne konfiguracje centrów stereogenicznych jest dwukrotnie bardziej prawdopodobne niż związku posiadającego takie same konfiguracje a chromatogramy HPLC wskazują, że procentowy udział izomeru D2 w mieszaninach diastereoizomerów **14** oraz **15** wynosi w przybliżeniu 50% natomiast udziały pozostałych izomerów są mniejsze.

Przypisanie konfiguracji absolutnej dla boranowych analogów kapu **16** i **17** jest trudniejszym zadaniem. Wcześniejsze badania wskazały, że w przypadku boranowych analogów  $m^7\text{GpppG}$  izomer o krótszym czasie retencji posiada konfigurację  $R_p$ .<sup>484</sup> Jednak dla diskutowanych tutaj związków dane pochodzące z samego  $^1\text{H}$  NMR nie są rozstrzygające. Dodatkowe informacje na temat konfiguracji absolutnej mogą zostać uzyskane z porównania siły interakcji z białkiem eIF4E oraz podatności na działanie enzymu DcpS (patrz rozdział *Charakterystyka biochemiczna*). Co ciekawe porównanie chromatogramów HPLC dla związków **16**, **17** oraz ich niemetylowanych odpowiedników **70** i **71** wskazuje, że najbardziej rozpowszechniony izomer (posiadający konfigurację  $R_p$ ,  $S_p$ ) posiada najkrótszy czas retencji i zgodnie z przyjętą w pracy konwencją został nazwany D1. Obserwacja ta może świadczyć, że opisana wcześniej zmiana kolejności elucji izomerów dla metylowanego i niemetylowanego związku (np.  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$  i  $m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{p}$ ) może być częstszym zjawiskiem dla boranofosforanowych analogów kapu.

Podsumowując, dane z  $^1\text{H}$  NMR wykazały się wystarczające do przypisania konfiguracji absolutnej dla tiofosforanowych analogów **14** i **15** (izomer D1 posiada konfigurację  $S_p$ ,  $S_p$  a izomer D3  $R_p$ ,  $R_p$ ). Natomiast w przypadku związków **16** i **17** izomer D2 posiada konfigurację  $R_p$ ,  $R_p$  natomiast D3 ma konfigurację przeciwną. Dane uzyskane z podatności badanych związków na działanie DcpS dodatkowo potwierdziły te początkowe założenia.

**Tab. 2.7** Reprezentatywne dane <sup>1</sup>H NMR dla nukleotydów z grupą tio- lub boranofosforanową

No	związek	konf. abs.	$\delta_{\text{H8}}$ [ppm]	$\Delta\delta_{\text{H8}}$ [ppm] <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H3'}}$ [ppm]	$\Delta\delta_{\text{H3'}}$ [ppm] <sup>a</sup>
9a	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp D1	S <sub>p</sub>	9,22	-0,09	4,49	0,12
9b	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp D2	R <sub>p</sub>	9,13		4,61	
10a	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p D1	S <sub>p</sub>	9,21	-0,09	4,58	0,11
10b	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p D2	R <sub>p</sub>	9,12		4,49	
11a	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pp D1 <sup>b</sup>	S <sub>p</sub>	9,36	0,05	4,63	0,06
11b	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pp D2 <sup>b</sup>	R <sub>p</sub>	9,31		4,57	
12a	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> p D1	S <sub>p</sub>	9,30	0,02	4,52	0,02
12b	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> p D2	R <sub>p</sub>	9,28		4,50	
14a	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D1	S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub>	9,33	0,04 <sup>c</sup>	4,58	0,04 <sup>c</sup>
-	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D2	R <sub>s</sub> , S <sub>p</sub>	9,32; 9,29	0,03 <sup>c</sup>	4,58; 4,55	0,03 <sup>c</sup>
14b	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pppp <sub>s</sub> <sup>7</sup> G D3	R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub>	9,28	0,04 <sup>c</sup>	4,55	
15a	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> ppm <sub>s</sub> <sup>7</sup> G D1	S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub>	9,33		4,58	0,04
15b	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D2	R <sub>s</sub> , S <sub>p</sub>	9,34; 9,32		4,59; 4,54	
15c	m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub>	9,29		4,54	
16a	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> ppp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D1	R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub>	9,15; 9,10		4,59; 4,46	
16b	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> ppp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D2	R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub>	9,08		4,61	
16c	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> ppp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D3	S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub>	9,19		4,47	
17a	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D1	R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub>	9,17; 9,10		4,58; 4,46	
17b	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D2	R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub>	9,08		4,56	
17c	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D3	S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub>	9,15		4,46	0,08
60a	Gp <sub>BH3</sub> pp D1 <sup>d</sup>	R <sub>p</sub>	8,19	0,02	4,62	
60b	Gp <sub>BH3</sub> pp D2 <sup>d</sup>	S <sub>p</sub>	8,17		4,54	0,08
61a	Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p D1	R <sub>p</sub>	8,20	0,02	4,60	
61b	Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p D2	S <sub>p</sub>	8,18		4,52	

<sup>a</sup> Obliczone jako różnica R<sub>p</sub>-S<sub>p</sub> dla analogów boranofosforanowych oraz różnica S<sub>p</sub>-R<sub>p</sub> dla analogów tiofosforanowych.

<sup>b</sup> Dane z<sup>484</sup>

<sup>c</sup> Dla izomeru D1 różnica została wyznaczona używając przesunięć z widm D3 i D1 natomiast dla izomeru D2 różnica została wyznaczona z widma D2.

<sup>d</sup> Dane z<sup>489</sup>

### 2.3.1.4. Badania spektroskopowe UV-VIS

#### 2.3.1.4.1. Analogi kapu modyfikowane w łańcuchu fosforanowym

Ponieważ zdobyte wcześniej informacje na temat modyfikowanych chemicznie analogów kapu nie wykazały, że wprowadzenie modyfikacji do łańcucha fosforanowego ma istotny wpływ na właściwości spektralne w zakresie UV-VIS to nie prowadzono dodatkowych badań spektroskopowych nad uzyskanymi analogami kapu.

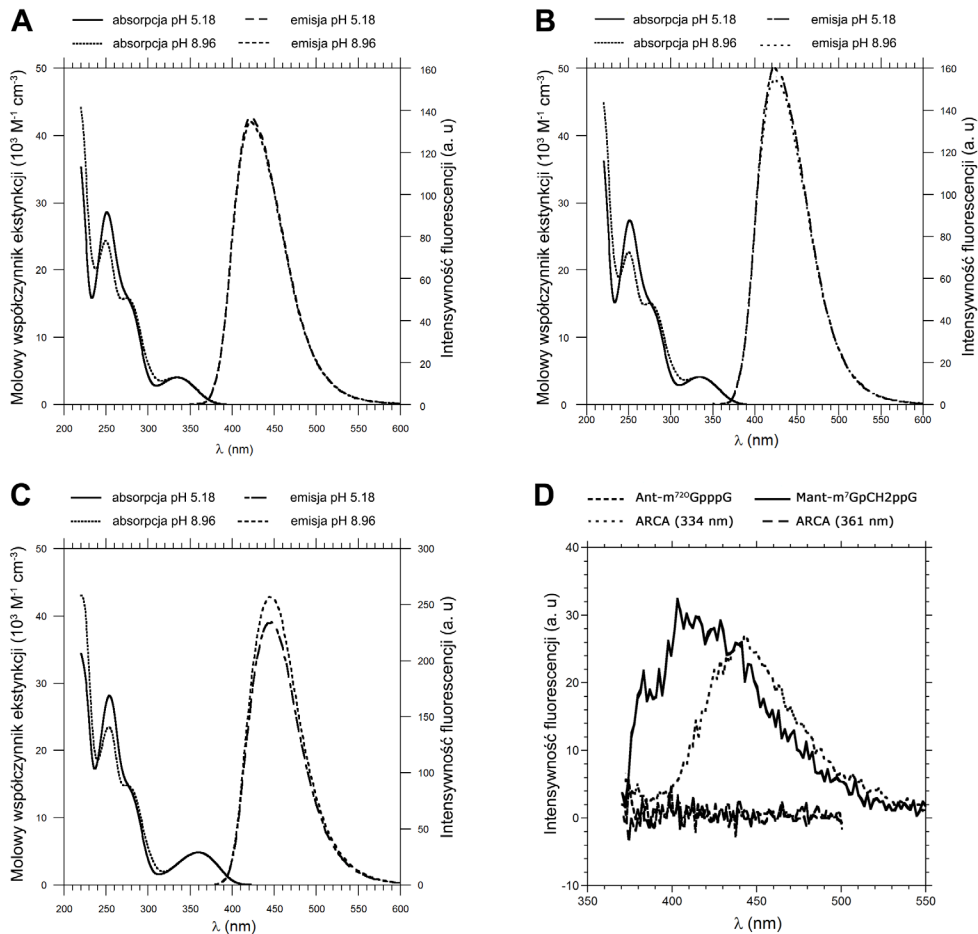
#### 2.3.1.4.2. Znakowane fluorescencyjnie analogi kapu

*Pomiary spektroskopowe zostały przeprowadzone przez zespół badawczy prof. Z. Wieczorka*

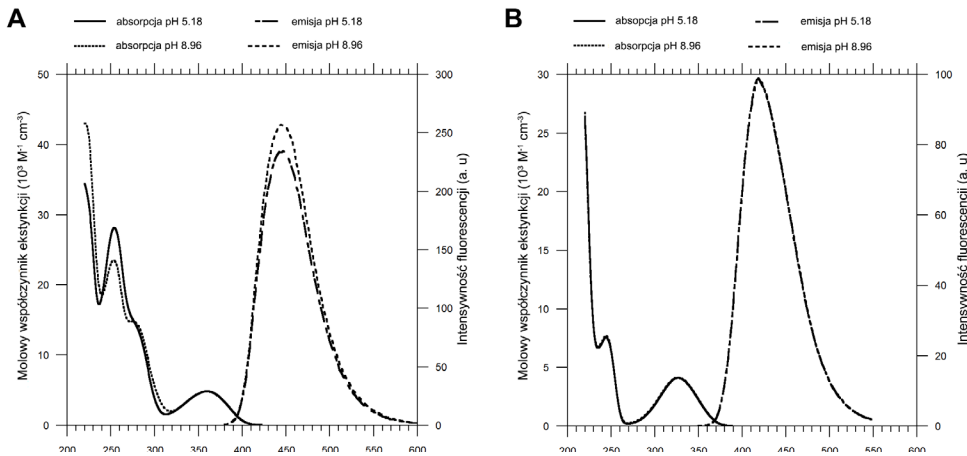
##### 2.3.1.4.2.1. Informacje ogólne

Związki **18**, **19** oraz **22** zostały wybrane do dokładnych badań spektroskopowych. **Rys. 2.11** pokazuje elektronowe widma absorpcyjne i emisyjne zarejestrowane w buforze PBS natomiast **Tab. 2.8** podsumowuje uzyskane dane spektroskopowe. Znane dane literaturowe wskazują, że właściwości spektralne pochodnych kwasu aminobenzoesowego są silnie zależne od rodzaju podstawnika aminowego i modyfikacji w grupie karboksylowej.<sup>682</sup><sup>683</sup> Z takiego powodu estry metylowe kwasu antranoilowego oraz *N*-metyloantranilowego zostały wykorzystane jako związki kontrolne w badaniach spektroskopowych. Widma emisyjne i absorpcyjne tych związków zostały przedstawione na **Rys. 2.12**, nie zaobserwowano zależności położenia maksimum absorpcji lub emisji od pH w zakresie 5,0 do 9,0. Podobnie, wydajności kwantowe oraz czasy życia fluorescencji były identyczne (w zakresie błędu pomiarowego).





**Rys. 2.11.** Widma absorpcyjne i emisyjne dla następujących związków: (A) Ant-m<sup>7</sup>GpppG, (B) Mant-m<sup>7</sup>GpppG, (C) Ant-m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GpppG w buforze PBS (pH = 5,18 lub 8,96). (D) Widma emisyjne mRNA zawierających kap modyfikowany przy pomocy grupy Ant lub Mant. Stężenia wszystkich analogów kapu wynosiły 11,7 μM. Stężenia RNA wynosiły 6,7 nM oraz 10,4 mM dla transkryptów znakowanych odpowiednio Ant lub Mant. Stężenia RNA zawierających analogi ARCA (kontrola negatywna) wynosiły 10 mM.



**Rys. 2.12.** Widma absorpcyjne i emisyjne dla następujących związków: (A) AntOMe, (B) MantOMe w buforze PBS (pH = 5,18 lub 8,96).

#### 2.3.1.4.2.2. Widma absorpcyjne

Dla badanych analogów kapu także nie zaobserwowano znaczących zmian w strukturze widm w zakresie pH 5,0 do 9,0 (Rys. 2.11). Widma absorpcyjne posiadają dwa maksima w 254 nm oraz 334 nm (361 nm dla związku **19** znakowanego Mant), co odnosi się odpowiednio do absorpcji zasady azotowej i znacznika fluorescencyjnego. Warto nadmienić, że maksimum absorpcji dla znacznika Ant w związku **18** jest przesunięte ku czerwieni o 5 nm w porównaniu do estru metyloвого Ant. Zjawisko to jest także obserwowane dla związku **19** znakowanego grupą Mant.

Szeroki grzbiet w widmie absorpcyjnym przy 280 nm pochodzi od 7-metyloguanozyny, w przypadku której zaobserwowano zależność położenia maksimum absorpcji od pH. Związane jest ono z obecnością jonizowalnego protonu w pozycji N1 zasady azotowej i pozwala na obliczenie stałej dysocjacji tego protonu dla różnych analogów kapu. Wyznaczone wartości  $pK_a$  dla związków **18**, **19** i **22** wynoszą odpowiednio 7,41, 7,42 oraz 7,49 i są bardzo zbliżone dla wartości  $pK_a$  niemodyfikowanego analogu kapu (7,50).<sup>301</sup> Oznacza to, że wprowadzenie znacznika fluorescencyjnego nie wpływa na stopień jonizacji protonu N1 w m<sup>7</sup>Guo. Ma to istotne znaczenie gdyż jednym z kryteriów dla znaczników stosowanych w badaniach biologicznych jest mały wpływ na właściwości fizykochemiczne znakowanego związku.

#### 2.3.1.4.2.3. Widma emisyjne

Wprowadzenie grup (M)Ant do analogów kapu zwiększyło ich wydajność i czas życia fluorescencji co sugeruje bliską interakcję pomiędzy egzogennym fluoroforem a hydrofobowym fragmentem nukleotydu. Istnienie takiego oddziaływania powinno wpłynąć na zmianę lokalnej polaryzacji w pobliżu fluorofora. Widma emisyjne opisywanych analogów kapu zarejestrowane w metanolu lub etanolu wykazały znaczący przyrost wydajności fluorescencji, podobne efekty zaobserwowano dla związków referencyjnych. Wkład od komponentu o krótszym czasie życia fluorescencji zmniejszał się znacząco po rozpuszczeniu związku w metanolu i zanikał całkowicie w etanolu tak, że jedynie komponent o długim czasie życia mógł zostać zarejestrowany. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tych obserwacji jest stabilizacja stanu wzbudzonego przez rozpuszczalnik, która obniża szybkość zaniku bezpromienistego dla wzbudzonego fluoroforu wydłużając przez to czas życia fluorescencji. Podobne efekty mogą zostać wywołane po związaniu znakowanego analogu kapu przez białko, co także prowadzi do zmian w lokalnej polaryzacji na skutek przyrostu hydrofobowości środowiska. Obserwacje takie zostały wspomniane wcześniej w literaturze.<sup>684</sup>

Fotostabilność związków **18**, **19** oraz **22** została potwierdzona w badaniach fluorescencji zależnych od czasu. Związki były eksponowane na światło przez 9 godzin w celu wywołania fotowysbielania. Jednak nie zaobserwowano więcej niż 3% strat w intensywności fluorescencji oraz nie było żadnych obserwowalnych zmian w kształcie widm wzbudzenia przed oraz po ekspozycji na światło. Wyniki te wskazują, że badane związki wykazują się dużą fotostabilnością.

**Tab. 2.8.** Własności spektroskopowe wybranych fluorescencyjnych analogów kapu oraz estrów metylowych (M)Ant.

Związek	Roztwór	Absorpcja		Fluorescencja		
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\lambda_{\max}}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\Phi$	Czasy życia
Ant-m <sup>7</sup> GpppG (1)	PBS pH = 5,18	334,0	4080	422,5	0,138	$\tau_1 = 4,24$ ns $\alpha_1 = 0,32$ $\tau_2 = 1,78$ ns $\alpha_2 = 0,68$ $\tau_{AV} = 2,56$ ns $\chi_R^2 = 1,026$
	PBS pH = 8,96	334,0	4040	422,5	0,135	$\tau_1 = 4,15$ ns $\alpha_1 = 0,32$ $\tau_2 = 1,79$ ns $\alpha_2 = 0,68$ $\tau_{AV} = 2,54$ ns $\chi_R^2 = 0,973$
	MeOH	341,5	4800	415,0	0,453	$\tau_1 = 7,30$ ns $\alpha_1 = 0,85$ $\tau_2 = 3,20$ ns $\alpha_2 = 0,15$ $\tau_{AV} = 6,69$ ns $\chi_R^2 = 0,983$
	EtOH	342,5	4670	413,0	0,594	$\tau_1 = 8,08$ ns $\chi_R^2 = 1,195$
Ant-m <sup>7,2'-O</sup> GpppG (5)	PBS pH = 5,18	334,0	4110	424,0	0,161	$\tau_1 = 4,23$ ns $\alpha_1 = 0,37$ $\tau_2 = 2,04$ ns $\alpha_2 = 0,63$ $\tau_{AV} = 2,85$ ns $\chi_R^2 = 0,981$
	PBS pH = 8,96	334,0	4100	424,0	0,156	$\tau_1 = 4,23$ ns $\alpha_1 = 0,39$ $\tau_2 = 2,10$ ns $\alpha_2 = 0,61$ $\tau_{AV} = 2,93$ ns $\chi_R^2 = 0,954$
Mant-m <sup>7</sup> GpppG (2)	PBS pH = 5,18	361,0	4670	446,0	0,236	$\tau_1 = 7,11$ ns $\alpha_1 = 0,40$ $\tau_2 = 2,61$ ns $\alpha_2 = 0,60$ $\tau_{AV} = 4,43$ ns $\chi_R^2 = 1,101$
	PBS pH = 8,96	361,0	4730	446,0	0,258	$\tau_1 = 7,65$ ns $\alpha_1 = 0,45$ $\tau_2 = 2,81$ ns $\alpha_2 = 0,55$ $\tau_{AV} = 4,99$ ns $\chi_R^2 = 1,084$
	MeOH	358,5	5880	430,0	0,439	$\tau_1 = 8,05$ ns $\alpha_1 = 0,70$ $\tau_2 = 5,54$ ns $\alpha_2 = 0,30$ $\tau_{AV} = 7,30$ ns $\chi_R^2 = 1,036$
	EtOH	358,5	5500	430,0	0,484	$\tau_1 = 8,24$ ns $\chi_R^2 = 1,219$
AntOMe	PBS pH = 5,18	327,0	4140	420,0	0,099	$\tau = 1,81$ ns $\chi_R^2 = 0,954$
	PBS pH = 8,96	327,0	4140	420,0	0,099	$\tau = 1,81$ ns $\chi_R^2 = 0,954$
	MeOH	336,0	5050	409,0	0,539	$\tau = 7,36$ ns $\chi_R^2 = 1,004$
	EtOH	337,0	5110	409,0	0,597	$\tau = 8,25$ ns $\chi_R^2 = 0,998$
	iPrOH	337,5	5200	407,5	0,577	$\tau = 7,84$ ns $\chi_R^2 = 0,977$
MantOMe	PBS pH = 5,18	349,5	4780	441,5	0,175	$\tau = 3,50$ ns $\chi_R^2 = 0,946$
	PBS pH = 8,96	349,5	4800	441,5	0,480	$\tau = 3,49$ ns $\chi_R^2 = 0,965$
	MeOH	352,5	6110	423,0	0,513	$\tau = 7,23$ ns $\chi_R^2 = 0,987$
	EtOH	353,0	6170	422,5	0,493	$\tau = 8,07$ ns $\chi_R^2 = 1,001$
	iPrOH	352,0	6230	419,5		$\tau = 8,07$ ns $\chi_R^2 = 1,001$

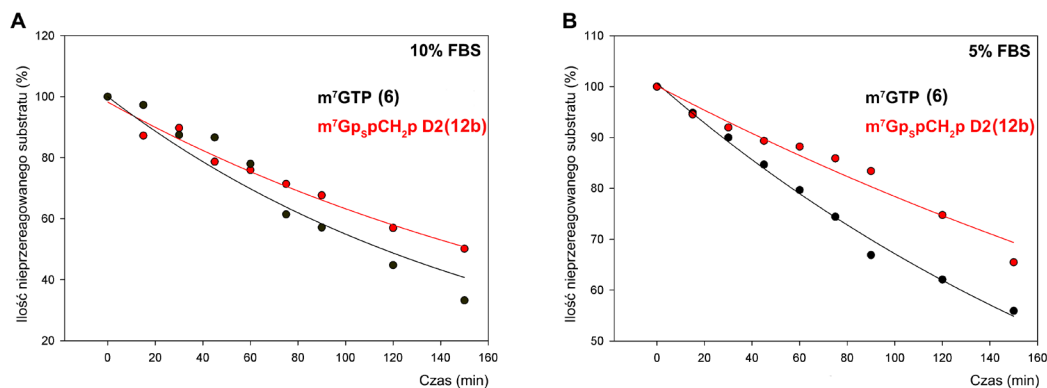
## 2.3.2. Charakterystyka biochemiczna

### 2.3.2.1. Mononukleotydy

#### 2.3.2.1.1. Odporność na degradację enzymatyczną

Zwiększenie stabilności nukleotydów często zwiększa ich użyteczność zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych. Jak wspomniano w części literaturowej głównym enzymem odpowiedzialnym za degradację nukleotydów zawierających  $m^7\text{Guo}$  jest pirofosfotaza DcpS. Badanie odporności wybranych analogów  $m^7\text{GTP}$  (związki **9-12**) oraz  $m^7\text{Gppppm}^7\text{G}$  (związki **15-17**) na trawienie enzymatyczne przez enzym DcpS zostało oparte na wcześniej stosowanej metodzie opartej na pomiarach HPLC.<sup>489</sup> W takim eksperymencie odpowiedni analog kapu był dodawany do buforu z DcpS, następnie w określonych punktach czasowych pobierano próbkę reakcji i po termicznej dezaktywacji badano ją na HPLC by monitorować postęp reakcji.  $m^7\text{GpppG}$  został użyty jako kontrola pozytywna, w zastosowanych warunkach był on całkowicie hydrolizowany w czasie jednej godziny. Opisany test enzymatyczny wykazał, że żaden z badanych związków nie był degradowany, co zgadza się z wcześniejszymi badaniami nad tio- i boranofosforanowymi analogami kapu.<sup>484, 490</sup> Pokazały one, że obecność wspomnianych modyfikacji w miejscu cięcia przez DcpS prowadzi do całkowitego zablokowania hydrolizy. W celu potwierdzenia konfiguracji absolutnej na stereogenicznych atomach fosforu niektóre ze związków (**9, 10, 16, 17**) zostały także poddane trawieniu przy większym stężeniu DcpS (patrz rozdział **2.3.2.2.2. Stereoselektywna podatność na działanie DcpS**).

W celu lepszego zbadania stabilności pochodnych  $m^7\text{GTP}$ , na wybranych związkach przeprowadzono dodatkowe badania enzymatyczne z wykorzystaniem FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*). Eksperyment był zaprojektowany w taki sposób, że odpowiedni analog kapu (lub mieszanina diastereizomerów) był dodawany do roztworu FBS w buforze PBS i w zadanych punktach czasowych pobierano próbkę reakcji a po termicznej dezaktywacji wprowadzano ją na HPLC by monitorować postęp reakcji.  $m^7\text{GTP}$  był wykorzystany jako kontrola pozytywna ponieważ związek ten jest hydrolizowany przez hDcpS i inne pirofosfatazy.<sup>531, 685</sup> Informacje uzyskane z chromatogramów HPLC pozwoliły na ocenę stabilności związków a w przypadku ich podatności na degradację pozwoliły na oszacowanie czasów półtrwania w roztworach FBS o stężeniach 5% oraz 10% (**Rys. 2.13**). Wykazano, że diastereizomery  $m^7\text{Gp}_3\text{pp}$  (**11**) są stabilne w obydwu stężeniach FBS. Natomiast izomery  $m^7\text{Gp}_3\text{pCH}_2\text{p}$  (**12**) różnią się podatnością na degradację. Diastereoizomer D2 (**12b**), podobnie jak **11**, okazał się całkowicie odporny na hydrolizę jednakże drugi izomer był degradowany w nieco wolniejszym tempie niż  $m^7\text{GTP}$  (**Rys. 2.13**). Można spekulować, że z uwagi na odmienną konfigurację podstawników przy atomie fosforu  $\alpha$  diastereomer D1 może być rozpoznawany i hydrolizowany przez nukleazy występujące w FBS natomiast izomer D2 może być niezdolny do tworzenia stabilnego kompleksu enzym-substrat co tłumaczy jego stabilność.

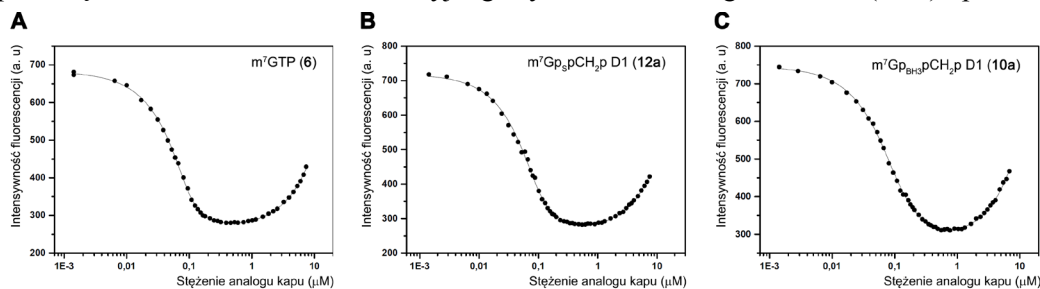


**Rys. 2.13.** Reprezentatywne wyniki dla pomiarów stabilności w FBS. (A) Rozpad trifosforanów nukleotydów w 10% FBS. Estymowane czasy półtrwania wynoszą  $108 \pm 4$  min dla  $m^7\text{GTP}$  (**6**) oraz  $156 \pm 4$  min dla  $m^7\text{Gp}_3\text{pCH}_2\text{p}$  D2 (**12b**). (B) Rozpad trifosforanów nukleotydów w 5% FBS. Estymowane czasy półtrwania wynoszą  $190 \pm 0$  min dla **6** oraz  $190 \pm 9$  min dla **12b**.

### 2.3.2.1.2. Wiązanie do eIF4E

*Eksperymenty zostały przeprowadzone przez dr Joannę Żuberek oraz mgr Katarzynę Wnęk*

Wcześniejsze badania nad oddziaływaniami kap-eIF4E pokazały, że odpowiednio wysokie powinowactwo analogu kapu do tego białka jest jednym z wymagań dla efektywnej translacji mRNA zawierającego tak modyfikowany kap (lub do inhibicji translacji w przypadku wolnych analogów kapu).<sup>488, 570</sup> Dlatego też wyznaczanie stałych asocjacji ( $K_{AS}$ ) dla kompleksów kap-eIF4E jest pierwszym testem ich użyteczności we wspomnianych aplikacjach. Wszystkie  $K_{AS}$  dla badanych związków, zarówno mono- jak i dinukleotydów wyznaczono za pomocą miareczkowania fluorescencyjnego synchronizowanego w czasie (TST) i przedstawiono w **Tab. 2.9** oraz



**Rys. 2.14.** Przykładowe krzywe miareczkowań fluorescencyjnych eIF4E analogami kapu. (A) m<sup>7</sup>GTP, (B) m<sup>7</sup>Gp<sub>p</sub>CH<sub>2</sub>p D1, (C) m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub>pCH<sub>2</sub>p D1.

W ogólności mononukleotydowe analogi kapu oddziałują silniej z eIF4E niż ich dinukleotydowe odpowiedniki posiadające łańcuch fosforanowy o takiej samej strukturze co czyni je obiecującymi inhibitorami translacji zależnej od kapu, które z kolei mogą znaleźć zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe. Przeprowadzone kilka lat temu badania pokazały, że związek **11** jest jednym z najsilniejszych inhibitorów translacji opartych o strukturę nukleotydu.<sup>489</sup>

Badania opisane w niniejszej pracy wskazały, że wartości  $K_{AS}$  dla obydwu diastereoizomerów boranofosforanowego analogu **9** są nieco wyższe niż dla związku wyjściowego jakim jest m<sup>7</sup>GTP. Związki **10** oraz **12** są niższe niż związku wyjściowego jakim jest m<sup>7</sup>GTP. Zarówno w przypadku analogów boranofosforanowych jak i tiofosforanowych obecność grupy metylenobisfosfonianowej miała duży wpływ na zmianę siły oddziaływań. Wprowadzenie tej grupy w pozycję β/γ obniżyła znacząco (około 5-krotnie) wartość  $K_{AS}$ . Odnotowany wynik jest zasadniczo zgodny z wcześniejszymi obserwacjami pokazującymi, że metylenobisfosfonianowe analogi kapu mają niższe powinowactwo do eIF4E niż ich niemodyfikowane odpowiedniki. Przykładowo wartość  $K_{AS}$  dla m<sup>7</sup>GTP wynosi  $113,0 \pm 3,6 \mu\text{M}^{-1}$  podczas gdy dla m<sup>7</sup>GppCH<sub>2</sub>p wynosi już tylko  $19,5 \pm 1,4 \mu\text{M}^{-1}$ . W większości przypadków zaobserwowano także istotną zależność wartości  $K_{AS}$  od stereochemii na stereogenicznym atomie fosforu, co jest zgodne z poprzednimi badaniami nad modyfikowanymi analogami kapu. Izomery o określonym układzie przestrzennym podstawników – D2 ( $R_p$ ) dla związku **10** oraz D1 ( $S_p$ ) dla związków **10-12** posiadają zauważalnie większe powinowactwo do eIF4E niż izomery o odwrotnej konfiguracji. Wspiera to pierwotne założenie, że izomery D1 boranofosforanowych analogów m<sup>7</sup>GTP mają taką samą konfigurację absolutną na atomie fosforu α jak izomery D2 analogów tiofosforanowych. Prowadzone wcześniej badania pozwoliły na zaproponowanie pewnych korelacji pomiędzy powinowactwem do eIF4E a rozmieszczeniem podstawników w centrum stereogenicznym sąsiadującym z resztą m<sup>7</sup>Guo. Konfiguracja  $S_p$  grupy tiofosforanowej (lub  $R_p$  dla grupy boranofosforanowej) prowadzi do mocniejszego wiązania się z eIF4E i na tej podstawie zaproponowano, że związki **9b**, **10b**, **11b** oraz **12b** mają konfigurację  $R_p$ .

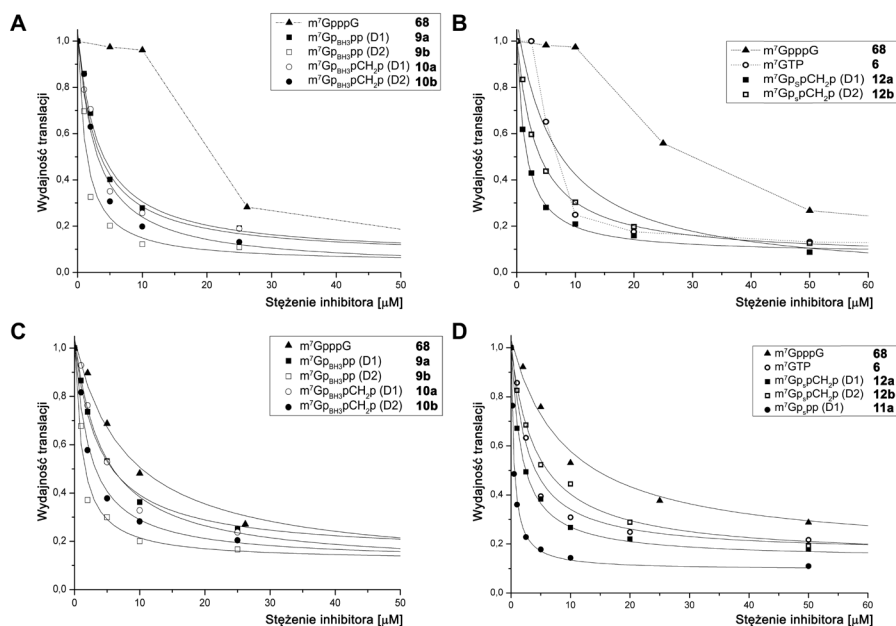
Innym nieoczekiwanym odkryciem była bardzo mała różnica w wartościach  $K_{AS}$  ( $148,5 \pm 3,5$  vs.  $136,0 \pm 5,0 \mu\text{M}^{-1}$ ) pomiędzy izomerami związku **9**. Najczęściej różnica w powinowactwie diastereoizomerycznych analogów kapu jest bowiem około dwukrotna. Jednakże, by rozwiązać kwestie stereochemii i wiązania się analogów m<sup>7</sup>GTP do swoich celów molekularnych należy w przyszłości przeprowadzić badania strukturalne z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej. Uzyskanie na tej drodze dokładnych informacji strukturalnych powinno pomóc w lepszym zrozumieniu wpływu modyfikacji w łańcuchu fosforanowym na wiązanie się analogów kapu z eIF4E.

### 2.3.2.1.3. Inhibicja translacji

Pomiary inhibicji translacji zostały wykonane przez dr Macieja Łukaszewicza

Jak zostało wspomniane we wcześniejszym rozdziale, mononukleotydowe analogi kapu są lepszymi inhibitorami translacji niż ich dinukleotydowe odpowiedniki o takiej samej strukturze łańcucha fosforanowego. Efektywność inhibicji związków **9**, **10** oraz **12** została przetestowana w układzie *in vitro* jakim jest lizat z retikulocytów króliczych (ang. *rabbit reticulocyte lysate*, RRL). W metodzie tej wykorzystywane jest kapowany za pomocą analogu ARCA mRNA zawierający sekwencję kodującą lucyferazę ze świetlika. Poziom ekspresji białka jest liniowo skorelowany z intensywnością sygnału mierzonego za pomocą luminometru co pozwala na wyznaczenie poziomu translacji w badanej próbce. Pomiary zostały przeprowadzone w dwóch wariantach eksperymentalnych. Pierwszy z nich (eksperyment I) zakładał dodanie mRNA do mieszaniny reakcyjnej w tej samej chwili co testowany inhibitor. Natomiast w drugim (eksperyment II) mRNA został dodany dopiero po 60 minutowym okresie preinkubacji po dodaniu testowanego inhibitora. Powodem wykonania dwóch odrębnych doświadczeń była chęć sprawdzenia czy przedłużona inkubacja analogu kapu w lizacie będzie miała wpływ na efektywność inhibicji. Wcześniejsze badania wykazały, że analogi kapu podatne na działanie DcpS mają znacznie wyższe wartości  $IC_{50}$  jeśli są inkubowane w lizacie, w porównaniu do wartości  $IC_{50}$  dla eksperymentów prowadzonych bez preinkubacji.

W eksperymencie I wykazano, że wszystkie testowane związki są silniejszymi inhibitorami translacji niż  $m^7GpppG$ , ponadto słabiej wiązalny przez eIF4E izomer z każdej pary był gorszym inhibitorem niż  $m^7GTP$  (Rys. 2.15). Jedynie związki **9b** oraz **12a** miały lepsze właściwości inhibitorowe niż  $m^7GTP$ . Jednakże w eksperymencie II było widoczne, że zgodnie z przypuszczeniami potencjał inhibitorowy niemodyfikowanych analogów kapu spadł znacząco podczas gdy dla tio- i boranofosforanowych analogów kapu nie uległ on znaczącym zmianom. W rezultacie każdy z testowanych związków wykazał większy potencjał inhibitorowy niż  $m^7GTP$  (Tab. 2.9). Podwyższenie wartości  $IC_{50}$  dla podatnych na działanie DcpS analogów kapu jest prawdopodobnie związane z obecnością w RRL DcpS oraz innych pirofosfataz. Modyfikowane analogi **9**, **10** i **12** wykazują podwyższony poziom odporności na hydrolizę przez co są skuteczniejszymi inhibitorami translacji w sytuacji gdy w środowisku występują enzymy degradujące strukturę kapu.

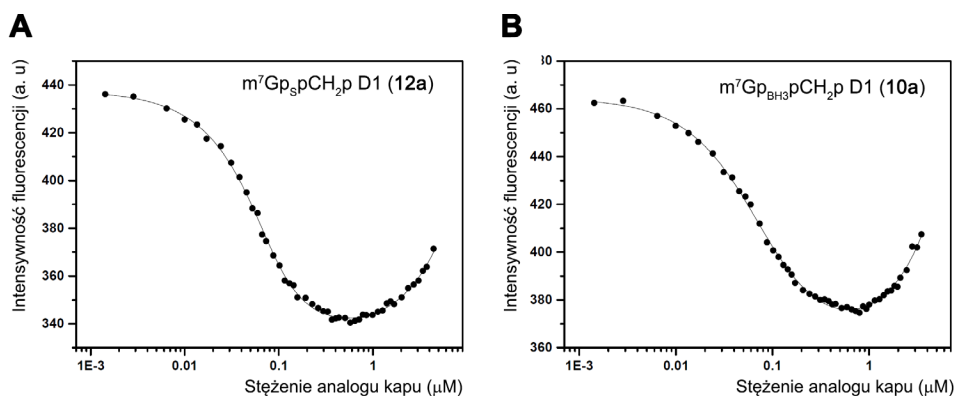


Rys. 2.15. Inhibicja translacji w RRL przez mononukleotydowe analogi kapu. Rezultaty eksperymentów z 1 h czasem preinkubacji inhibitora dla (A) boranofosforanów i (B) tiofosforanów. Rezultaty eksperymentów bez preinkubacji inhibitora dla (C) boranofosforanów i (D) tiofosforanów.

### 2.3.2.1.4. Wiązanie się do DcpS oraz inhibicja tego enzymu

*Eksperymenty zostały wykonane przez mgr. Annę Nowicką oraz mgr. Katarzynę Wnęk*

Enzym DcpS wiąże i hydrolizuje wolne analogi kapu jednakże związki odporne na działanie DcpS także są wiązane w centrum katalitycznym jednak w tym przypadku nie dochodzi do rozpadu wiązania pirofosforanowego. Dlatego też analogi kapu niepodatne na aktywność DcpS są potencjalnymi inhibitorami tego enzymu.<sup>570</sup> W celu oceny potencjału inhibitorowego wybranych związków odpornych na działanie DcpS wyznaczono dla nich  $K_{AS}$  do tego enzymu. Podobnie jak w przypadku eIF4E wykorzystano technikę miareczkowania fluorescencyjnego TST (Rys. 2.16).



**Rys. 2.16.** Przykładowe krzywe miareczkowań fluorescencyjnych hDcpS analogami kapu. (A) m<sup>7</sup>Gp<sub>S</sub>pCH<sub>2</sub>p D1, (B) m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub>pCH<sub>2</sub>p D1.

Zgodnie z aktualnymi badaniami m<sup>7</sup>GDP nie jest substratem dla DcpS i wykazuje on właściwości inhibitorowe, podobnie jak jego analogi modyfikowane w łańcuchu fosforanowym.<sup>531</sup> Związki nie posiadające modyfikacji w pobliżu miejsca cięcia przez DcpS są substratami dla tego enzymu i nie jest możliwe wyznaczenie dla nich  $K_{AS}$  przez co nie można porównać wartości tego parametru dla modyfikowanych analogów kapu i ich związków macierzystych. Możliwe jest jednak porównaniu wpływu różnych modyfikacji na powinowactwo do DcpS. Badania przeprowadzone na analogach m<sup>7</sup>GpppG wskazały że i) wprowadzenie modyfikacji mostkowych (metylenobisfosfonianowa lub imidodifosforanowa) poprawia wiązanie do DcpS jeżeli porównać do efektu wywołanego przez wprowadzenie modyfikacji niemostkowych ii) wydłużenie łańcucha fosforanowego ma negatywny wpływ na wiązanie przez DcpS. W przypadku analogów m<sup>7</sup>GDP zaobserwowano, że obecność modyfikacji metylenobisfosfonianowej ma negatywny wpływ na wiązanie natomiast modyfikacja imidodifosforanowa ma wpływ neutralny. W szeregu analogów m<sup>7</sup>GTP zaobserwowano, że obecność modyfikacji tio- lub boranofosforanowej prowadzi do spadku powinowactwa względem DcpS. Ponadto wartość  $K_{AS}$  jest silnie zależna od konfiguracji na stereogenicznym atomie fosforu, izomery D1 (związki **10a** i **12b**) wiążą się ponad 2-krotnie silniej niż izomery D2. Opisane obserwacje są zgodne z wcześniejszymi badaniami na analogach dinukleotydu. Porównanie wartości  $K_{AS}$  dla związków **2** i **3** z wartościami dla **7** i **8** wskazuje, że wydłużenie łańcucha fosforanowego o jeden atom fosforu ma nieduży dodatni wkład do oddziaływania z DcpS. Ponadto obecność podstawnika alkilowego w pozycji  $\gamma$  łańcucha ma negatywny wpływ na wiązanie z DcpS, m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>ppEtCN wykazuje ponad 2-krotnie mniejsze powinowactwo niż analogicznie zmodyfikowany związek bez grupy alkilowej w łańcuchu fosforanowym. Ten wniosek też jest zgodny z wcześniejszymi badaniami na temat DcpS.

**Tab. 2.9** Biochemiczne właściwości wybranych mononukleotyдовых analogów kapu.

No	analog kapu	$K_{4S}(eIF4E)$ [ $\mu M^{-1}$ ]	$\Delta G(eIF4E)$ [kJ · mol <sup>-1</sup> ]	$K_{4S}(DcpS)$ [ $\mu M^{-1}$ ]	$IC_{50}(DcpS)$ [ $\mu M$ ]	$IC_{50} A$ [ $\mu M$ ]	$IC_{50} B$ [ $\mu M$ ]
1	m <sup>7</sup> GDP	20,4 ± 1,5	-41,02 ± 0,18	114,0 ± 8,0	4,17 ± 0,50	n.d	n.d
2	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> p	n.d	n.d	44,2 ± 2,7	8,08 ± 8,71	n.d	n.d
3	m <sup>7</sup> GpNHp	n.d	n.d	104,0 ± 4,7	3,77 ± 0,71	n.d	n.d
68	m <sup>7</sup> GpppG	9,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	-39,80 ± 0,10	podatny	podatny	8,30 ± 1,00	25,00 ± 6,90
6	m <sup>7</sup> GTP	113,0 ± 3,6 <sup>a</sup>	-45,96 ± 0,08	podatny	podatny	2,36 ± 0,25	5,72 ± 2,33
7	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> pp	n.d	n.d	73,8 ± 6,2	2,0 ± 0,1	n.d	n.d
8	m <sup>7</sup> GpNHpp	n.d	n.d	124,9 ± 7,1	1,7 ± 0,4	n.d	n.d
-	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> ppEtCN	n.d	n.d	30,6 ± 2,8	7,0 ± 1,0	n.d	n.d
-	m <sup>7</sup> GppCH <sub>2</sub> p	19,5 ± 1,4	-41,63 ± 0,30	n.d	n.d	n.d	n.d
9a	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp (D1)	136,0 ± 5,0	-46,42 ± 0,09	niepodatny; n.d.	n.d	4,12 ± 0,89	3,26 ± 0,76
9b	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp (D2)	148,5 ± 3,5	-46,62 ± 0,05	wolna hydroliza <sup>a</sup>	n.d	1,19 ± 0,08	1,28 ± 0,30
10a	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p (D1)	18,5 ± 0,2	-41,48 ± 0,03	50,2 ± 5,2	n.d	4,47 ± 0,24	3,22 ± 0,87
10b	m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p (D2)	36,1 ± 0,5	-43,14 ± 0,03	20,0 ± 3,6	n.d	2,55 ± 0,56	3,26 ± 0,92
12a	m <sup>7</sup> Gp <sub>S</sub> pCH <sub>2</sub> p(D1)	85,9 ± 3,2	-45,28 ± 0,09	51,9 ± 2,2	n.d	1,49 ± 0,12	1,24 ± 0,10
12b	m <sup>7</sup> Gp <sub>S</sub> pCH <sub>2</sub> p(D2)	41,8 ± 1,8	-43,50 ± 0,11	20,4 ± 1,4	n.d	3,68 ± 0,33	2,61 ± 0,21
11a	m <sup>7</sup> GpSpp (D1)	371,0 ± 19,0 <sup>a</sup>	-48,91 ± 0,13 <sup>a</sup>	niepodatny <sup>a</sup> ; n.d.	n.d	0,56 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,02 <sup>a</sup>
	m <sup>7</sup> GpSpp (D2)	190,0 ± 7,0 <sup>a</sup>	-47,25 ± 0,05 <sup>a</sup>	niepodatny <sup>a</sup> ; n.d.	n.d	1,44 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,30 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dane z<sup>489</sup>

### 2.3.2.2. Dinukleotydy

W odróżnieniu od mononukleotydydów dinukleotydydowe analogi kapu mogą zostać inkorporowane do mRNA przy wykorzystaniu bakteryjnych lub wirusowych polimeraz RNA.<sup>605 686</sup> Jeżeli inkorporowany analog posiada korzystne właściwości takie jak zwiększone powinowactwo do eIF4E to tak zmodyfikowane transkrypty także będą posiadać większą wydajność translacji. Co więcej wiele modyfikowanych analogów kapu po wprowadzeniu do RNA zapewnia mu zredukowaną podatność na działanie Dcp2, wydłużając przez to jego czas półtrwania w warunkach *in vitro* lub po wprowadzeniu do komórek.<sup>570</sup> Poza użyteczności w przygotowaniu egzogenego mRNA dinukleotydydowe analogi kapu *per se* także mogą funkcjonować jako wydajne inhibitory translacji.

#### 2.3.2.2.1. Wiązanie do eIF4E

Związki **14-17** wykazują silniejsze powinowactwo do eIF4E niż analogi kapu pozbawione modyfikacji w mostku fosforanowym takie jak m<sup>7</sup>GpppG lub m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GpppG (**Tab. 2.10**). Z uwagi na to, że mostek trifosforanowy w związkach **14-17** podległ szeregu znaczących modyfikacji, dyskusja nad uzyskanymi wynikami w odniesieniu do poprzednio otrzymanych związków jest utrudniona. Dla związków typu m<sup>7</sup>Gp<sub>X</sub>m<sup>7</sup>G (X = 3, 4) pozbawionych dodatkowych grup funkcyjnych wykazano, że obecność drugiej reszty m<sup>7</sup>Guo powoduje około dwukrotny spadek powinowactwa do eIF4E jeśli porównać do związków posiadających tylko jedną resztę m<sup>7</sup>Guo w cząsteczce. Wprowadzenie dwóch grup tio- lub boranofosforanowych do związków **14-17** nie osłabia powinowactwa do eIF4E i zazwyczaj ma dodatni wpływ na siłę oddziaływań. Podobny efekt stabilizujący został wcześniej opisany dla analogów m<sup>7</sup>GpppG posiadających pojedynczą modyfikację wspomnianego typu. Porównanie wartości  $K_{AS}$  w parach **14, 15** oraz **16, 17** wskazuje na ogólny efekt destabilizujący grupy metylenobisfosfonianowej w pozycji β/γ mostka fosforanowego, co jest zgodne z poprzednimi badaniami. Ponadto we wszystkich związkach za wyjątkiem **17** stereochemia mostka fosforanowego ma znaczący wpływ na wiązanie się z eIF4E. W przypadku tiofosforanowych analogów kapu **14-15** konfiguracja *S<sub>p</sub>* jest skorelowana z silniejszym powinowactwem do tego białka. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań, określone konfiguracje dla stereogenicznych atomów fosforu (*S* dla tiofosforanów oraz *R* dla boranofosforanów) przyczyniają się do silniejszych interakcji z eIF4E.



**Tab. 2.10.** Biochemiczne właściwości dinukleotydowych analogów kapu otrzymanych podczas realizacji pracy w porównaniu do podobnych związków uzyskanych wcześniej. W przypadku danych dla wydajności translacji oraz podatności na Dcp2 pokazano jedynie dane dla wybranych związków (**14-17**), uzyskane w serii eksperymentów w ramach opisywanej pracy.

No	analog kapu	$K_m$ [ $\mu\text{M}^{-1}$ ]	$\Delta\text{G}(\text{eIF4E})$ [ $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Wydajność translacji <i>in vitro</i>	kapowane transkrypty [%]	odsetek kapowanych transkryptów, 15 min [%]	odsetek kapowanych transkryptów, 30 min [%]
-	$m_2^{7,2'-O}\text{GpppG}$	$10,8 \pm 0,3^a$	$-40,14 \pm 0,14$	$1,00 \pm 0,00$	$77,0 \pm 1,0$	$39,1 \pm 5,2$	$23,4 \pm 1,1$
-	$m_2^{7,2'-O}\text{GppCH}_2\text{pG}$	$4,4 \pm 0,2$	$-37,2 \pm 0,1$	$1,30 \pm 0,30$	$72,0 \pm 2,0$	~99	~99
<b>69</b>	$m^7\text{Gpppm}^7\text{G}^b$	$5,0 \pm 0,2$	$-35,3 \pm 0,1$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>13</b>	$m^7\text{Gppppm}^7\text{G}^b$	$49,4 \pm 1,5$	$-41,1 \pm 0,4$	$3,14 \pm 0,24$	n.d.	n.d.	n.d.
-	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{ppG D1}^c$	$9,6 \pm 0,3$	$-39,85 \pm 0,08$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
-	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{ppG D2}^c$	$17,3 \pm 0,2$	$-41,31 \pm 0,03$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
-	$m^7\text{Gpp}_{\text{BH}_3}\text{pm}^7\text{G}^d$	$11,1 \pm 0,2$	$-40,21 \pm 0,04$	$1,50 \pm 0,10$	n.d.	n.d.	n.d.
-	$m_2^{7,2'-O}\text{Gp}_s\text{pppG D1}^e$	$258,0 \pm 6,0$	$-47,2 \pm 0,4$	$2,49 \pm 0,23$	n.d.	n.d.	n.d.
-	$m_2^{7,2'-O}\text{Gp}_s\text{pppG D2}^e$	$129,0 \pm 4,0$	$-45,5 \pm 0,8$	$3,04 \pm 0,74$	n.d.	n.d.	n.d.
-	$m^7\text{GppCH}_2\text{ppG}^a$	$38,4 \pm 3,9$	$-43,29 \pm 0,03$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>14a</b>	$m^7\text{Gp}_s\text{ppp}_s\text{m}^7\text{G D1+D2}$	$112,5 \pm 6,1$	$-45,2 \pm 0,1$	n.d.	$78,7 \pm 1,3$	0,0	0,0
<b>14b</b>	$m^7\text{Gp}_s\text{pppm}_s^7\text{G D3}$	$61,3 \pm 2,2$	$-43,7 \pm 0,1$	n.d.	$78,2 \pm 0,6$	0,0	0,0
<b>15a</b>	$m^7\text{Gp}_s\text{pCH}_2\text{ppm}_s^7\text{G D1}$	$80,8 \pm 2,5$	$-44,4 \pm 0,1$	$1,86 \pm 0,23$	$68,3 \pm 0,5$	$50,0 \pm 3,0$	$27,5 \pm 3,3$
<b>15b</b>	$m^7\text{Gp}_s\text{pCH}_2\text{pp}_s\text{m}^7\text{G D2}$	$65,2 \pm 4,8$	$-43,9 \pm 0,2$	$1,56 \pm 0,13$	$75,9 \pm 0,3$	$52,5 \pm 2,6$	$32,3 \pm 2,6$
<b>15c</b>	$m^7\text{Gp}_s\text{pCH}_2\text{pp}_s\text{m}^7\text{G D3}$	$39,5 \pm 0,8$	$-42,6 \pm 0,1$	$1,12 \pm 0,02$	$74,9 \pm 0,7$	$66,2 \pm 0,8$	$37,3 \pm 3,9$
<b>16a</b>	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{ppp}_{\text{BH}_3}\text{m}^7\text{G D1}$	$77,7 \pm 0,6$	$-44,3 \pm 0,1$	n.d.	$44,0 \pm 0,4$	$44,0 \pm 1,5$	$39,0 \pm 1,2$
<b>16b</b>	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{ppp}_{\text{BH}_3}\text{m}^7\text{G D2}$	$69,2 \pm 1,9$	$-44,0 \pm 0,1$	n.d.	$28,4 \pm 1,3$	0,0	0,0
<b>16c</b>	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{ppp}_{\text{BH}_3}\text{m}^7\text{G D3}$	$51,0 \pm 0,6$	$-43,3 \pm 0,1$	n.d.	$36,6 \pm 0,8$	$89,7 \pm 1,8$	$76,9 \pm 4,4$
<b>17a</b>	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{pCH}_2\text{pp}_{\text{BH}_3}\text{m}^7\text{G D1}$	$41,3 \pm 1,4$	$-42,7 \pm 0,1$	$1,18 \pm 0,12$	$32,7 \pm 1,2$	$67,3 \pm 1,5$	$64,8 \pm 0,6$
<b>17b</b>	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{pCH}_2\text{pp}_{\text{BH}_3}\text{m}^7\text{G D2}$	$41,9 \pm 1,5$	$-42,8 \pm 0,1$	$0,99 \pm 0,17$	$32,6 \pm 0,5$	$49,5 \pm 1,0$	$34,9 \pm 0,9$
<b>17c</b>	$m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{pCH}_2\text{pp}_{\text{BH}_3}\text{m}^7\text{G D3}$	$36,4 \pm 0,1$	$-42,4 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,14$	$27,3 \pm 0,5$	$86,6 \pm 1,1$	$83,9 \pm 1,7$
<b>18</b>	Ant- $m^7\text{GpppG}$	n.d.	n.d.	$0,82 \pm 0,27$	$50,0 \pm 3,0$	$74,0 \pm 8,0$	$56,0 \pm 16,0$
<b>19</b>	Mant- $m^7\text{GpppG}$	n.d.	n.d.	$1,34 \pm 0,05$	$57,0 \pm 2,0$	$63,0 \pm 2,0$	$48,0 \pm 12,0$
<b>20</b>	Mant- $m^7\text{GpCH}_2\text{ppG}$	n.d.	n.d.	$0,85 \pm 0,12$	$70,0 \pm 2,0$	$66,0 \pm 4,0$	$46,0 \pm 5,0$
<b>21</b>	Mant- $m^7\text{GppCH}_2\text{pG}$	n.d.	n.d.	$0,69 \pm 0,11$	$63,0 \pm 5,0$	$95,0 \pm 9,0$	$89,0 \pm 11,0$
<b>22</b>	Ant- $m_2^{7,2'-O}\text{GpppG}$	n.d.	n.d.	$1,26 \pm 0,28$	$68,0 \pm 6,0$	$71,0 \pm 9,0$	$52,0 \pm 9,0$

<sup>a</sup> dane z <sup>588</sup>

<sup>b</sup> dane z <sup>687</sup>

<sup>c</sup> dane z <sup>484</sup>

<sup>d</sup> dane z <sup>487</sup>

<sup>e</sup> dane z <sup>495</sup>

### 2.3.2.2.2. Stereoselektywna podatność na działanie DcpS

Ponieważ wcześniejsze obserwacje pokazały, że przy dużym stężeniu DcpS możliwe jest zaobserwowanie stereoselektywnej degradacji boranofosforanowych analogów kapu o konfiguracji  $R_p$  (izomery te ulegają powolnej hydrolizie)<sup>484</sup> to postanowiono wykorzystać tą metodę w celu potwierdzenia stereochemii związków **9**, **10**, **16**, **17**, zaproponowanej pierwotnie na podstawie danych z NMR. Wspomniane związki poddano inkubacji z dużym stężeniem DcpS (200 nM) i w takich warunkach analog **9b** był w niewielkim stopniu degradowany do  $m^7\text{GMP}$  (postęp hydrolizy wyniósł  $19\% \pm 2\%$  po upływie 3h). Związek **16b** podlegał szybszej hydrolizie ( $81\% \pm 2\%$  po upływie 3h) do mieszaniny  $m^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}$  oraz związku **9b**. Wszystkie inne analogi okazały się całkowicie odporne na działanie DcpS. Wspiera to początkowe założenie, że związek **9b** posiada konfigurację  $R_p$  natomiast **16b** ma konfigurację  $R_p$ ,  $R_p$ . Odporność innych związków o konfiguracji  $R_p$  (**10b**, **17b**) może zostać wytłumaczone obecnością modyfikacji metylenobisfosfonianowej w pozycji  $\beta/\gamma$ . Wcześniejsze badania pokazały, że jej obecność prowadzi do zmniejszonej podatności na działanie DcpS.<sup>588</sup>

### 2.3.2.2.3. Inkorporacja do mRNA *in vitro*

#### 2.3.2.2.3.1. Ogólna procedura

Badanie inkorporacji do RNA przeprowadzono używając krótkich (48 nt) transkryptów syntezowanych przez wirusową polimerazę RNA T7 i znakowanych radioaktywnie przy pomocy [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP. Radioaktywne transkrypty otrzymane w obecności analogów kapu zostały oczyszczone a następnie poddane wysokorozdzielczej elektroforezie poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS PAGE).<sup>487</sup> Wydajność inkorporacji

wyznaczono densytometrycznie za pomocą autoradiografii opartej na wykorzystaniu ekranu typu Phosphorimager lub filmu X-ray.

#### 2.3.2.2.3.2. Tetrafosforanowe analogi $m^7Gpppm^7G$

Wydajność inkorporacji wyznaczono z pomocą autoradiografii opartej na wykorzystaniu ekranu typu Phosphorimager. Wydajności inkorporacji związków **14-17** zostały przedstawione w **Tab. 10**. Z uwagi na obecność dwóch reszt  $m^7Guo$  testowane związki stanowią funkcjonalne odpowiedniki analogów typu ARCA, zawsze ulegające inkorporacji we właściwej orientacji położenia reszty  $m^7Guo$  względem łańcucha RNA. Podobnie jak wcześniej badane tiofosforanowe analogi kapu, związki **14, 15** są dobrze rozpoznawane przez polimerazę T7, wydajność inkorporacji jest porównywalna z niemodyfikowanym analogie typu ARCA. Jednakże boranofosforanowe analogi **16, 17** wykazały się znacząco niższą wydajnością inkorporacji (~30%), co było dość zaskakujące biorąc pod uwagę, że wcześniej badane boranofosforanowe analogi kapu (wliczając  $m^7Gpp_{BH3}pm^7G$  posiadający podobną strukturę do związku **14**) były dobrymi substratami dla wirusowych polimeraz RNA.

#### 2.3.2.2.3.3. Analogi fluorescencyjne

Wydajność inkorporacji wyznaczono z pomocą autoradiografii opartej na wykorzystaniu filmu X-ray. Wydajności inkorporacji dla związków 1-5 zostały przedstawione w **Tab. 2.10**, wydajność dla związku macierzystego,  $m_2^{7,3-O}GpppG$  wyniosła  $72 \pm 2\%$ . Z uwagi na wprowadzenie modyfikacji do grupy 2' lub 3' hydroksylowe związki **18-22** stanowią funkcjonalne odpowiedniki analogów typu ARCA i powinny zawsze ulegać inkorporacji we właściwej orientacji położenia reszty  $m^7Guo$  względem łańcucha RNA. Porównując wyniki uzyskane dla znakowanych fluorescencyjnie związków widać, że modyfikacje (M)Ant są dobrze tolerowane przez polimerazę T7; zaobserwowano jednak niewielki spadek wydajności inkorporacji. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi dla analogów kapu znakowanych biotyną.<sup>688</sup>

#### 2.3.2.2.4. Odporność na Dcp2 *in vitro*

Z uwagi na to, że po inkorporacji do RNA, dinukleotydowe analogi kapu mogą stać się celem ataku enzymu Dcp2 postawiono przetestować odporność tak otrzymanych kapowanych transkryptów na działanie tego enzymu.

##### 2.3.2.2.4.1. Wybór i przygotowanie białka

We wcześniejszych pracach dotyczących badań odporności transkryptów RNA, posiadających zmodyfikowaną strukturę kapu, na dekaping wykorzystywano wyłącznie ludzkie białko Dcp2, pozbawione podjednostki regulatorowej Dcp1. Jednakże na potrzeby badań prowadzonych w ramach opisywanego projektu doktoranckiego zdecydowano się na wykorzystanie białka pochodzącego z drożdży *Schizosaccharomyces pombe*. Istniały dwa powody stojące za dokonaniem takiego wyboru. i) Drożdżowe kompleksy Dcp1/2 charakteryzują się większą stabilnością oraz są łatwiejsze w ekspresji i oczyszczaniu niż ludzkie białko. ii) Większość badań kinetycznych oraz strukturalnych nad tym kompleksem przeprowadzono używając białek pochodzących z *S. pombe* lub *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>375, 449, 450, 452, 455, 458, 645, 689-691</sup> Jeżeli nie zaznaczono inaczej, we wszystkich badaniach użyto kompleksu pochodzącego z *S. pombe*, wyizolowanego z bakterii *Escherichia coli*, złożonego z białka Dcp1 oraz konstrukt Dcp2<sub>1-243</sub> (katalitycznie aktywny fragment N-końcowy).

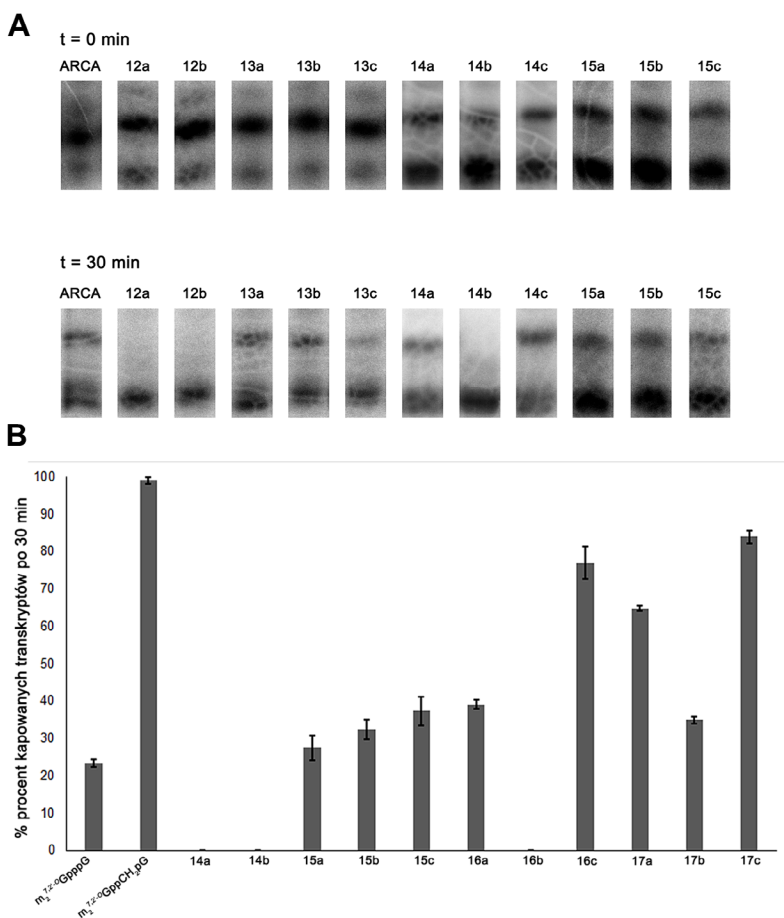
##### 2.3.2.2.4.2. Opis metody

Krótkie kapowane transkrypty (48 nt) zostały otrzymane przy wykorzystaniu polimerazy RNA T7 w obecności znakowanego radioaktywnie ATP. Następnie poddano je inkubacji z kompleksem SpDpc1/2. W wybranych punktach czasowych pobierano próbki, które po dezaktywacji enzymu poddano wysokorozdzielczej elektroforezie SDS PAGE. Relatywne ilości RNA wyznaczono za pomocą autoradiografii na filmie X-ray lub ekranie Phosphorimager

zakładając że intensywność radioaktywności jest proporcjonalna do ilości RNA. Ponieważ produktem reakcji enzymatycznej jest m<sup>7</sup>GDP oraz ufosforylowane RNA to przy użyciu wymienionej metody możliwe jest rozdzielanie kapowanego mRNA oraz produktu hydrolizy (**Rys. 2.17**) ze względu na odmienną szybkość migracji. Wyższy prążek na autoradiogramie odpowiada kapowanemu RNA podczas gdy niższy zawiera RNA po hydrolizie. Z uwagi na niecałkowitą wydajność inkorporacji kapu do RNA zawiera on też niewielki udział niekapowanego RNA, będącego produktem ubocznym syntezy prowadzonej przez polimerazę T7. Udział procentowy kapowanego RNA wyznaczono ze stosunku zmierzonej radioaktywności wyższego prążka do całkowitej radioaktywności niższego i wyższego prążka (patrz **Rys. 2.17** oraz **Rys 2.18**).<sup>487</sup> Poziom dekapingu został zdefiniowany jako spadek udziału frakcji kapowanego RNA w analizowanej próbce. Przy obliczaniu stopnia dekapingu udział niekapowanego RNA został wzięty pod uwagę poprzez odjęcie próby kontrolnej, do której nie dodano enzymu.

### 2.3.2.2.4.3. Tetrafosforanowe analogi m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G

Krótkie (48 nt) transkrypty zawierające analogi **14-17** poddano inkubacji z kompleksem dekapującym SpDcp1/2 wedle opisanej wcześniej procedury (**Tab. 2.10, Rys 2.17**). Zaobserwowano, że wszystkie diastereoizomery związku **14** były degradowane szybciej niż niemodyfikowany w łańcuchu fosforanowym analog typu ARCA, m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GpppG. Wynik ten był dość zaskakujący ponieważ wcześniejsze badania nad tiofosforanowymi analogami kapu sugerowały, że wprowadzenie dwóch atomów siarki do mostka fosforanowego w miejscu cięcia przez Dcp2 powinno znacząco poprawić jego stabilność lub przynajmniej mieć neutralny wpływ. Pomimo wprowadzenia szeregu modyfikacji analog kapu **15** wykazuje podobną podatność na degradację jak testowany analog ARCA. Podobnie jak w przypadku badanych wcześniej analogów modyfikowanych w pozycji niemostkowej zaobserwowano różnicę w stabilności dla poszczególnych diastereoizomerów. Wyniki te mogą sugerować, że w przypadku analogów modyfikowanych siarką **14, 15** zwiększone powinowactwo do Dcp2 jest skorelowane ze zwiększoną podatnością na hydrolizę.

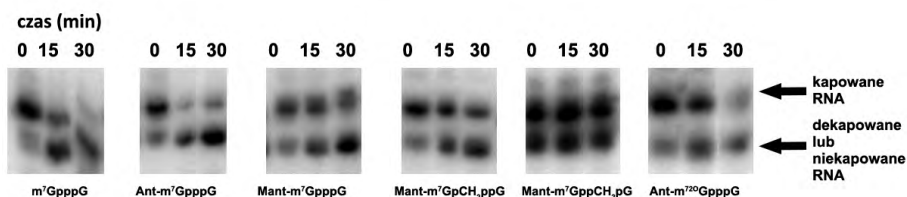


**Rys. 2.17.** Wyniki podatności na działanie Dcp2 dla tetrafosforanowych analogów kapu oraz analogu bez modyfikacji w łańcuchu fosforanowym (ARCA, m<sub>2</sub><sup>7,3'-O</sup>GpppG). Górny prążek reprezentuje kapowane transkrypty podczas gdy dolny mieszaninę transkryptów dekapowanych oraz pozbawionych struktury kapu (**A**) Pomiar postępu reakcji dekapingu wykonywano po 15 min oraz 30 min. (**B**) Podatność kapowanych transkryptów (100% oznacza pułę początkową) na degradację mierzona po 30 min reakcji, porównana zarówno do standardowego analogu ARCA jak i analogu kapu odpornego na degradację przez Dcp2 (m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GppCH<sub>2</sub>pG).

Boranofosforanowe analogi **16** i **17** wykazały się zróżnicowaną podatnością na degradację. Związek **17** posiada zwiększoną odporność na degradację niż niemodyfikowany analog ARCA co wykazuje zgodę z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi boranofosforanowych analogów kapu takich jak  $m_2^{7,2'-O}Gpp_{BH_3}pG$ . Z uwagi na obecność dwóch grup boranofosforanowych oraz mostka metylenowego oczekiwano, że będzie on wykazywać znaczący stopień odporności na działanie Dcp2. Wcześniejsze testy enzymatyczne na strukturalnie podobnym związku,  $m^7Gpp_{BH_3}pm^7G$ , pokazały, że jest on praktycznie całkowicie odporny na aktywność hydrolityczną tego enzymu. Jednakże żaden z diastereoizomerów analogu **17** nie wykazał tak wysokiej odporności. Bardziej zaskakujące wyniki uzyskano dla związku **16**, którego izomery wykazały bardzo zróżnicowaną podatnością na hydrolizę. Izomery D1 oraz D3 cechowały się znaczną odpornością na cięcie enzymatyczne podczas gdy izomer D2 był degradowany szybciej niż  $m_2^{7,2'-O}GpppG$ . Sugeruje to znaczącą zależność podatności na hydrolizę od konfiguracji na centrach stereogenicznych w mostku fosforanowym. Ponadto atomy fosforu o konfiguracji  $R_p$  mogą być bardziej podatne na cięcie.

#### 2.3.2.2.4.4. Analogi fluorescencyjne

Podobnie jak w poprzednim przypadku krótkie kapowane transkrypty (48 nt) poddano inkubacji z kompleksem SpDcp1/2. Związki **18-19** oraz **20** i **22** po inkorporacji do RNA były rozpoznawane i hydrolizowane przez SpDcp1/2. Szybkość hydrolizy była zredukowana w stosunku do kontroli pozytywnej, którą był analog typu ARCA bez modyfikacji w łańcuchu fosforanowym,  $m_2^{7,2'-O}GpppG$ . Zgodnie z przewidywaniami związek **21**, posiadający mostek metylenowy w pozycji  $\alpha/\beta$  nie wykazywał podatności na degradację przez SpDcp1/2 (**Tab. 2.10**, **Rys 2.18**).



**Rys. 2.18.** Wyniki podatności na działanie Dcp2 dla fluorescencyjnych analogów kapu. Pomiary postępu reakcji dekapingu wykonano po 15 oraz 30 min.

#### 2.3.2.2.5. Translacja *in vitro*

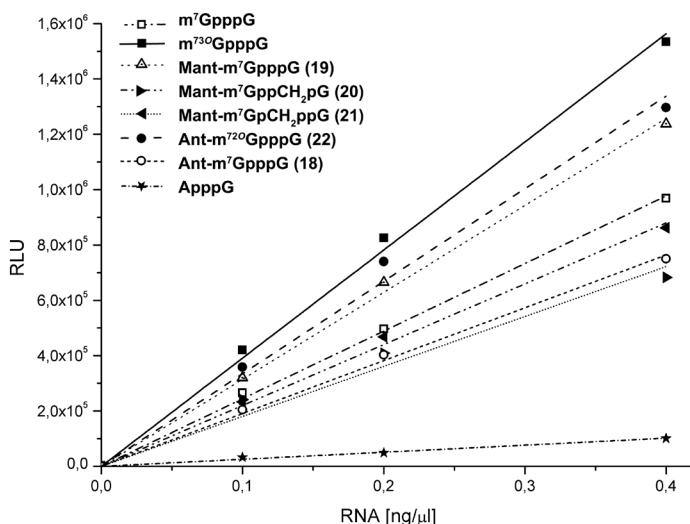
*Eksperymenty zostały przeprowadzone przez dr Macieja Łukaszewicza*

##### 2.3.2.2.5.1. Tetrafosforanowe analogi kapu

Z uwagi na obecność dwóch reszt  $m^7Guo$  w cząsteczce, analogi **13-17** mogą być uznane za funkcjonalne odpowiedniki analogów ARCA. W celu przetestowania czy takie związki mogą być dobrymi narzędziami do syntezy modyfikowanego mRNA wybrano dwa związki, **15** oraz **17** zostały zbadane *in vitro* korzystając z systemu translacyjnego RRL ustawionego na mRNA z lucyferazy świetlika (**Tab. 2.10**). Wszystkie zbadane transkrypty są rozpoznawane przez maszynę translacyjną a wydajność translacji jest nie niższa niż dla niemodyfikowanego w mostku fosforanowym analogu ARCA,  $m_2^{7,2'-O}GpppG$ . Podobnie jak dla badanych wcześniej analogów kapu zaobserwowano korelację pomiędzy wartościami  $K_{AS}$  (eIF4E) a wydajnością translacji dla każdego z szeregu diastereoizomerów. Duże różnice w wydajności translacji pomiędzy związkami **15** i **17** mogą być przynajmniej częściowo wyjaśnione przez niską wydajność syntezy kapowanych transkryptów dla związku **17**.

### 2.3.2.2.5.2. Analogi fluorescencyjne

Właściwości translacyjne mRNA zawierających fluorescencyjne analogi kapu zostały zbadane *in vitro* korzystając z systemu translacyjnego RRL (**Rys. 2.19** oraz **Tab. 2.10**). Z uwagi na wprowadzenie grupy funkcyjnej do pierścienia rybozy w reszcie m<sup>7</sup>Guo związku **18-22** mogą być uważane za funkcjonalne odpowiedniki analogów ARCA. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że wprowadzenie znaczników nie upośledza w znaczący sposób rozpoznania kapu przez eukariotyczną maszynę translacyjną (**Tab. 2.10**). Wydajność translacji związków **20** i **21** posiadających modyfikację metylenową w łańcuchu fosforanowym były niższe niż dla ich odpowiedników z niemodyfikowanym łańcuchem fosforanowym co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami nad analogami kapu modyfikowanymi grupą metylenową.



**Rys. 2.19.** Wydajność translacji znakowanych fluorescencyjnie analogów kapu w porównaniu do m<sup>7</sup>GpppG oraz m<sub>2</sub><sup>721-O</sup>-GpppG.

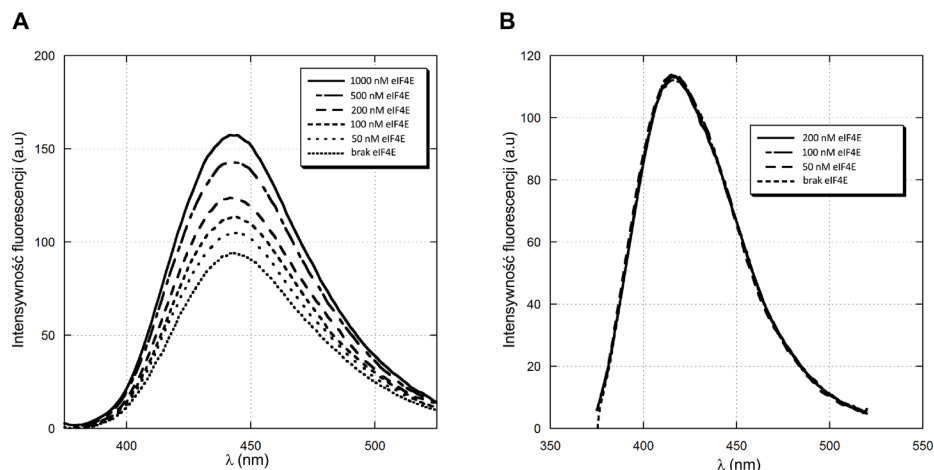
### 2.3.2.2.6. Wykorzystanie fluorescencyjnych analogów kapu w badaniach biofizycznych

#### 2.3.2.2.6.1. Doświadczenia modelowe

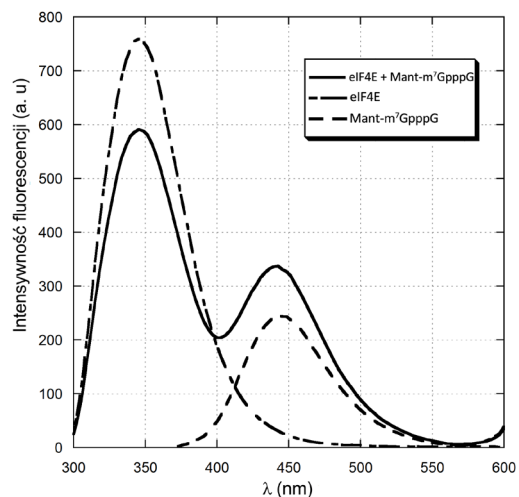
Wykonano podstawowe badania mające na celu sprawdzenie czy wrażliwość znacznika Mant na zmiany w lokalnej polarności otoczenia może być wykorzystana w badaniach degradacji enzymatycznej kapu lub oddziaływań białko-kap.

Pierwszy z modelowych eksperymentów opierał się na zastosowaniu związku **19** jako sondy fluorescencyjnej w badaniach oddziaływań białko-ligand. Do badań wykorzystano białko eIF4E, które dodawano do ustalonego stężenia znakowanego analogu kapu w eksperymencie „odwrotnego miareczkowania”. Wykazano, że przyrost intensywności fluorescencji znacznika zwiększał się w miarę dodawania kolejnych porcji białka (**Rys. 2.20A**). Efekt ten nie był obserwowany w przypadku analogicznego miareczkowania wykonanego względem estru metylowego mantranoilu, gdzie nie odnotowano zmian we fluorescencji znacznika (**Rys. 2.20B**). Przyrost fluorescencji dla analogu kapu może zostać przypisany zwiększeniu lokalnej hydrofobowości w otoczeniu grupy Mant, gdy cząsteczka kapu ulega wiązaniu przez eIF4E. Innym zaobserwowanym efektem była zmiana we fluorescencji grupy Mant w związku **2** gdy wzbudzone były reszty tryptofanu w eIF4E (**Rys. 2.21**).

W drugim eksperymencie modelowym związek **19** został wykorzystany jako substrat dla ludzkiego enzymu hDcpS (**Rys. 2.22**). Pomiar HPLC wykazały, że wspomniany związek jest hydrolizowany do Mant-m<sup>7</sup>GMP oraz GDP. Zaobserwowano, że intensywność fluorescencji Mant-m<sup>7</sup>GMP jest niższa niż dinukleotydowego substratu, co jest prawdopodobnie wywołane brakiem oddziaływań pomiędzy znacznikiem i hydrofobową zasadą azotową w dinukleotydzie. Po całkowitej hydrolizie **2** przez DcpS całkowity spadek fluorescencji próbki wyniósł ~60% w porównaniu do wartości początkowej dzięki czemu możliwy jest pomiar reakcji prowadzonej przez hDcpS za pomocą spektrofлуorymetru. Przeprowadzono trzy reakcje stosując następujące stężenia substratu: 50, 100, 200 nM, nawet przy najmniejszym ze stężeń zmiany poziomu fluorescencji były wystarczające do monitorowania



**Rys. 2.20.** Wrażliwość grupy Mant na zmiany w lokalnej polarności otoczenia wywołane przez oddziaływanie znacznika z białkiem. **(A)** Przyrost intensywności fluorescencji Mant- $m^7$ GpppG obserwowane po dodawaniu kolejnych porcji białka eIF4E. Stężenie analogu kapu wynosiło 200 nM a stężenie eIF4E było w zakresie 50-1000 nM. **(B)** Brak zauważalnej zmiany w intensywności fluorescencji grupy Mant w estrze metylowym, MantOMe po dodawaniu kolejnych porcji eIF4E. Stężenie estru wynosiło 200 nM a stężenie eIF4E było w zakresie 50-200 nM.

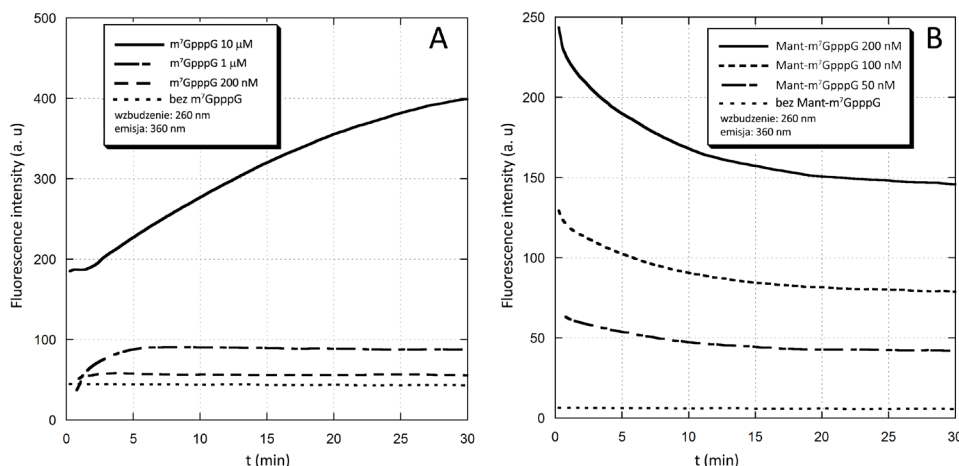


**Rys 2.21.** Rezonansowy transfer energii pomiędzy Mant- $m^7$ GpppG oraz resztami Trp w miejscu wiążącym kap białka eIF4E. Stężenie białka wynosiło 100 nM natomiast stężenia analogu kapu wynosiło 200 nM.

reakcji. Dla porównania, niemodyfikowane analogi kapu takie jak  $m^7$ GpppG także wykazują niewielką naturalną fluorescencję wynikłą z obecności 7-metyloguanozyny. W ramach postępu reakcji enzymatycznej z udziałem tego związku, prowadzonej przez hDcpS obserwuje się zauważalny przyrost fluorescencji. Wynika on z faktu, że brak oddziaływań warstwowych w  $m^7$ GMP, produkcie reakcji, pomiędzy zasadami azotowymi zwiększa wydajność kwantową fluorescencji. Jednakże minimalne stężenie  $m^7$ GpppG, jakie może zostać wykorzystane do pomiarów kinetycznych wynosi 1  $\mu$ M. Wprowadzenie znacznika Mant pozwala zatem na  $\sim$ 20-krotne zwiększenie czułości metody. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami nad specyficznością substratową DcpS, wprowadzenie podstawnika Mant w pozycję 2' lub 3' pierścienia 7-metyloguanozyny zmniejsza znacząco szybkość reakcji. Dzięki niedużym rozmiarom grupy Mant, znakowany analog kapu jest nadal relatywnie dobrym substratem dla hDcpS, w porównaniu do niemodyfikowanego związku.

### 2.3.2.2.6.2. Proponowane zastosowania

Związki takie jak analog **19** mogą w dalszej perspektywie wykorzystane jako sondy molekularne do badań przesiewowych nad poszukiwaniem inhibitorów DcpS. Wcześniej stosowane metody oparte na wykorzystaniu HPLC. Innym potencjalnym zastosowaniem są badania biofizyczne nad wiązaniem kapu przez białka takie jak eIF4E.



**Rys. 2.22.** Pomiar hydrolizy enzymatycznej nieznakowanego ( $m^7GpppG$ ) oraz znakowanego ( $Mant-m^7GpppG$ ) analogu kapu prowadzonej przez enzym DcpS za pomocą spektrofluorymetrii. **(A)** Niemodyfikowany  $m^7GpppG$  jest rozcinany przez DcpS do  $m^7GMP$  oraz GDP. Intensywność fluorescencji była mierzona dla długości fali charakterystycznych dla reszty  $m^7G$  (wzb = 260 nm, em = 360 nm) i wzrasta wraz z postępem reakcji ponieważ fluorescencja substratu jest częściowo wygaszona na skutek oddziaływań warstwowych pomiędzy resztami G i  $m^7G$ . Zmiany we fluorescencji były wystarczające do monitorowania postępu reakcji dla stężenia 1  $\mu M$  i wyższych. **(B)**  $Mant-m^7GpppG$  jest rozcinany przez DcpS do  $Mant-m^7GMP$  oraz GDP. Intensywność fluorescencji była mierzona dla długości fali charakterystycznych dla reszty Mant (wzb = 361 nm, em = 446 nm) i zanika wraz z postępem reakcji ponieważ fluorescencja znacznika w dinukleotydzie jest zwiększona przez intramolekularne oddziaływania z hydrofobową resztą G w drugim nukleotydzie. Zmiany we fluorescencji były wystarczające do monitorowania postępu reakcji dla stężenia 50 nM i wyższych, co oznacza 20-krotny przyrost czułości metody. Stężenie DcpS wynosiło 200 nM (eksperymenty z  $m^7GpppG$ ) lub 200 nM (eksperymenty z  $Mant-m^7GpppG$ ).

## 2.4. Wykorzystania analogów kapu do badań biochemicznych

### 2.4.1. Analogi kapu jako narzędzia do badania kompleksu dekapującego Dcp1/2

#### 2.4.1.1. Poszukiwanie nowych inhibitorów

##### 2.4.1.1.1. Uzasadnienie i motywacja

Enzym Dcp2 rozpoznaje i hydrolizuje strukturę kapu prowadząc do powstania  $m^7GDP$  oraz ufosforylowanego RNA. Proces ten jest istotny dla wielu ścieżek degradacji mRNA, które z kolei mają istotne znaczenie dla kontroli ekspresji genów oraz ocenę jakości transkryptów w komórce. Do tej pory udało się otrzymać kilka struktur krystalograficznych tego białka, dostępne są też dane strukturalne z technik takich jak spektroskopia NMR oraz SAXS (ang. *Small Angle X-ray Scattering*). Mimo tego nie udało się wypracować spójnego i jednolitego modelu tłumaczącego mechanizm działania tego enzymu. Jednym z powodów jest słabe powinowactwo Dcp2 do struktury naturalnie występującego kapu ( $m^7GpppN$ ), które wynosi  $\sim 10\text{-}20$  mM co utrudnia prowadzenie badań strukturalnych. Dlatego też odkrycie związków silniej wiążących się z tym białkiem mogłoby być niezwykle pomocne w takich badaniach.

Wcześniejsze badania nad analogami kapu modyfikowanymi w mostku fosforanowym pozwoliły na stwierdzenie, że część z nich po wprowadzeniu do RNA posiada zwiększoną odporność na działanie enzymu dekapującego Dcp2. Związki te zawierały modyfikacje mostkowe ( $CH_2$ ,  $NH$ ) w pozycji  $\alpha/\beta$  jak i niemostkowe ( $S$ ,  $BH_3$ ) w pozycjach  $\alpha$  lub  $\beta$  (patrz rozdział *Synteza chemiczna*). Badania nad wiązaniem  $m^7GDP$  przez drożdżowe białko Dcp2, przedstawione szerzej w części literaturowej, zasugerowały, że białko Dcp2 może posiadać dodatkowy mechanizm regulujący jego aktywność, oparty na zjawisku allosterii. Założono, że negatywnym regulatorem allosterycznym prawdopodobnie jest  $m^7GDP$ , produkt reakcji usuwania kapu. Ponadto uznano, że pochodne  $m^7GDP$  oraz inne analogi kapu posiadające modyfikacje w reszcie fosforanowej mogą wykazywać większy

potencjał inhibitorowy oraz wykazywać większą stabilność w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym. Podstawą takiego rozumowania były rezultaty wcześniejszych badań nad oddziaływaniami analogów kapu z białkami takimi jak eIF4E oraz DcpS. W wielu przypadkach obserwowano, że wprowadzenie modyfikacji do fragmentu ugrupowania polifosforanowego skutkuje wzrostem powinowactwa do białka.

Jak wspomniano, związki będące efektywnymi inhibitorami Dcp2 mogą znaleźć szereg zastosowań w badaniach strukturalnych oraz biochemicznych nad białkami oraz ich kompleksami biorącymi udział w usuwaniu struktury kapu oraz regulację obiegu mRNA. Dodatkowo lepsze poznanie mechanizmu ich wiązania do Dcp2 może być pomocne w projektowaniu przyszłych inhibitorów cechujących się silniejszym powinowactwem oraz większą selektywnością względem celów molekularnych.

#### 2.4.1.1.2. Badania przesiewowe

##### 2.4.1.1.2.1. Optymalizacja metody

W pierwszych próbach wykorzystano białko hDcp2 (N-końcowa domena GST-hDcp2<sub>1-257</sub>), które było też poprzednio stosowane w badaniach podatności na hydrolizę transkryptów posiadających zmodyfikowaną strukturę kapu. Wstępne wyniki były dość zachęcające bowiem zaobserwowano, że niemodyfikowane w łańcuchu fosforanowym analogi kapu takie jak m<sup>7</sup>GDP, m<sup>7</sup>GTP oraz m<sub>2</sub><sup>7,3'-O</sup>GpppG mają działanie inhibitorowe. Jednakże pojawiły się problemy z powtarzalnością wyników, zarówno dla wspomnianych związków jak i modyfikowanych analogów kapu, wynikające prawdopodobnie z różnej aktywności enzymatycznej próbek białka. Ponadto białko hDcp2 uzyskiwane z bakterii *E. coli* cechuje się częściową degradacją przez bakteryjne proteazy, co zostało też potwierdzone przy użyciu techniki Western-blot z użyciem dwóch odmiennych przeciwciał przeciw fragmentom hDcp2. Uznano, że takie białko można co prawda wykorzystać do testów przesiewowych i zgrubej selekcji inhibitorów ale nie jest dobrym materiałem do badań kinetycznych oraz strukturalnych. Dlatego też we wszystkich badaniach użyto kompleksu wyizolowanego z bakterii *E. coli*, złożonego z białka SpDcp1 oraz konstrukt SpDcp2<sub>1-243</sub> (katalitycznie aktywny fragment N-końcowy).

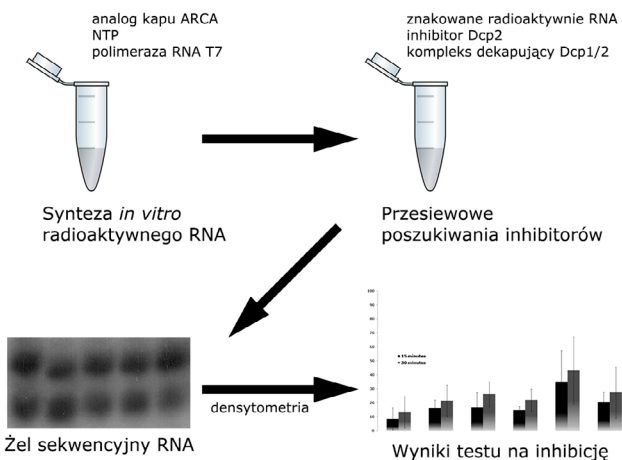
Po oczyszczeniu (grawitacyjna chromatografia powinowactwa oraz chromatografia wykluczania HPLC) oceniono czystość oraz aktywność enzymatyczną białka. Dobrano odpowiednie stężenia białka do transkryptów RNA by uzyskać całkowitą hydrolizę substratu w przeciągu około 30 min. Ponadto w celu oceny, czy w tak oczyszczonym białku nie znajdują się niespecyficzne pirofosfatazy bakteryjne przeprowadzono szereg testów z użyciem oczyszczonego w taki sam sposób białka SpDcp1, które nie wykazuje aktywności enzymatycznej. Pomiar te wykazały, że jedynie próbki zawierające kompleks SpDcp1/2 wykazują aktywność hydrolityczną względem transkryptów RNA. Wprowadzenie do transkryptów takich analogów kapu jak m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>CH<sub>2</sub></sub>pG lub m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pG zapewnia odpowiednio niepodatność na degradację lub znacząco zwiększa stabilność RNA względem SpDcp1/2.

##### 2.4.1.1.2.2. Badania analogów kapu

W badaniach wykorzystano bibliotekę molekularną, złożoną z 29 nukleotydów, w większości zawierających resztę m<sup>7</sup>G. Biblioteka składała się z kilku klas analogów kapu, mianowicie pochodnych m<sup>7</sup>GDP (związki **1-3**, m<sup>7</sup>GpSp D1, m<sup>7</sup>GpSp D2 oraz m<sup>7</sup>GppF), pochodnych m<sup>7</sup>GTP (związki **6-10**, **12**) oraz szeregu dinukleotydowych analogów kapu (związki **14-17**, m<sub>2</sub><sup>7,3'-O</sup>GpppG, m<sup>7</sup>GppppG). Badane związki posiadały jedną lub więcej modyfikacji, zarówno w pozycjach mostkowych (CH<sub>2</sub>, NH) oraz niemoostkowych (S, F, BH<sub>3</sub>). Ponadto, w ramach kontroli do biblioteki włączono zarówno kilka związków macierzystych pozbawionych modyfikacji w łańcuchu fosforanowym jak i powszechnie występujące trifosforany nukleozydów, ATP oraz GTP. Wcześniejsze badania na białkach oddziałujących ze strukturą kapu pokazały, że wprowadzenie wyżej wspomnianych modyfikacji do łańcucha fosforanowego może zwiększyć siłę oddziaływań kap-białko (patrz *Część literaturowa*).

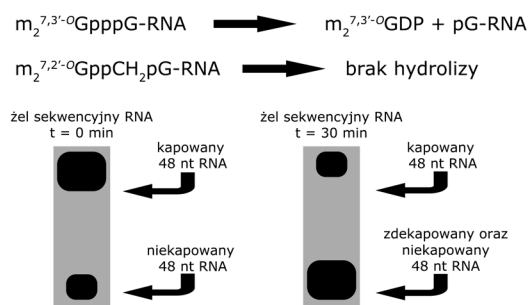
Wymienione związki zostały zbadane pod kątem inhibicji kompleksu SpDcp1/2. Zaadaptowano do tego technikę stosowaną wcześniej w badaniu podatności na dekaping krótkich transkryptów RNA. Metoda ta opierała się na wykorzystaniu znakowanych radioaktywnie transkryptów, które były inkubowane w obecności SpDcp1/2 oraz





**Rys. 2.23.** Uproszczony schemat badania przesiewowego inhibitorów Dcp1/2. Krótkie, kapowane transkrypty RNA zostały otrzymane *in vitro* i wyznakowane radioaktywnie. Użyto ich jako substratów dla reakcji hydrolizy kapu prowadzonej przez kompleks SpDcp1/2 w obecności testowanego nukleotydu. Pobrane próbki zostały poddane dezaktywacji termicznej i elektroforezie SDS PAGE w warunkach denaturujących. Po rozdziale elektroforetycznym uzyskano obraz autoradiograficzny, który poddano analizie densytmetrycznej.

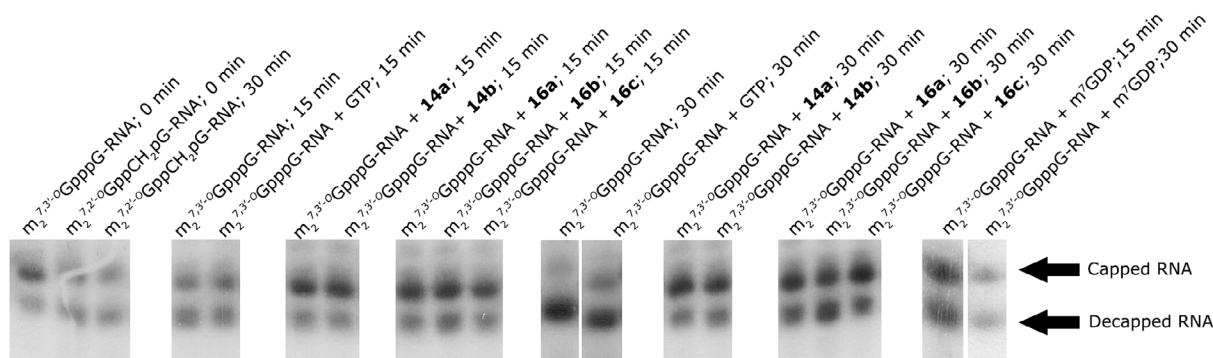
wybranego analogu kapu w stężeniu 200  $\mu\text{M}$  przez okres 0, 15 oraz 30 min. Warunki metody dobrano w ten sposób by po 30 minutach uzyskać całkowitą degradację kapowanego RNA, jeżeli w próbce nie znajduje się związek będący działającym inhibitorem Dcp1/2. (**Rys. 2.23** oraz **Rys. 2.24**). Jako kontrolę negatywną wykorzystano RNA zawierające  $m_2^{7,2'-O}\text{Gpp}_{\text{CH}_2}\text{pG}$ , które jest odporne na działanie SpDcp1/2. Podobnie jak w przypadku opisywanych wcześniej badań podatności transkryptów na działanie Dcp1/2 w badaniach przesiewowych posłużono się wysokorozdzielczą elektroforezą typu SDS PAGE oraz autoradiografią opartą na filmie X-ray (**Rys. 2.25**).



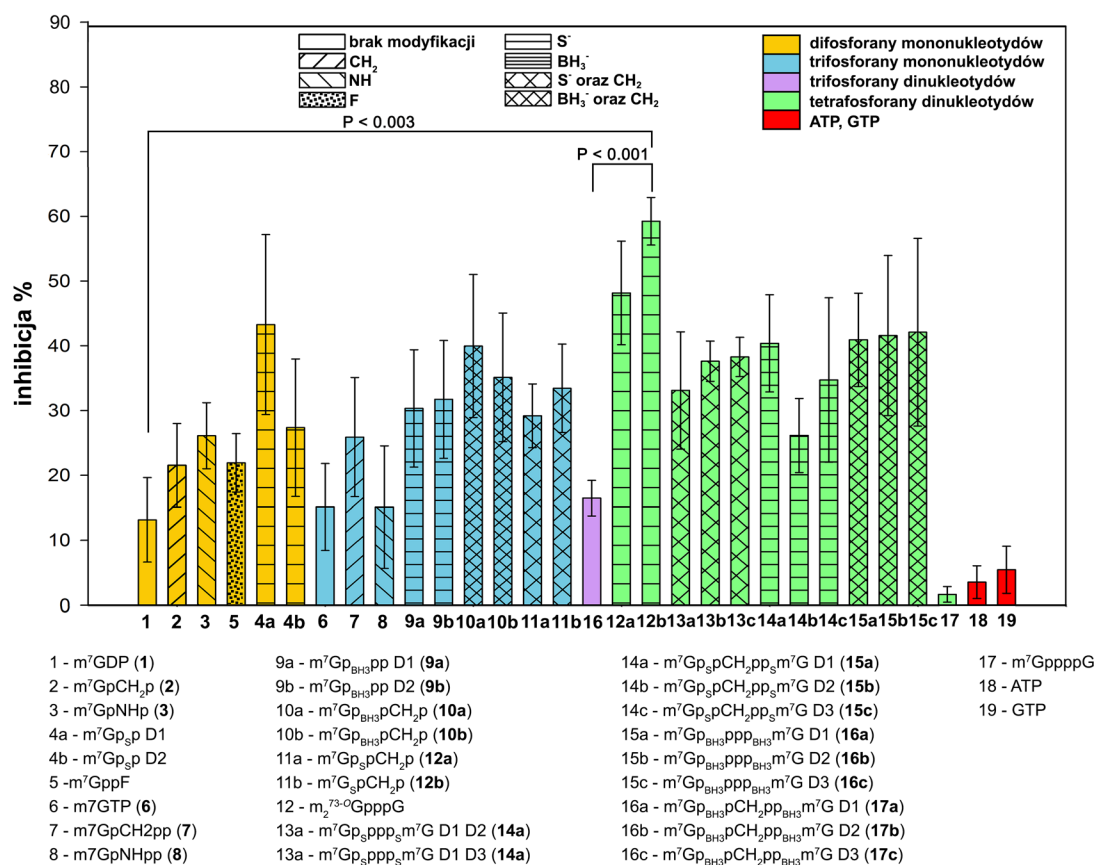
**Rys. 2.24.** Hydroliza kapu przez Dcp1/2. RNA zawierające  $m_2^{7,3'-O}\text{GpppG}$  RNA jest rozcinane do  $m_2^{7,3'-O}\text{GDP}$  oraz ufosforylowanego RNA podczas gdy RNA zawierające  $m_2^{7,2'-O}\text{Gpp}_{\text{CH}_2}\text{pG}$  jest niewrażliwe na hydrolizę. Postęp reakcji jest widoczny na żelu z uwagi na różnicę w masie cząsteczkowej oraz rozkład ładunku w kapowanym i zdekapowanym transkrypcie.

Na podstawie otrzymanych wyników (**Tab. 2.11**, **Rys. 2.26**) wyników można wyciągnąć kilka ogólnych konkluzji na temat właściwości inhibitorowych testowanych nukleotydu. Analogi kapu pozbawione modyfikacji ( $m^7\text{GDP}$ ,  $m^7\text{GTP}$ ,  $m_2^{7,3'-O}\text{GpppG}$ ), nie wykazały pożądanych właściwości inhibitorowych, zaobserwowane efekty były minimalne, także gdy łańcuch fosforanowy został wydłużony do tetrafosforanu (**Rys. 2.26**). Te wyniki wykazują zgodność ze wcześniejszymi badaniami za pomocą spektroskopii NMR, gdzie wyznaczono wartości dla stałych dysocjacji,  $K_d$  dla kilku kompleksów nukleotydu-Dcp2. Wartości  $K_d$  były w zasięgu 10-30 mM co świadczy o relatywnie niskim powinowactwie do enzymu.<sup>455</sup> Ponadto nie zaobserwowano żadnych statystycznie istotnych różnic pomiędzy właściwościami inhibitorowymi  $m^7\text{GDP}$  oraz  $m_2^{7,3'-O}\text{GpppG}$  (test t-Studenta,  $P = 0,659$ ). Z drugiej strony analogi kapu 14-17 były silniejszymi inhibitorami Dcp2. W szczególności diastereoizomery związku **14** ( $m^7\text{Gp}_s\text{ppp}_s m^7\text{G}$ ), **14a** (mieszanka izomerów D1 i D2) oraz **14b** (izomer D3) okazały się jednymi z najsilniejszych inhibitorów spośród testowanych związków. Właściwości inhibitorowe nukleotydu **14b** są statycznie silniejsze niż te wykazywane przez  $m^7\text{GDP}$  lub  $m_2^{7,3'-O}\text{GpppG}$  (test t-Studenta, odpowiednio  $P = 0,003$  lub  $P = 0,001$ ). Wprowadzenie mostka metylenowego zarówno do analogów tio- jak i boranofosforanowych nie ma istotnego wpływu na efektywność inhibicji.

Z powodu ograniczeń czasowych zdecydowano się na wybranie jednego analogu kapu i poddanie go dokładnym badaniom kinetycznym i strukturalnym mającym na celu zrozumienie mechanizmu inhibicji. Uznano, że związek **14b** będzie najbardziej obiecującym kandydatem ponieważ w badaniach przesiewowych wykazał największy potencjał inhibitorowy. Ponadto w odróżnieniu od związków **15-17** jest on łatwiejszy do wydzielenia w postaci czystego diastereoizomeru z uwagi na dużą różnicę w czasie retencji podczas rozdzielów półpreparatywnych na RP HPLC.



**Rys. 2.25.** Przykładowy obraz żelu sekwencyjnego. Pod nieobecność inhibitorów Dcp2 kap jest szybko usuwany z transkryptów przez Dcp1/2 i jedynie transkrypty zawierające  $m_2^{7,2'-O}GppCH_2pG$  są odporne na degradację. W obecności analogów kapu takich jak **14a-b** oraz **16a-c** po 30 minutach reakcji enzymatycznej znaczący ułamek liczby oligonukleotydów posiada nienaruszoną strukturę kapu.



**Rys. 2.26.** Właściwości inhibitorowe testowanych analogów kapu. Tetrafosforanowe analogi kapu **14-17** są lepszymi inhibitorami zarówno od  $m^7GDP$  (produktu reakcji dekapingu prowadzonej przez Dcp2) jak i niemodyfikowanego w łańcuchu fosforanowym analogu  $m_2^{7,3'-O}GpppG$ . Co ciekawe di- oraz trifosforany  $m^7Guo$  także wykazują zauważalne właściwości inhibitorowe ( $m^7Gp$ , **9**, **10**, **12**). Wszystkie eksperymenty zostały powtórzone 3-krotnie.

**Tab. 2.11.** Wyniki badań zdolności inhibitorowych względem Dcp2 dla wybranych nukleotydów.

Związek	Skrót	% inhibicji <sup>1</sup>	
		15 min	30 min
m <sup>7</sup> GDP	<b>1</b>	8,5 ± 4,5	13,1 ± 6,5
m <sup>7</sup> Gp CH <sub>2</sub> p	<b>2</b>	16,2 ± 3,3	21,5 ± 6,4
m <sup>7</sup> GpNHp	<b>3</b>	16,6 ± 6,1	26,1 ± 5,1
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> p D1	-	20,7 ± 4,1	27,4 ± 10,6
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> p D2	-	35,0 ± 12,9	43,3 ± 13,9
m <sup>7</sup> GppF	-	14,9 ± 1,2	21,9 ± 4,5
m <sup>7</sup> GTP	<b>6</b>	0,8 ± 0,6	15,1 ± 6,7
m <sup>7</sup> Gp CH <sub>2</sub> pp	<b>7</b>	8,3 ± 5,2	25,9 ± 9,2
m <sup>7</sup> GpNHpp	<b>8</b>	17,2 ± 12,6	15,1 ± 9,4
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp D1	<b>9a</b>	22,1 ± 7,9	30,3 ± 9,1
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp D2	<b>9b</b>	42,8 ± 18,2	31,7 ± 9,1
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p D1	<b>10a</b>	43,0 ± 16,5	40,0 ± 19,1
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> p D2	<b>10b</b>	24,4 ± 10,6	35,1 ± 11,0
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> p D1	<b>12a</b>	10,1 ± 2,6	29,2 ± 4,9
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> p D2	<b>12b</b>	28,2 ± 9,4	33,4 ± 6,8
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D1/D2	<b>14a</b>	49,4 ± 9,2	48,2 ± 6,8
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	<b>14b</b>	66,2 ± 3,2	59,2 ± 3,7
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D1	<b>15a</b>	29,9 ± 12,2	33,1 ± 9,1
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D2	<b>15b</b>	24,9 ± 4,9	37,6 ± 3,1
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	<b>15c</b>	35,6 ± 9,9	38,3 ± 3,0
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> ppp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D1	<b>16a</b>	36,9 ± 6,0	40,4 ± 7,5
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> ppp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D2	<b>16b</b>	29,6 ± 3,7	26,1 ± 5,7
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> ppp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D3	<b>16c</b>	41,4 ± 4,0	34,7 ± 12,5
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D1	<b>17a</b>	29,0 ± 4,8	40,9 ± 7,2
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D2	<b>17b</b>	38,3 ± 12,2	41,6 ± 12,4
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pCH <sub>2</sub> pp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G D3	<b>17c</b>	21,9 ± 6,5	42,1 ± 12,4
m <sup>730</sup> GpppG	-	10,3 ± 3,1	16,4 ± 2,7
m <sup>7</sup> GppppG	-	9,3 ± 1,8	1,7 ± 1,2
GTP	-	2,4 ± 2,0	5,5 ± 3,6
ATP	-	4,4 ± 0,5	3,5 ± 2,5

<sup>1</sup> Błąd to s.e.m

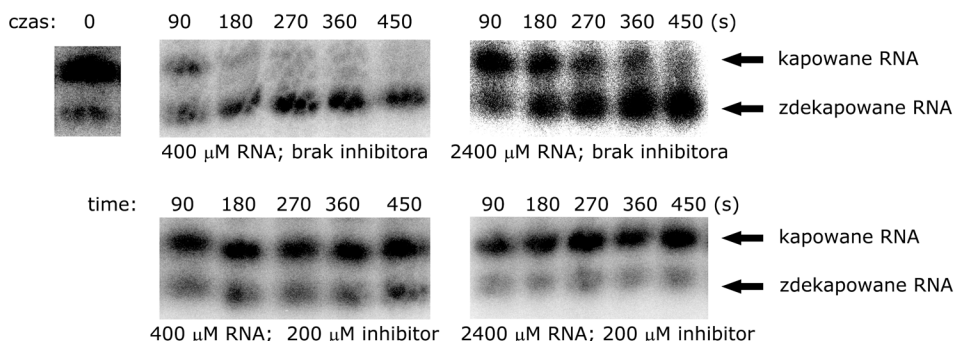
## 2.4.1.2. Badania kinetyki inhibicji

### 2.4.1.2.1. Kinetyka w warunkach wielokrotnego obrotu

Wcześniejsze badania na temat mechanizmu reakcji dekapingu wychodziły z założenia, że proces ten może zostać przybliżony za pomocą kinetyki Michaelisa-Menten (M-M) i dlatego zdecydowano się na wykorzystanie tego uproszczenia w celu określenia mechanizmu inhibicji i wyznaczenia parametrów kinetycznych go opisujących. Dokładny opis metod badania kinetyki enzymatycznej oraz określania mechanizmów inhibicji został zawarty w *Części literaturowej*.

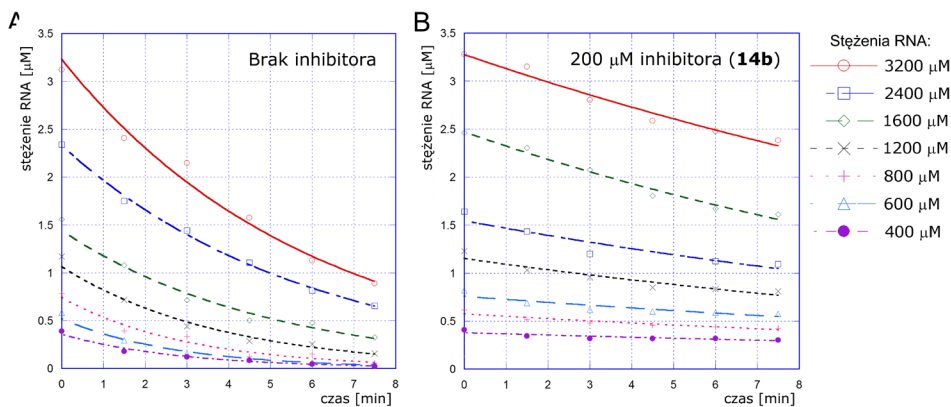
Zastosowano metodykę podobną jak w badaniach przesiewowych – wykorzystano znakowane radioaktywnie transkrypty, które były inkubowane w obecności SpDcp1/2 oraz inhibitora **14b** w różnych stężeniach. Warunki metody dobrano w ten sposób by po 10 minutach uzyskać całkowitą degradację kapowanego RNA. Reakcje były hamowane przez dodanie buforu do rozdzielu elektroforetycznego oraz następczą ogrzewanie. Metoda ta pozwoliła skrócić i uprościć procedurę stosowaną wcześniej (precypitacja i oczyszczanie RNA). Ponadto zastosowano bardziej skondensowany żel (16% akrylamidu) oraz inną metodę detekcji (ekran typu Phosphorimager) co w tym przypadku wydłużyło czas prowadzenia eksperymentów ale pozwoliło na uzyskanie lepszych danych kinetycznych (**Rys. 2.27**). Na podstawie uzyskanych danych densytometrycznych wyznaczono stałe szybkości  $k_{obs}$  dla poszczególnych stężeń substratu i na tej podstawie wyznaczono podstawowe parametry kinetyczne  $K_M$  oraz  $V_{max}$  (**Rys. 2.28A**). Użyto do tego zarówno zlinearyzowanego równania Michaelis-Menten pod postacią równania Eadie-Hofstee jak i posłużoną się regresją nieliniową dopasowując dane kinetyczne do hiperbolicznego równania M-M. Wyniki uzyskane za pomocą obydwu metod okazały się bardzo zbieżne (**Rys. 2.29**) i zostały porównane z danymi literaturowymi. Uzyskane wartości  $K_M$  i  $V_{max}$  wynoszące odpowiednio  $0,98 \pm 0,23$  oraz  $0,49 \pm 0,06$  zestawiono z wartościami literaturowymi dla kompleksu SpDcp2<sub>1-243</sub> ( $K'_M = 4,33 \pm 0,49 \mu M$  oraz  $k_{max} = 0,619 \pm 0,031 \text{ min}^{-1}$ )<sup>455</sup>. Dane te są do siebie stosunkowo zbieżne, obserwowane różnice wynikają z odmiennej temperatury prowadzenia pomiarów oraz z faktu, że  $K'_M$  wyznaczana w tej metodzie nie jest dokładnie tożsama z  $K_M$  wyznaczaną w metodzie wielokrotnego obrotu (patrz *Część literaturowa*).

Pomiary kinetyczne uzyskane w obecności inhibitora **14b** w stężeniu 200  $\mu\text{M}$  (takie samo jak w badaniach przesiewowych) uwidoczniły jakościowo znaczący potencjał inhibitorowy badanego analogu kapu (**Rys. 2.27** i **2.28B**). Co istotne użycie mniejszych stężeń inhibitora (50 lub 100  $\mu\text{M}$ ) miało nieduży wpływ na działanie enzymu. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest to, że stała dysocjacji  $K_d$  dla inhibitora wynosi w warunkach reakcji  $\sim 100\text{-}200$   $\mu\text{M}$  i mniejsze stężenie **14b** prowadzi do słabego wiązania się z enzymem.

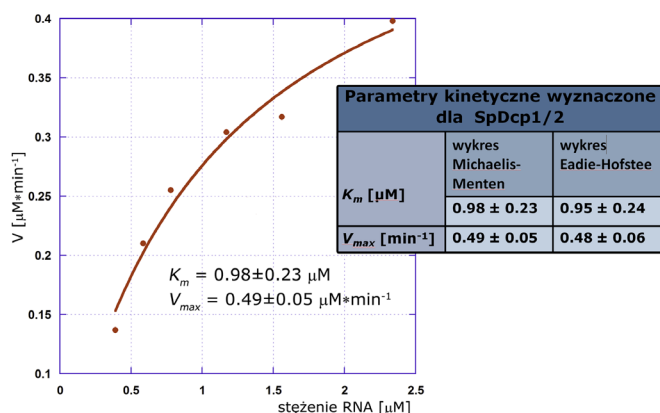


**Rys. 2.27.** Przykładowy obraz żelu sekwencyjnego dla dwóch różnych stężeń RNA (400  $\mu\text{M}$  i 2400  $\mu\text{M}$ ) w nieobecności lub po dodaniu inhibitora **14b**. W pierwszym przypadku obserwowany jest szybka degradacja kapu - zanik substratu jest widoczny po kilku minutach. Dodanie 200  $\mu\text{M}$  inhibitora prowadzi do efektywnego zastopowania reakcji.

W miarę kontynuowania badań napotkano na znaczące problemy z ilościową analizą zgromadzonych danych kinetycznych oraz próbą dopasowania modelu inhibicji. W zastosowanych warunkach zaobserwowano bowiem silne wypłaszczenie krzywych zaniku substratu w funkcji czasu (**Rys. 2.28B**) dla 200  $\mu\text{M}$  inhibitora, co uniemożliwiło wyznaczenie  $k_{\text{obs}}$  z dokładnością potrzebną do dalszego wyznaczenia parametrów inhibicji takich jak  $K_i$  lub  $K'_i$ . Dlatego też zrezygnowano z dalszych badań kinetycznych z wykorzystaniem tej metody.



**Rys. 2.28.** postępek reakcji dekapingu prowadzonej przez SpDcp2 dla szeregu stężeń RNA prowadzony (**A**) pod nieobecność inhibitora oraz (**B**) w obecności 200  $\mu\text{M}$  inhibitora **14b**.



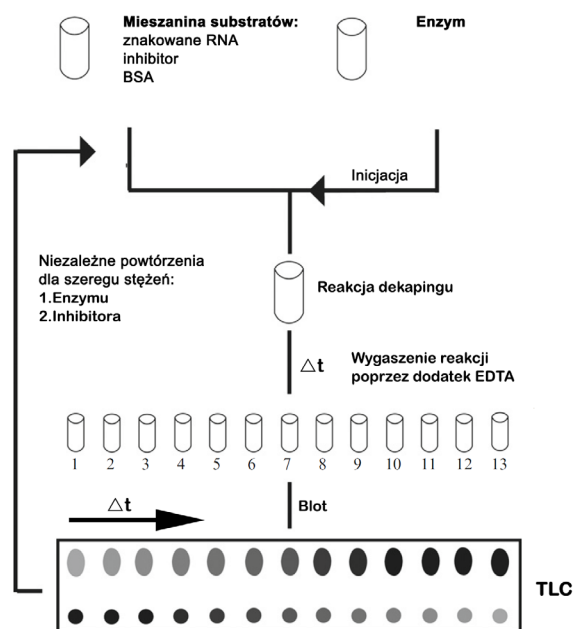
**Rys. 2.29.** Przykładowe dopasowanie równania Michaelisa-Menten do danych eksperymentalnych oraz wyznaczone w ten sposób parametry  $K_M$  oraz  $V_{\text{max}}$  oraz uśrednione wartości tych parametrów wyznaczone przy pomocy wykresów Michaelis-Menten oraz Eadie-Hofstee.

## 2.4.1.2.2. Kinetyka w warunkach pojedynczego obrotu

*Eksperymenty zostały przeprowadzone przez Jeffreya Mudrigde, PhD*

### 2.4.1.2.2.1. Opis metody

Z uwagi na niepowodzenie w zastosowaniu kinetyki wielokrotnego obrotu zdecydowano się na zaadaptowanie wcześniej stosowanej metody badania kinetyki Dcp1/2 do pomiarów inhibicji. Metoda ta opiera się na pomiarach kinetycznych w warunkach pojedynczego obrotu enzymu (ang. *single turnover*, dokładny opis w *Części literaturowej*). W metodzie tej stosuje się znaczny nadmiar enzymu względem substratu a uzyskane dane na temat stałych kinetycznych pozwalają na wyznaczenie parametrów  $K'_M$  jak i  $k_{max}$  oraz określenie mechanizmu inhibicji. Schemat metody stosowanej w badaniach SpDcp1/2 przedstawiono na **Rys. 2.30**. Jako substrat wykorzystano enzymatycznie kapowane oligonukleotydy RNA (29 nt) pozbawione zdefiniowanej struktury drugorzędowej oraz posiadające znakowany radioaktywnie kap (patrz *Materiały i metody*). Mieszanina substratów jest mieszana z enzymem co inicjuje reakcję, z uwagi na bardzo małe stężenie substratu reakcje są prowadzone w obniżonej temperaturze a kolejne próbki są zbierane w odstępach kilkunastu sekund. Zebrane próbki są nanoszone na płytki TLC i postęp reakcji jest śledzony za pomocą autoradiografii. Surowe dane uzyskiwane z analizy densytometrycznej są wykorzystywane do wyznaczenia parametrów opisujących kinetykę reakcji oraz model inhibicji.



**Rys. 2.30.** Schemat metody stosowanej w badaniach kinetyki *single turnover*. Zaadaptowano i zmodyfikowano na podstawie *Methods in Enzymology*, 2008, 448, 23-40.

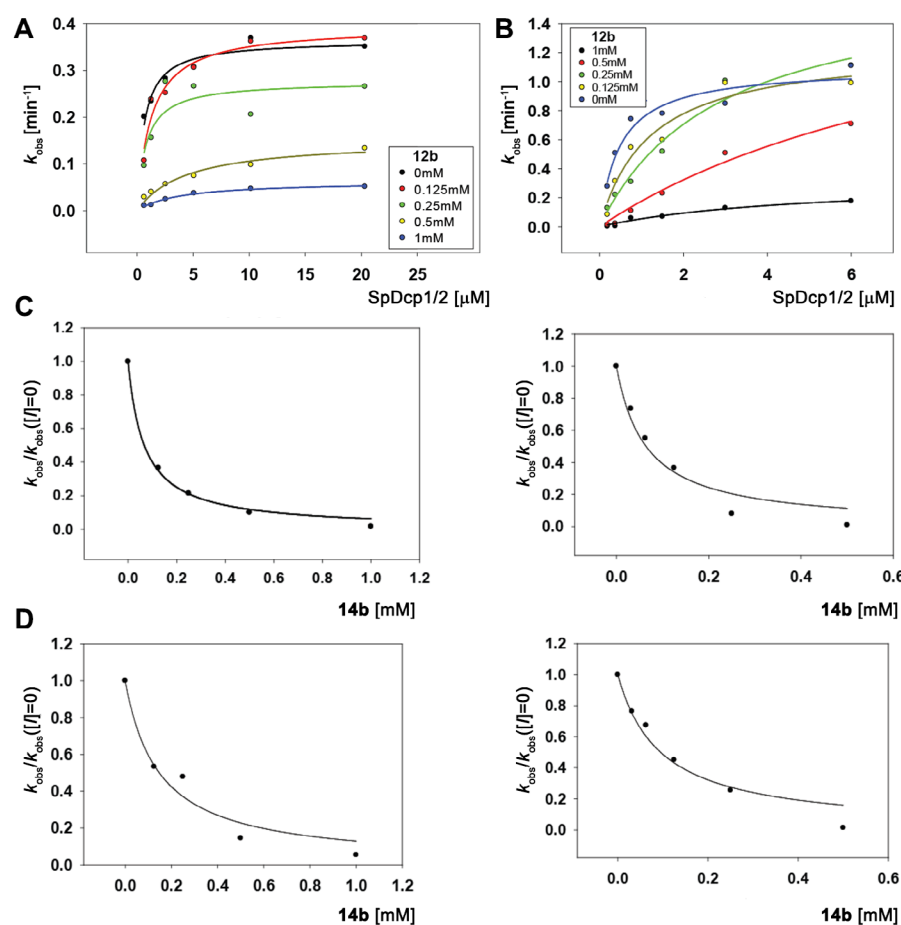
### 2.4.1.2.2.2. Badanie mechanizmu inhibicji

Podstawowe parametry kinetyczne dla reakcji dekapingu przez kompleks SpDcp1/2 zostały wyznaczone we wcześniejszych badaniach<sup>452, 455</sup>. Wykresy  $k_{obs}$  w funkcji stężenia enzymu wykonane dla różnych stężeń inhibitora pozwoliły na wyznaczenie empirycznej  $K_M$  dla tego enzymu. Pod obecność 1 mM inhibitora **14b** parametr ten wzrasta 5-krotnie podczas gdy  $k_{obs}$  spada 3-krotnie (**Rys. 2.31**). Uzyskane wyniki wskazują, że **14b** jest mieszanym inhibitorem zdolnym do odwracalnego wiązania się zarówno z wolnym enzymem (zwiększanie wartości  $K_M$ ) jak i kompleksem enzym-substrat (obniżenie wartości  $k_{max}$ ). W celu oszacowania powinowactwa **14b** do wolnego enzymu ( $K_I$ ) wykonano pomiary  $k_{obs}$  dla reakcji dekapingu stosując różne stężenia inhibitora utrzymując cały czas stężenie enzymu poniżej wartości  $K_M$  dla wiązania użytego w doświadczeniach fragmentu RNA. Takie warunki prowadzą do sytuacji w której większość cząsteczek enzymu nie jest związana z substratem przez co inhibitor wiąże się prawie wyłącznie z wolnym enzymem. W zadanym w ten sposób warunku brzegowym ( $[E] \gg [ES]$ ,

niecałkowite wysycenie enzymu), stosując kinetykę pojedynczego obrotu można posłużyć się znormalizowanym wykresem  $k_{obs}$  w funkcji stężenia inhibitora by korzystając z **Rów. 2.1** wyznaczyć numerycznie wartość parametru  $K_i$  (wyprowadzenie równań kinetycznych i szersza dyskusja znajduje się w *Części literaturowej*).

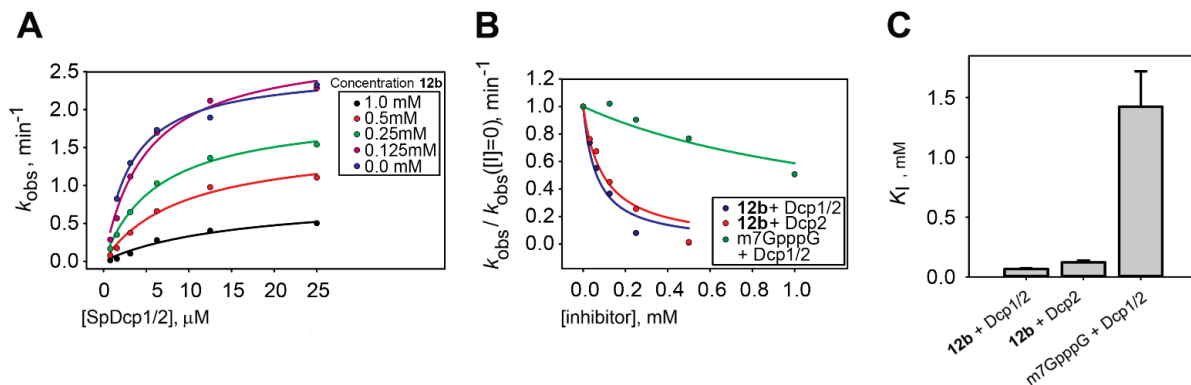
$$\frac{k_{obs}}{k_{obs}([I]=0)} = \frac{1}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Rów. 2.1}$$

Dla kompleksu SpDcp1/2 wartość  $K_i$  dla związku **14b** wynosi  $65 \pm 7 \mu\text{M}$ , a dla wolnego Dcp2  $K_i$  wynosi  $121 \pm 16 \mu\text{M}$  (**Rys. 2.32**). Dane te świadczą o tym, że **14b** wiąże się ponad 20 razy silniej do Dcp1/2 niż niemodyfikowany analog kapu, m<sup>7</sup>GpppG posiadają  $K_i$  o wartości  $1400 \pm 300 \mu\text{M}$ . Oznacza to, że związek **14b** jest znacznie silniejszym inhibitorem Dcp2 niż wcześniej badane analogi kapu i inne nukleotydy.

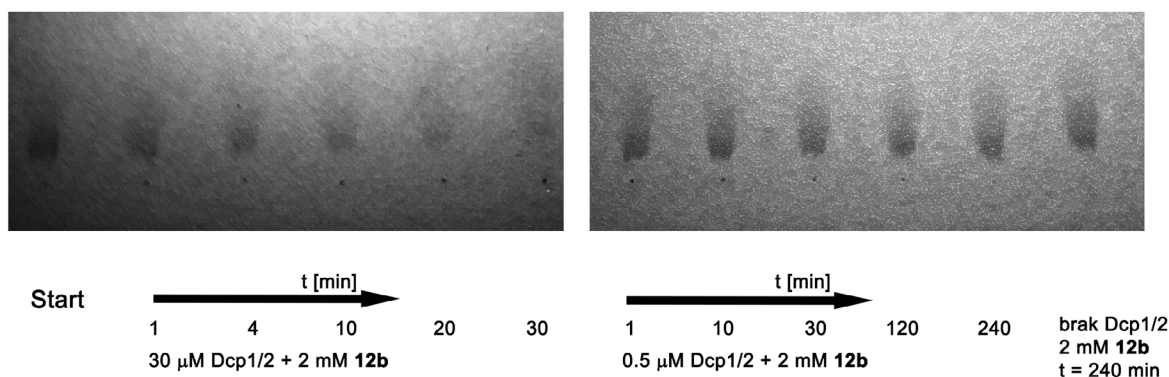


**Rys. 2.31.** Dane uzyskane z badań inhibicji SpDcp1/2 przez analog kapu **14b**. (**A**, **B**) Szybkość reakcji wyznaczona przy wzrastających stężeniach inhibitora przy użyciu substratu (29 nt kapowane RNA) otrzymanego w dwóch niezależnych syntezach. W przypadku syntezy **a** (**A**) uzyskano wyższe wartości  $K_M^{app}$  niż dla syntezy **b** (**B**). (**C**) Wyznaczanie wartości  $K_i$  dla kompleksu SpDcp1/2 w warunkach niecałkowitego wysycenia enzymem (stężenie SpDcp1/2 poniżej wartości  $K_M$  dla użytego substratu). Użyto odpowiednio 0,8  $\mu\text{M}$  SpDcp2, RNA z syntezy **a** oraz 0–1 nM **14b** (lewo) lub 0,1  $\mu\text{M}$  SpDcp1/2, RNA z syntezy **b** oraz 0–1 nM **14b** (pravo). (**D**) Wyznaczanie wartości  $K_i$  dla SpDcp2 w warunkach niecałkowitego wysycenia enzymem (stężenie SpDcp1/2 poniżej wartości  $K_M$  dla użytego substratu). Użyto odpowiednio 0,8  $\mu\text{M}$  SpDcp2, RNA z syntezy **a** oraz 0–1 nM **14b** (lewo) lub 0,1  $\mu\text{M}$  SpDcp2, RNA z syntezy **b** oraz 0–1 nM **14b** (pravo).

Z uwagi na to, że **14b** jest mieszanym inhibitorem, wykazującym powinowactwo do kompleksu  $ES$ , to wartość  $K'_i$  opisująca wartość tego oddziaływania może zostać w teorii wyznaczona przez pomiar  $k_{obs}$  w funkcji stężenia inhibitora dla drugiego warunku brzegowego ( $[ES] \gg [S]$ ), gdzie prawie cały substrat jest wysycony przez enzym. Interesującym faktem jest to, że w opisanych warunkach obserwowana jest powolna hydroliza badanego związku co wskazuje, że związek **14b** jest rozpoznawany przez centrum katalityczne kompleksu (patrz następny rozdział). Proces ten zachodzi w podobnych skalach czasowych jak dekaping RNA co utrudnia dobrą estymację parametru  $K'_i$ . Jednakże w warunkach niecałkowitego wysycenia enzymu hydroliza nie była obserwowana.



**Rys. 2.32.** Zbiorcze wyniki badań kinetycznych dla inhibicji SpDcp1/2 przez analog kapu **14b**. (A) Wyznaczenie  $K_M^{app}$  oraz  $k_{max}$  dla różnych stężeń inhibitora. Wartość  $K_M^{app}$  zwiększa się 5-krotnie natomiast wartość  $k_{max}$  zmniejsza się 3-krotnie w obecności 1 mM inhibitora pokazując, że **14b** jest mieszanym inhibitorem wykazującym powinowactwo zarówno do enzymu w formie *apo* oraz kompleksu ES. (B) Dopasowanie **równania 2.1** – zmiana normalizowanych danych kinetycznych ( $k_{obs}/k_{obs}([I]=0)$ ) w funkcji stężenia **14b**. (C) Wykres słupkowy pokazujący wyznaczone wartości  $K_i$  dla **14b** z SpDcp1/2 i SpDcp2 oraz m<sup>7</sup>GpppG z SpDcp2. Analog kapu wiąże się ~20-krotnie mocniej niż niemodyfikowany analog kapu, m<sup>7</sup>GpppG.



**Rys. 2.33.** Kontrolny test na hydrolizę **14b** przez DcpS w warunkach kinetyki pojedynczego obrotu. Związek **14b** w stężeniu 2 mM inkubowano w buforze reakcyjnym z 30 μM (lewo) lub 0,5 μM (pravo) SpDcp1/2 bez dodatku RNA. Próbkę były pobierane w wybranych punktach czasowych oraz inaktywowane przez dodanie EDTA. Związek **14b** jest widoczny na płytach celulozowych PET/F. Przy większym stężeniu enzymu po 30 min zaobserwowano znaczący rozpad **14b**. Przy niższym stężeniu enzymu w przeciągu 4 h nie zaobserwowano zauważalnych oznak degradacji. W takich warunkach wyznaczano wartości  $K_i$  zatem hydroliza **14b** nie miała znaczącego wpływa na uzyskane dane. Ponieważ **14b** jest szybko degradowany przy dużym stężeniu enzymu to wartości  $K_i$  nie mogły zostać dokładnie wyznaczone.

#### 2.4.1.2.3. Aktywność katalityczna kompleksu SpDcp1/2 względem wolnych analogów kapu

Od długiego czasu uważa się, że białko Dcp2 wykazuje aktywność katalityczną jedynie wobec kapowanych transkryptów o długości większej niż ~20 nt. Wykonane wcześniej badania nie obejmowały jednak analogów kapu zawierających zmodyfikowany mostek fosforanowy. Obserwacje dokonane podczas pomiarów kinetycznych wskazały, że związek **14b** jest substratem dla kompleksu Dcp1/2 co mogło sugerować, że inne modyfikacje w łańcuchu fosforanowym także mogą predysponować analogi kapu do podlegania degradacji przez Dcp2. Ponadto pomiary NMR także wskazały, że **14b** jest wolno hydrolizowany do mieszaniny dwóch związków (**Rys 2.34A**).





W eksperymencie związki były inkubowane w buforze zawierającym SpDcp2, po zadany czasie próbka była inaktywowana termicznie i badana na HPLC. Na podstawie tych badań ustalono wstępnie następujące fakty dotyczące specyficzności substratowej SpDcp1/2 (patrz także **Rys. 2.34**). i) Analogi kapu niemodyfikowane w łańcuchu fosforanowym ( $m^7GTP$ ,  $GpppG$ ,  $m^7GpppG$ ,  $m^7Gppppm^7G$ ) nie są hydrolizowane. Ponadto obecność dwóch reszt  $m^7Guo$  nie jest warunkiem wystarczającym do rozpoznania przez centrum katalityczne enzymu. ii) Wprowadzenie grupy borano- lub tiofosforanowej nie zwiększa podatności, przynajmniej w wybranych przypadkach (związki **9a**, **9b**,  $m^7Gpp_{BH_3}pm^7G$ ,  $m^7Gpp_s pG D1$ ). iii) Zarówno  $m^7Gppppm^7G$  jak i jego analogi tiofosforanowe (związki **14** oraz **15**) są substratami dla Dcp2. iv) W przypadku związków **15a-c** konfiguracja przestrzenna przy stereogenicznym atomie fosforu ma pewien wpływ na szybkość hydrolizy mostka fosforanowego. v) analogi kapu o wydłużonym łańcuchu fosforanowym,  $m_2^{7,2'-O}GpppppG$  oraz  $m_2^{7,2'-O}GppppppG$  także są hydrolizowane. vi) Proces hydrolizy jest stosunkowo powolny, przy zastosowanych warunkach ( $0,5 \mu M$  enzymu oraz  $10 \mu M$  substratu) w większości przykładów po 2 h nadal obserwowano substrat w mieszaninie reakcyjnej.

Na podstawie informacji iii) oraz v) można stwierdzić, że wydłużenie mostka fosforanowego o co najmniej jeden atom fosforu jest minimalnym wymaganiami by analog kapu był rozpoznawany i degradowany przez Dcp2. Ponadto wprowadzenie modyfikacji tiofosforanowej w pozycje  $\alpha$  i  $\delta$  lub modyfikacji metylenobisfosfonianowej w pozycję  $\beta/\gamma$  nie chroni przed degradacją. Związki **16** oraz **17** także przebadano pod kątem odporności na działanie SpDcp1/2 jednak w warunkach pomiarów okazały się one niestabilne. Pomiarzy prowadzone na HPLC oraz MS wykazały, że ulegają one rozpadowi, głównie do  $m^7Gp_{BH_3}$  oraz  $H$ -fosfonianu  $m^7Guo$ , niezależnie od tego czy były wystawione na działanie enzymu. Prawdopodobnie rozpad ma miejsce podczas termicznej inaktywacji enzymu.

#### 2.4.1.2.3.2. Miejsce hydrolizy mostka fosforanowego

By ustalić w jakiej pozycji łańcucha fosforanowego zachodzi cięcie enzymatyczne produkty reakcji zostały rozdzielone na HPLC i zbadane z użyciem MS. W uzasadnionych wypadkach wykonywano także dodatkowe widma fragmentacyjne MS/MS by potwierdzić strukturę produktu. Analogi ARCA o wydłużonym łańcuchu fosforanowym są degradowane do  $m_2^{7,2'-O}GDP$  oraz odpowiednich fosforanów  $Guo$ , dla  $m^7Gppppm^7G$  obserwowano tylko jeden pochodzący od produktów pik na HPLC ( $m^7GDP$ ). Co świadczy o tym, że dla wyżej wspomnianych związków miejsce cięcia jest symetrycznie ulokowane pomiędzy pozycjami  $\beta$  i  $\gamma$ . W przypadku związków **14a** i **14b** wprowadzenie modyfikacji tiofosforanowej nie miało wpływu na specyfikę cięcia. Co ciekawe podczas przebiegu reakcji obserwuje się stopniowe powstawanie  $m^7Gp_s$  jako drugiego produktu reakcji. Może to sugerować, że  $m^7Gp_s p$ , produkt hydrolizy związków **14a** i **14b** także jest substratem dla SpDcp1/2. Na korzyść takiego rozumowania przemawia fakt, że związek ten był zidentyfikowany jako silny inhibitor tego enzymu. Jednakże założenie to wymaga wykonania dodatkowych testów enzymatycznych z udziałem  $m^7Gp_s p$  oraz  $m^7Gp_s pp$  jako substratów.

Związki **15a-c** posiadające symetryczną modyfikację metylenobisfosfonianową są degradowane do  $m^7Gp_s$  oraz  $m^7Gp_s pCH_2p$ . Obecność wiązania P-C, które jest wyjątkowo odporne na działanie pirofosfotaz wymusza inne miejsce cięcia, które z powodu dużej swobody konformacyjnej wydłużonego mostka trifosforanowego jest dostępne dla reszt aktywnych katalitycznie.

#### 2.4.1.2.3.3. Dalsza dyskusja i znaczenie uzyskanych wyników

Należy zaznaczyć, że przedstawione wyniki mają charakter wstępny i w celu pełnego poznania mechanizmu hydrolizy analogów kapu przez Dcp2 należy przeprowadzić więcej testów enzymatycznych, uwzględniających szerszą gamę analogów kapu. Ponadto warto wyznaczyć podstawowe parametry kinetyczne reakcji oraz zbadać czy inne kationy metali ( $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  etc.) mogą wpłynąć na specyficzność i szybkość reakcji. Natomiast wykorzystanie znakowanych fluorescencyjnie lub spinowo analogów kapu oraz badań krystalograficznych będzie pomocne w badaniu mechanizmu reakcji. Zdobyte w ten sposób informacje mogą zostać wykorzystane w celu zaprojektowania selektywnych i niehydrolizowalnych inhibitorów Dcp2.

**Tab. 2.12.** Podatność wybranych nukleotydów na działanie SpDcp1/2.

Związek	Odporność na SpDcp1/2	Degradacja po 2 h [%]
ATP	tak	-
m <sup>7</sup> GTP	tak	-
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp D1	tak	-
m <sup>7</sup> Gp <sub>BH3</sub> pp D2	tak	-
GpppG	tak	-
m <sup>7</sup> GpppG	tak	-
m <sup>7</sup> Gpppm <sup>7</sup> G	tak	-
m <sup>7</sup> Gppppm <sup>7</sup> G	nie	84
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GppppG	nie	~60
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GppppppG	nie	~80
m <sup>7</sup> Gpp <sub>BH3</sub> m <sup>7</sup> G	tak	-
m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pG D1	tak	-
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D1/D2	nie	84
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pppSm <sup>7</sup> G D3	nie	53
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH2pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D1	nie	13
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH2pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D2	nie	100
m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> pCH2pp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	nie	100

### 2.4.1.3. Badania strukturalne

#### 2.4.1.3.1. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)

Wiązanie się liganda **14b** do kompleksu SpDcp1/2 może prowadzić do zmian struktury 3-rzędowej białka związanej z przejściem do otwartej konformacji. W celu uzyskania informacji strukturalnych potwierdzających lub obalających przedstawione założenie postanowiono wykorzystać spektroskopię CD w dłuższym nadfiolecie. Technika ta pozwala w pewnych warunkach na obserwację dużych zmian konformacyjnych (patrz *Część literaturowa*). Zarejestrowano szereg widm CD dla wolnego liganda, kompleksu SpDcp1/2 oraz kompleksu **14b**-SpDcp1/2. Jednak z uwagi na bardzo słaby efekt CD białka (< 1,0 mdeg) uzyskane w ten sposób dane nie pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych informacji dotyczących wiązania się ligandu.

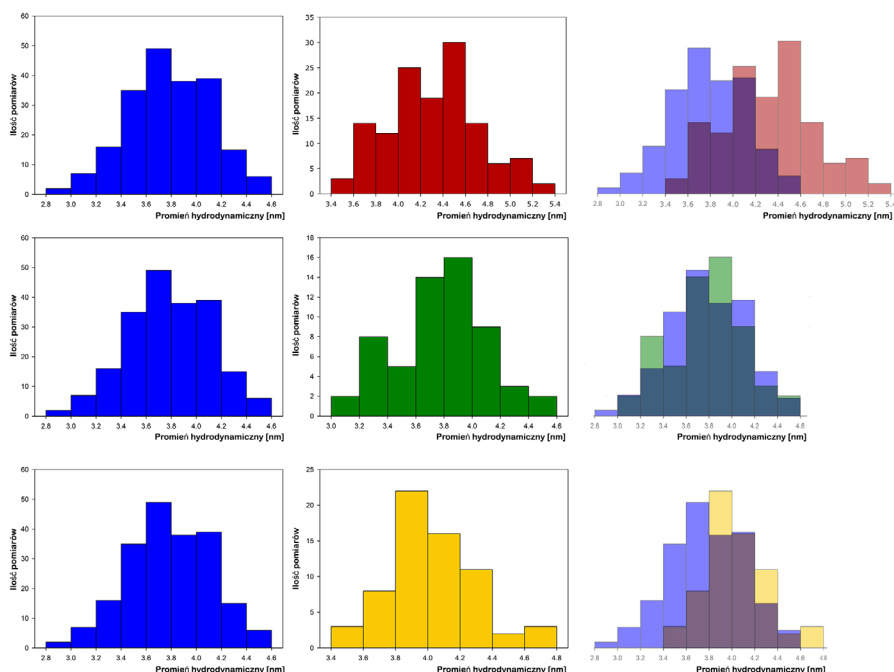
#### 2.4.1.3.2. Dynamiczne rozpraszanie światła

W celu oceny czy wiązanie z szeregiem analogów kapu może prowadzić do globalnej zmiany konformacji kompleksu SpDcp1/2 przeprowadzono szereg miareczkowań Dcp1/2 monitorowanych przy pomocy dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Taki eksperyment wykonany przy użyciu **14b** pozwolił na ocenę wpływu na konformację kompleksu poprzez pomiar zmiany promienia hydrodynamicznego,  $R_h$  w funkcji stężenia ligandu (**Rys. 2.35, Tab 2.13**). Podczas dodawania **14b** odnotowano uśrednioną zmianę  $R_h$  z  $3,8 \pm 0,3$  do  $4,3 \pm 0,4$  nm, efekty poszerzenia  $R_h$  był obserwowany w szeroki zakresie stężeń (50-500  $\mu$ M) i był specyficzny dla tego związku. Nie zaobserwowano żadnych zauważalnych zmian  $R_h$  po dodaniu niemodyfikowanego analogu kapu m<sup>7</sup>GpppG. W celu sprawdzenia czy inne tiofosforanowe analogi są zdolne do wywołania podobnego efektu jak **14b** przeprowadzono miareczkowania używając obydwu diastereoizomerów m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>Gpp<sub>s</sub>pG, związku wykazujące silne powinowactwo do innych białek wiążących się z kapem. Pewne zmiany w  $R_h$  zostały zaobserwowane ( $3,8 \pm 0,3$  nm do  $4,0 \pm 0,3$  nm) to jednak były one mniej znaczące niż dla **14b** (patrz **Rys. 2.34, Tab 2.13**). Wczesniejsze doniesienia wskazywały też, że duże stężenia (> 1mM) ATP, pAA lub m<sup>7</sup>GpppA prowadzą do inhibicji Dcp2 co może być związane ze zmianami konformacyjnymi enzymu.<sup>449</sup> Jednakże nie można było wykonać pomiarów DLS przy tak wysokich stężeniach ligandów z uwagi na znaczącą agregację białka w opisanych stężeniach. Ponadto z uwagi na małą rozdzielczość metody przeprowadzone badania należy traktować jako wstępne wyniki wymagające dodatkowego potwierdzenia przy pomocy innych technik takich jak SAXS lub SANS.

**Tab. 2.13.** Promienie hydrodynamiczne badanych kompleksów białkowych

Kompleks	$R_h$ (nm) <sup>1</sup>
Dcp1/2 (1)	3,76 ± 0,33
Dcp1/2 (po 2h w roztworze)	3,84 ± 0,28
Dcp1/2 + 500 μM m <sup>7</sup> GpppG	3,79 ± 0,32
Dcp1/2 + 1000 μM m <sup>7</sup> GpppG	3,79 ± 0,32
Dcp1/2 + 25 μM m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	3,75 ± 0,34
Dcp1/2 + 50 μM m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	4,00 ± 0,27
Dcp1/2 + 100 μM m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	3,98 ± 0,29
Dcp1/2 + 200 μM m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	4,18 ± 0,27
Dcp1/2 + 300 μM m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	4,22 ± 0,39
Dcp1/2 + 400 μM m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	4,22 ± 0,39
Dcp1/2 + 500 μM m <sup>7</sup> Gp <sub>s</sub> ppp <sub>s</sub> m <sup>7</sup> G D3	4,32 ± 0,37
Dcp1/2 + 500 μM m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>s</sub> pG D1	3,95 ± 0,32
Dcp1/2 + 1000 μM m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>s</sub> pG D1	3,92 ± 0,29
Dcp1/2 + 2000 μM m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>s</sub> pG D1	3,95 ± 0,35
Dcp1/2 + 5000 μM m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>s</sub> pG D1	3,83 ± 0,42
Dcp1/2 + 500 μM m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>s</sub> pG D2	3,84 ± 0,34
Dcp1/2 + 1000 μM m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> Gpp <sub>s</sub> pG D2	3,94 ± 0,28

<sup>1</sup>Błąd to s.d.

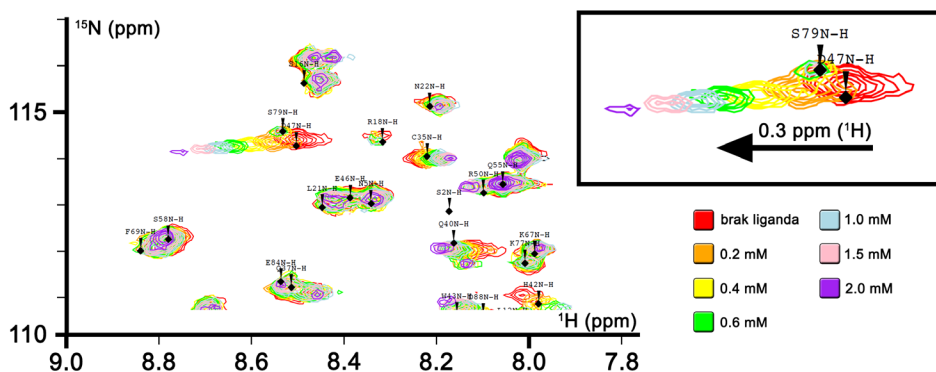


**Rys. 2.35.** Histogramy reprezentujące zmianę rozkładów promieni hydrodynamicznych,  $R_h$  dla wolnego kompleksu Dcp1/2 (niebieski) oraz Dcp1/2 po dodaniu 0,5 mM następujących nukleotydów: m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>ppp<sub>s</sub>m<sup>7</sup>G D3 (czerwony), m<sup>7</sup>GpppG (zielony) oraz m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GppSpG D1 (żółty). Prawy panel przedstawia superpozycję histogramów dla wolnego Dcp1/2 z histogramami kompleksów Dcp1/2 z odpowiednimi analogami kapu.

### 2.4.1.3.3. Spektroskopia NMR

W celu zmapowania interakcji pomiędzy analogiem kapu m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>ppp<sub>s</sub>m<sup>7</sup>G D3 (**14b**) oraz izolowanymi domenami Dcp2 posłużono się spektroskopią <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC NMR. Na potrzeby tych badań wykorzystano dwa konstrukty białkowe pochodzące z *S. pombe*. Pierwszy z nich, SpDcp2<sub>1-93</sub> jest fragmentem regulatorowym domeny N-końcowej białka a drugi, SpDcp2<sub>94-243</sub> jest fragmentem katalicznym domeny N-końcowej. Dla uproszczenia

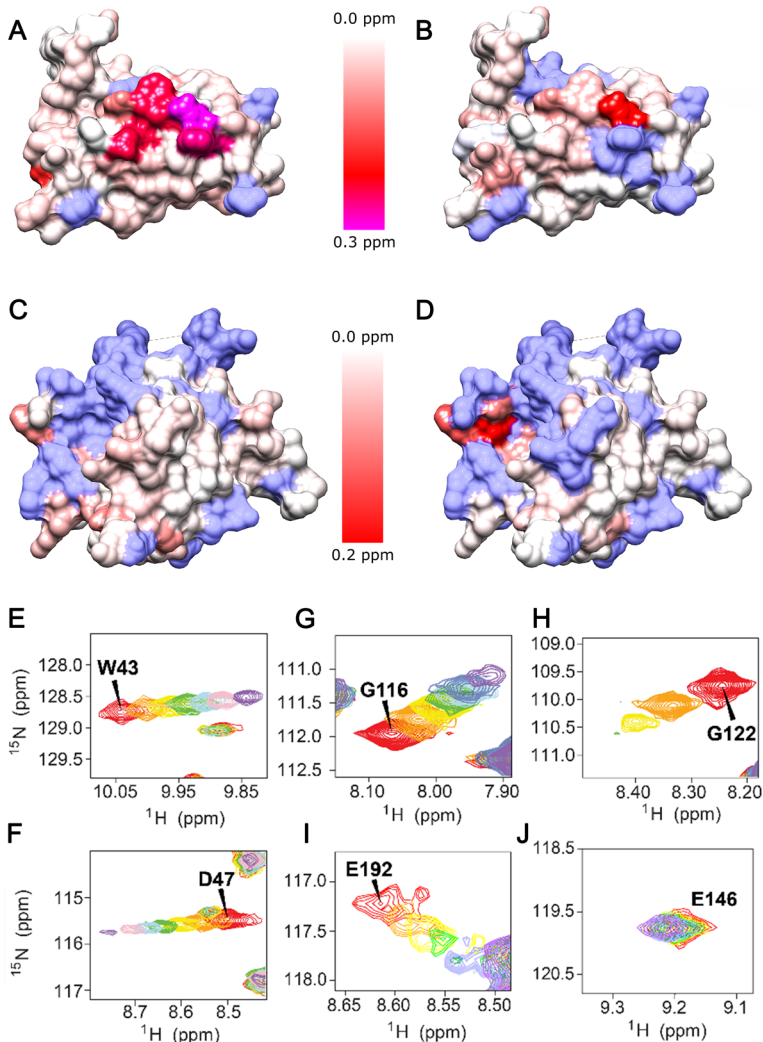
notacji w dalszej części fragmentu konstrukty te będą nazywane odpowiednio domeną regulatorową i katalityczną SpDcp2. Doświadczenia zostały przeprowadzone w taki sposób, że do stałego stężenia znakowanego izotopem  $^{15}\text{N}$  białka dodawano wzrastające stężenia liganda i dla każdego ze stężeń rejestrowano widmo NMR Reszty aminokwasowe oddziałujące z ligandem wykazały zmiany w wartości kombinowanego przesunięcia chemicznego  $^1\text{H}$  i  $^{15}\text{N}$  (patrz *Materiały i metody*), nazywanego dalej po prostu przesunięciem chemicznym. Pomiar zmian przesunięcia chemicznego w funkcji stężenia ligandu został wykorzystany w celu wyznaczenia mikroskopowych stałych dysocjacji  $K_d$  poszczególnych reszt aminokwasowych dla badanego ligandu (patrz **Rys. 2.36**).



**Rys. 2.36.** Miareczkowanie NMR białka SpDcp2. Fragment widm  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC dla domeny katalitycznej białka SpDcp1/2 (lewy panel) uzyskanych dla kilku stężeń liganda **14b**. Widoczna jest znaczna zmiana przesunięcia chemicznego dla D47 w miarę dodawania większych stężeń ligandu (wyszczególniony fragment).

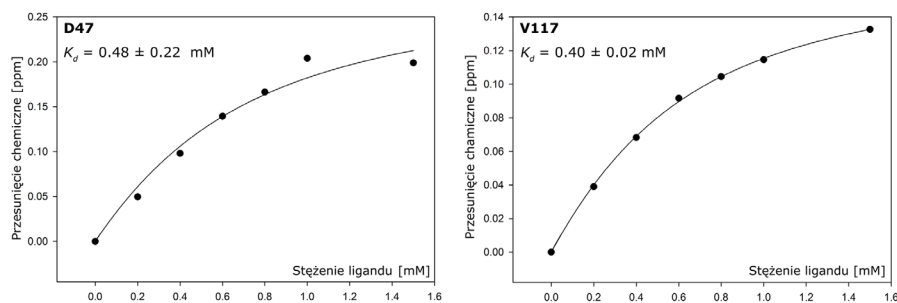
Początkowo planowano przeprowadzić powyższe eksperymenty na całej domenie N-końcowej SpDcp2 (konstrukt SpDcp2<sub>1-243</sub>). Jednakże znaczące poszerzenie sygnałów, wynikające z dużej dynamiki konformacyjnej białka (mniej niż połowa reszt aminokwasowych była widoczna na widmach) było argumentem za rezygnacją z tego podejścia. Ponadto białko złożone z obydwu domen cechuje się obniżoną stabilnością w buforze stosowanym do miareczkowań NMR, przez co dodanie większych stężeń ligandu (> 0,5 mM) skutkowało silną precypitacją białka. Miareczkowania NMR przeprowadzone na domenie regulatorowej wskazały, że związek **14b** jest, podobnie jak  $m^7\text{GDP}$ , rozpoznawany przez poprzednio opisane miejsce wiążące złożone z zachowawczych ewolucyjnie reszt 31-52, tworzących  $\alpha$ -helisę w obrębie domeny BoxA (**Rys. 2.37A, B**, oraz *Część literaturowa*). Co istotne, powinowactwo analogu **14b** jest znacznie wyższe niż badanych wcześniej nukleotydów. Niektóre z reszt aminokwasowych oddziałujących z **14b** są silnie zachowawcze (W43, D47) a ich mutacja prowadzi do zablokowania aktywności katalitycznej SpDcp2.<sup>458</sup> Na podstawie zmian przesunięcia chemicznego w funkcji stężenia ligandu, w oparciu o dodatni pierwiastek równania kwadratowego wiążącego  $K_d$  z przesunięciem chemicznym wyznaczono numerycznie wartości  $K_d$  (patrz *Materiały i metody*) dla wybranych reszt aminokwasowych. Wyznaczone w ten sposób mikroskopowe  $K_d$  wynosiły  $\sim 0,8$  mM, natomiast wcześniej opisane wartości  $K_d$  wynosiły  $\sim 12$  mM dla  $m^7\text{GDP}$  oraz  $\sim 13$  mM dla  $m^7\text{GpppA}$  (patrz **Rys. 2.38** dla przykładowych dopasowań). Zauważono, że mapa interakcji związku **14b** przypomina mapę dla  $m^7\text{GDP}$ , co oznacza, że w wiązaniu nukleotydów jest zaangażowana głównie zachowawczy ewolucyjnie fragment BoxA (**Rys. 38**). Miareczkowania NMR przeprowadzone z wykorzystaniem  $m^7\text{Gpppm}^7\text{G}$  pokazały, że w zakresie stężeń 0,2-2,5 mM związek ten nie prowadzi do żadnych znaczących zmian w przesunięciu chemicznym reszt aminokwasowych zarówno w domenie regulatorowej jak i katalitycznej.

Związek **14b** jest rozpoznawany także przez domenę katalityczną z podobnym powinowactwem jak dla domeny regulatorowej. Wcześniej wykazano, że zarówno ATP jak i  $m^7\text{GDP}$  oddziałuje z tą domeną z niskim powinowactwem.<sup>449, 455</sup> Jednakże interakcje te charakteryzowały się dużym rozproszeniem i niską specyficznością co do określonego miejsca na powierzchni białka. Jednak w przypadku **14b** znaczące zmiany przesunięcia chemicznego sąsiadujących ze sobą reszt aminokwasowych sugerują specyficzne wiązanie a nie przypadkowe interakcje z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi na powierzchni białka (**Rys 2.39C, D**). Podobnie jak w przypadku BoxA wyznaczone wartości  $K_d$  były w zasięgu 0,5 mM (**Tab. 2.14**), co oznacza oddziaływanie około 20-krotnie silniejsze niż dla  $m^7\text{GDP}$ . Reszty aminokwasowe wykazujące największe zmiany przesunięcia chemicznego po związaniu **14b** (G116, W117, K118, G121, K127, E192) są ulokowane w dwóch



**Rys. 2.37.** Oddziaływania  $m^7GpSpppSm^7G$  D3 (**14b**) z domeną regulatorową i katalityczną Dcp2. Reszty aminokwasowe niewidoczne na widmach NMR zostały oznaczone na błękitno. (A) Domena regulatorowa z naniesionym gradientem barwnym reprezentującym zaburzenie przesunięć chemicznych przez oddziaływanie z  $m^7GDP$  w stężeniu 30 mM. (B) Domena regulatorowa z naniesionym gradientem barwnym reprezentującym zaburzenie przesunięć chemicznych przez oddziaływanie z **14b** w stężeniu 2 mM. (C) Domena katalityczna z naniesionym gradientem barwnym reprezentującym zaburzenie przesunięć chemicznych przez oddziaływanie z  $m^7GDP$  w stężeniu 30 mM. (D) Domena katalityczna z naniesionym gradientem barwnym reprezentującym zaburzenie przesunięć chemicznych przez oddziaływanie z **14b** w stężeniu 2 mM. (E-J) Nałożenie widm  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC dla reszt W43 (E), D47 (F), G116 (G), G122 (H), E192 (I) oraz E146 (J). Zastosowano takie samo oznaczenie kolorystyczne widm jak na **Rys. 2.36**.

nieustrukturyzowanych pętlach – „pętli 120” oraz „pętli 190” (numery wskazują na reszty aminokwasowe wokół których zawierają się pętle) położonych blisko siebie w przestrzeni. Świadczy to o tym, że **14b** wiąże się specyficznym z tym fragmentem powierzchni. Znaczenie „pętli 120” dla etapu katalitycznego nie było wcześniej badane jednakże w pomiarach NMR obserwuje się zmiany ich przesunięcia chemicznego po dodaniu RNA. Ponadto pętla ta ulokowana jest w pobliżu postulowanego kanału, w którym zachodzi wiązanie mRNA<sup>452</sup>, co może sugerować jej udział w wiązaniu nukleotydów przy 5’ końcu mRNA. Jedną z reszt  $m^7Guo$  w związku **14b** może być traktowana w ten sam sposób (**Rys. 2.40**).



**Rys. 2.38.** Wiązanie **14b** do Dcp2 na przykładzie mikroskopowych stałych dysocjacji  $K_d$  dla reprezentatywnych reszt aminokwasowych D47 (domena regulatorowa, lewy panel) oraz V117 (domena katalityczna, prawy panel).

W „pętli 190” reszta E192, której sygnał jest przesunięty i poszerzony po dodaniu **14b**, bierze udział w koordynowaniu jonu  $Mg^{2+}$  w miejscu aktywnym Dcp2 i jest kluczowa dla funkcjonowania białka. Jej dynamika rotacyjna jest związana ze zmianami pH i ma wpływ na proces katalityczny.<sup>691</sup> Ponieważ Dcp2 wymaga do swojej aktywności obecności magnezu można by spekulować, że **14b** wpływa na wiązanie metalu w centrum katalitycznym, jest jego chelatorem lub powoduje jego dysocjację. Jednakże stężenie kationów magnezu w próbce

było 20-krotnie większe niż **14b** a sam analog kapu był ko-miareczkowany względem dwóch równoważników  $MgCl_2$  a dodatkowo przeprowadzone miareczkowania NMR z użyciem samego  $MgCl_2$  nie prowadziły do obserwowalnych zmian przesunięć chemicznych. Dlatego też hipoteza, zakładająca taki mechanizm inhibicji jest bardzo mało prawdopodobna. Można natomiast założyć, że reszta E192 jest zaangażowana w proces wiązania **14b**. Natomiast aktywnie katalityczna reszta E146 ulokowana w pętli Nudix i zaangażowana zarówno w koordynowanie kationu magnezu i samą katalizę nie oddziałuje w widoczny sposób z **14b**. Wcześniejsze badania pokazały jednak, że dodatek  $m^7GDP$  zmienia jej przesunięcie chemiczne. Fakt ten mógłby zostać uznany za dowód tego, że **14b** wiąże się do centrum aktywnego w inny sposób niż  $m^7GDP$  blokując katalizę. Ponieważ **14b** podlega hydrolizie przy większym stężeniu enzymu (**Rys. 2.33** oraz **2.34**) a transkrypty zawierające ten analog kapu podlegają szybkiemu cięciu enzymatycznemu to jednak należy przyjąć założenie, że związek **14b** jest rozpoznawany przez aktywne katalitycznie konformacje Dcp2 w roztworze.

Związek **14a**, mieszanina izomerów D1 oraz D2  $m^7Gp_sppp_s m^7G$  także jest rozpoznawany przez obydwie dyskutowane domeny Dcp2. W przypadku domeny regulatorowej mapa interakcji jest bardzo zbliżona jednak wyznaczone wartości  $K_d$  są nieco mniejsze (**Tab. 2.14**). Dla domeny katalitycznej zaobserwowano, że niektóre reszty (V117, S121, I130, S135) oddziałują bardzo silnie z ligandem. Z tego powodu miejsca wiązania były przesycone uniemożliwiając dokładne wyznaczenie wartości  $K_d$ , oszacowane wartości mieszczą się w zakresie 0,1-0,3 mM. Ponieważ zarówno **14a** jak i **14b** są wiązane w tym samym miejscu przez białko to można założyć, że konfiguracja przestrzenna wokół stereogenicznych atomów fosforu nie jest kluczowa dla wiązania przez SpDcp2.

**Tab. 2.14.** Mikroskopowe stałe dysocjacji dla kompleksów Dcp2-nukleotyd wyznaczone za pomocą pomiarów NMR (dane dla nukleotydów innych niż  $m^7Gp_sppp_s m^7G$  and  $m^7Gpppm^7G$  zaczerpnięto z Floor et al).

Związek	$K_d$ dla domeny regulatorowej (Dcp2 1-94) <sup>1</sup> [mM]				
	Trp 43		Asp 47		
GDP	36,3 ± 3,0		44,8 ± 7,5		
$m^7GDP$	11,7 ± 0,9		13,1 ± 0,8		
$m^7GpppA$	13,2 ± 0,3		15,6 ± 1,0		
$m^7Gp_sppp_s m^7G$ D3 ( <b>14b</b> )	0,8 ± 0,2		0,7 ± 0,2		
	$K_d$ dla domeny katalitycznej (Dcp2 95-243) <sup>1</sup> [mM]				
	Lys 235	Glu 146	Trp 117	Gly 116	Val 114
ADP	8,8 ± 0,4	n.d	n.d	n.d	n.d
ATP	5,1 ± 0,4	n.d	n.d	n.d	n.d
$m^7GDP$	22,4 ± 2,6	11,6 ± 0,8	n.d	n.d	n.d
$m^7Gp_sppp_s m^7G$ D3 ( <b>14b</b> )	n.d <sup>2</sup>	n.d <sup>2</sup>	0,55 ± 0,03	0,47 ± 0,04	0,28 ± 0,06

<sup>1</sup>Błąd to s.e.m

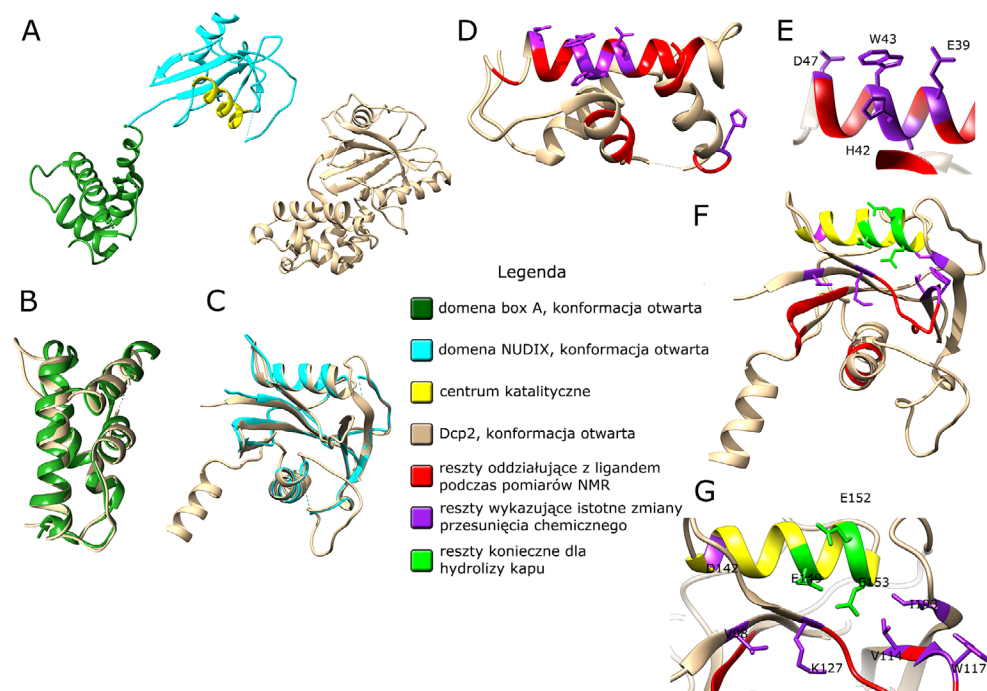
<sup>2</sup>Obecność **14b** nie miała znaczącego wpływu na zmianę przesunięcia chemicznego

#### 2.4.1.4. Poszukiwanie mechanizmu działania Dcp2

Dcp2 wykazuje znaczną dynamikę konformacyjną i występuje w szeregu „otwartych” i „zamkniętych” konformacji. Zakłada się, że co najmniej jedna z zamkniętych konformacji jest aktywna katalitycznie podczas gdy zbiór innych konformacji jest nieaktywny lub wykazuje zredukowaną aktywność. Istnieją następujące argumenty stojące za takim stwierdzeniem. i) Zarówno ATP jak i pochodne  $m^7Guo$  mogą spowodować przejście Dcp2 do zamkniętej konformacji. ii) Konformacja stabilizowana przez ATP jest odmienna niż konformacja powstała po związaniu pochodnej  $m^7Guo$ . Nawiązując do wyników uzyskanych z miareczkowania DLS oraz eksperymentów kinetycznych można założyć, że, po związaniu z białkiem,  $m^7GDP$  i inne analogi kapu blokują przejście strukturalne do aktywnej, zamkniętej konformacji lub stabilizują w roztworze otwarte, nieaktywne konformacje przez co zaczynają one dominować w przestrzeni konformacyjnej Dcp2.

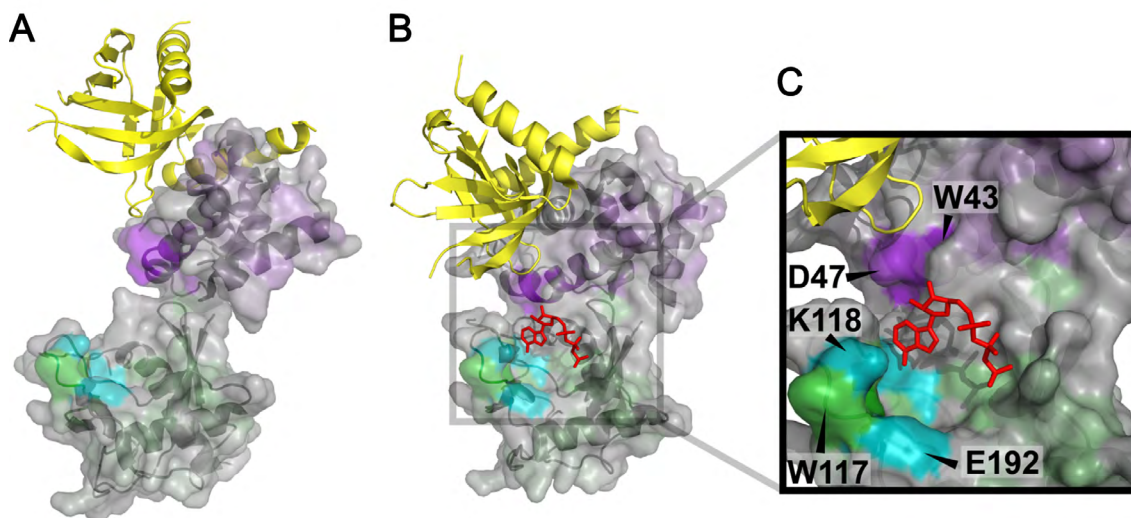
Analizując dane z DLS należy mieć na uwadze stosunkowo niską rozdzielczość techniki. Ponadto uzyskane wyniki mogą być w pewnym stopniu tłumaczone nie poprzez zmianę konformacji a przyrost frakcji będącej dimerem lub oligomerem Dcp2. Mimo, że podczas analizy danych wykorzystano technikę regularyzacji, pozwalającą w teorii

na odseparowanie składowych pochodzących od oligomerów to w praktyce takie rozróżnienie nie zawsze jest klarowne. Podczas pomiarów DLS zauważono, że wysokie stężenia analogów kapu prowadzą do agregacji białka, podobne obserwacje poczyniono podczas pomiarów NMR dla SpDcp2<sub>1-243</sub>. Z drugiej strony podczas dodawania mniejszych stężeń ligandów obserwowano znacznie subtelniejsze zmiany w  $R_h$  i nie odnotowano powstawania dużych agregatów białka co wspiera hipotezę o stabilizowaniu udziału otwartej konformacji w roztworze. Nie należy też wykluczyć tego, że opisane zjawiska występują jednocześnie – zwiększa się udział otwartej konformacji oraz pewien procent białka w roztworze ulega oligomeryzacji. Wykonanie w przyszłości dodatkowych doświadczeń z użyciem bardziej czułych technik takich jak SAXS czy SANS mogłoby pomóc w rozwiązaniu tego problemu. Z kolei wyniki uzyskane podczas badania odporności transkryptów zawierających analogi **14-17** na działanie SpDcp1/2 wskazują na brak istotnej korelacji pomiędzy właściwościami inhibitorowymi analogów **14-17** w postaci wolnych cząsteczek a ich podatnością na degradację po włączeniu do RNA. Otrzymane rezultaty sugerują, że zwiększone powinowactwo związku **14** do domeny katalitycznej Dcp2 może częściowo tłumaczyć wysoką podatność na dekaping po inkorporacji do RNA oraz fakt, że związek **14b** ulega powolnej hydrolizie przy wysokich stężeniach Dcp2. Zaproponowany wcześniej mechanizm katalityczny dla Dcp2 zakłada, że w pierwszym etapie łańcuch mRNA jest rozpoznawany a następnie wiązany przez dodatnio naładowany fragment Dcp2. Następnie dochodzi do zmiany konformacji na zamkniętą i utworzenia kompozytowego centrum katalitycznego gdzie zachodzi hydroliza kapu (patrz *Cześć literaturowa*). Ponieważ wydłużony mostek fosforanowy analogu



**Rys. 2.39.** Analiza interakcji pomiędzy SpDcp2 i ligandem **14b**. (A) Struktura N-końcowego fragmentu SpDcp2 (numer PDB: 2QKM) oraz porównanie pomiędzy otwartą a zamkniętą konformacją. Z powodu zmiany w konformacji łącznika pomiędzy domenami BoxA a NUDIX konformacja otwarta ma większy promień niż zamknięta. (B) Przyrównanie strukturalne pomiędzy BoxA w otwartej i zamkniętej konformacji pokazuje znaczce podobieństwo strukturalne. (C) Podobna konkluzja może zostać zaproponowana w przypadku domeny NUDIX w konformacji otwartej lub zamkniętej. (D) Oddziaływania pomiędzy ligandem **14b** a BoxA. (E) Reszty aminokwasowe oddziałujące z ligandem w domenie BoxA. Ligand oddziałuje z zachowawczymi ewolucyjnie resztami W43 oraz D47, z których pierwszy jest odpowiedzialny za przejście konformacyjne otwarta-zamknięta. Reszty E39 oraz H42 także biorą udział w oddziaływaniu (F) Oddziaływanie **14b** z domeną NUDIX, ligand oddziałuje głównie z kilkoma resztami aminokwasowymi (G), które nie są bezpośrednio zaangażowane w proces katalityczny.

**14** wykazuje zarówno większe powinowactwo do miejsca wiązania m<sup>7</sup>G oraz posiada zwiększoną dynamikę konformacyjną to po związaniu przez Dcp2 może on łatwiej utworzyć odpowiedni stan przejściowy ułatwiając zajście etapu katalicznego. Wyniki te sugerują, że związki **14-15** zarówno po włączeniu do RNA jak i w wolnej postaci są rozpoznawane jako dobre substraty i hydrolizowane podczas gdy związki **16-17** wykazują częściową odporność na degradację.



**Rys. 2.40.** Proponowany mechanizm wiązania **14b** do otwartej lub zamkniętej konformacji białka SpDcp2. Dcp1 został zaznaczony na żółto, domena regulatorowa Dcp2 na purpurowo a domena kataliczna Dcp2 na ciemnozielono. Częsteczka ATP jest zaznaczona na czerwono. Gradienty barwne oznaczają przesunięcie chemiczne reszt aminokwasowych oddziałujących z **14b** i zostały naniesione na powierzchnię molekularną cząsteczki w konformacji otwartej (**A**, numer PDB: 2A6T) oraz zamkniętej (**B**, numer PDB: 2QKM). W oparciu o przestrzenną lokalizację reszt aminokwasów oddziałujących z ligandem można oczekiwać, że jedna z reszt m<sup>7</sup>Guo naśladuje strukturę kapu i oddziałuje z helisą 31-52, konieczną dla utworzenia kompozytowego miejsca katalicznego podczas gdy druga reszta m<sup>7</sup>Guo może wiązać domenę kataliczną w podobny sposób jak przedstawiona powyżej cząsteczka ATP w konformacji zamkniętej Dcp2 naśladując koniec 5' łańcucha RNA. (**C**) Zbliżenie na cząsteczkę ATP, zaznaczono pobliskie reszty aminokwasowe istotne z punktu widzenia wiązania **14b**.

Analog kapu **14b** wydaje się być odpowiednikiem m<sup>7</sup>Gppp-RNA mającym silniejsze powinowactwo do enzymu. Wskazuje za tym następująca linia rozumowania. i) Badania kinetyczne wykazują, że **14b** odwracalnie wiąże się z SpDcp2 i współzawodniczy z substratem o dostęp do centrum katalicznego a wartość  $K_i$  wskazuje, że jego powinowactwo jest ~20-krotnie silniejsze. ii) Pomiary NMR wykazały, że **14b** wiąże się specyficznie do określonych fragmentów na powierzchni SpDcp2, zarówno dla fragmentu regulatorowego oraz katalicznego. iii) Po związaniu przez enzym, **14b** podlega hydrolizie, niezależnie od tego czy występuje w stanie wolnym czy też po inkorporacji do RNA pokazując, że jest odpowiednim substratem dla katalicznie aktywnej konformacji SpDcp2. Dcp2 może przyjmować szereg konformacji w roztworze a uzyskane wyniki, zebrane razem są zgodne z zamkniętą konformacją, w której **14b** wiąże się z obydwoma fragmentami (katalicznym oraz regulatorowym). Może mieć to miejsce gdy jedna z reszt m<sup>7</sup>Guo oddziałuje z kieszenią wiążącą ATP zamkniętej konformacji (podobnej do tej widocznej w strukturze zdeponowanej w PDB jako 2QKM) a druga reszta m<sup>7</sup>Guo wiąże się z helisą 31-52. Jednakże wcześniejsze badania pokazały, że taka konformacja jest nieaktywna katalicznie co faworyzuje model, w którym **14b** jest wiązany w taki sposób, że jedna z reszt m<sup>7</sup>Guo jest ulokowana w podobny sposób jak ATP w domenie katalicznej (**Rys. 2.40**) naśladując łańcuch RNA podczas gdy druga reszta m<sup>7</sup>Guo oddziałuje z helisą 31-52 w innej, zamkniętej konformacji, gdzie domena regulatorowa pozycjonuje W43 i związany ligand bliżej centrum katalicznego. Drugi z przedstawionych modeli wydaje się bardziej prawdopodobny ponieważ uzyskane dane pokazują, że **14b** jest wiązany przez katalycznie aktywną konformację SpDcp2 zarówno jako wolny nukleotyd jak i po inkorporacji do RNA. Hydroliza ligandu nie jest spójna z pierwszym modelem, gdzie jest on związany w zamkniętej ale nieaktywnej katalicznie konformacji przedstawione na **Rys. 2.40**, gdzie centrum kataliczne jest odsunięte od łańcucha fosforanowego nukleotydu. Należy mieć na uwadze, że wyniki badań enzymatycznych nad aktywnością Dcp2 pokazały, że obecność drugiej

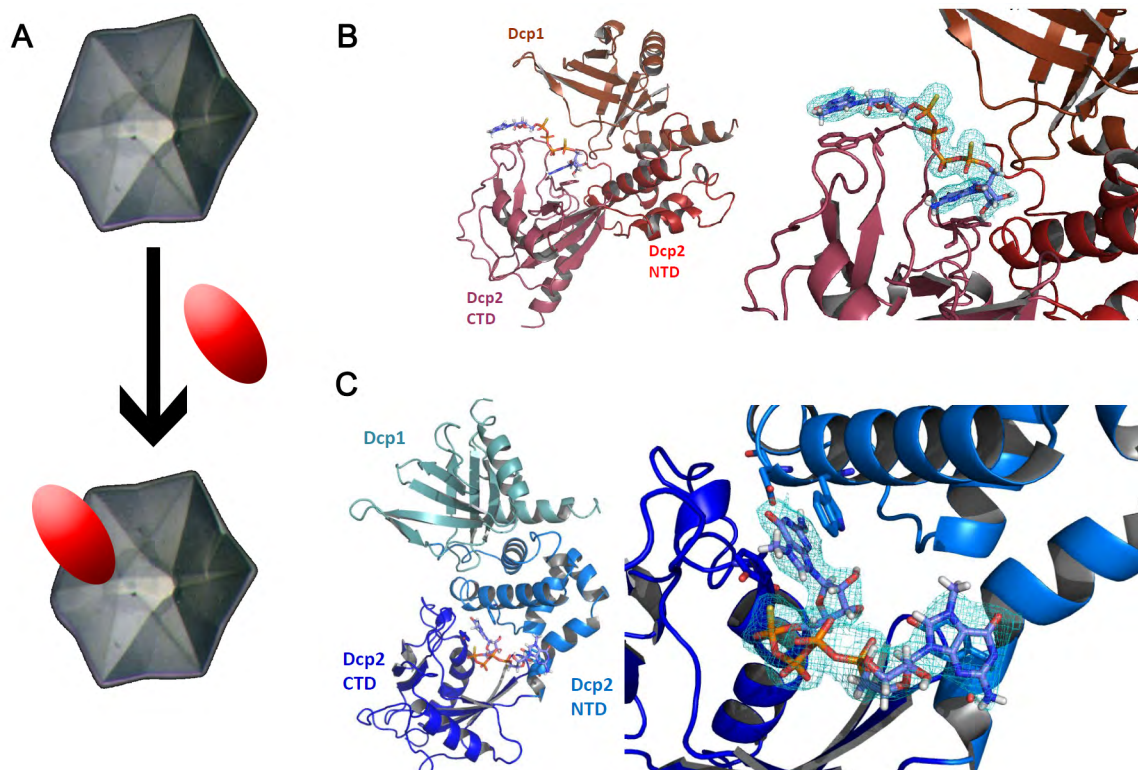


reszty m<sup>7</sup>Guo nie jest konieczna dla analogu kapu by został związany i hydrolizowany przez enzym co sugeruje, że kluczowym elementem jest wydłużenie łańcucha fosforanowego. Tak zmodyfikowany związek może naśladować mRNA i oddziaływać z postulowanym kanałem wiążącym RNA. Hipoteza ta wymaga jednak dodatkowych badań strukturalnych, miareczkowania HSQC oraz inne metody mapowania powierzchni oddziaływań białko-ligand będą tutaj bardzo pomocne.

#### 2.4.1.5. Dalsze badania strukturalne nad wiązaniem analogów kapu przez Dcp2

Badania strukturalne prowadzone w zespole prof. Johna D. Grossa w UCSF pozwoliły na uzyskanie kryształów kompleksu SpDcp1/2 związanego z analogiem kapu **14b**. Kryształy te miały na tyle dobrą jakość, że pozwoliły na uzyskanie struktury o rozdzielczości ~2.5 Å posiadającej dwie cząsteczki SpDcp1/2 w jednostce asymetrycznej (ASU), każda z cząsteczek posiada związanego liganda jednakże ich konformacje są odmienne (**Rys. 2.41**). Do tej pory struktura nie została do końca rozwiązana jednakże udało ustalić się kilka faktów dotyczących ogólnej konformacji Dcp2 oraz interakcji nukleotyd-białko.

W jednej z konformacji Dcp1/2 posiada podobną strukturę do wcześniej wykrystalizowanego kompleksu ze związaną cząsteczką ATP (patrz *Część literaturowa*). Nukleotyd **14b** oddziałuje jedynie z domeną katalityczną, gdzie reszty z „pętli-120” oraz Y220 biorą udział w wiązaniu (**Rys. 2.41B**). Dane te są zgodne z pomiarami NMR, gdzie wspomniane reszty aminokwasowe wykazują zauważalne zmiany przesunięcia chemicznego. Można spekulować, że ta struktura obrazuje w jaki sposób **14b** jest wiązany przez domenę katalityczną w trybie inhibitorowym.



**Rys. 2.41.** Struktura krystalograficzna kompleksu SpDcp1/2 z analogiem kapu **14b**. (A) Schemat uzyskania kryształów kompleksu SpDcp1/2 ze związanymi analogami kapu. Do roztworu soli z kryształami SpDcp1/2 dodano wysokie stężenie **14b** (czerwony owal) co pozwoliło na „nasączenie” kryształów analogiem kapu prowadząc do uzyskania kryształów kompleksu SpDcp1/2 ze związanym analogiem kapu. (B) Jedna z konformacji SpDcp2 wykazuje podobieństwo do wcześniej poznanych struktur. Analog kapu wiązany jest tylko przez domenę katalityczną gdzie reszty W117 oraz Y220 biorą udział we wiązaniu. (C) Druga zaobserwowana struktura SpDcp1/2 posiada konformacje, która nie była wcześniej zaobserwowana. Reszty W43 oraz D47 biorą udział w interakcji z ligandem. Reszty aminokwasowe biorące udział w katalizie nie oddziałują bezpośrednio z **14b**.

Z kolei druga cząsteczka w ASU wiąże **14b** w całkowicie odmienny sposób, ponadto konformacja Dcp2 także ulega dużym zmianom. W tej strukturze ligand oddziałuje także z domeną regulatorową (reszty W43, D47 istotne dla procesu katalitycznego). Ponieważ **14b** posiada dwie reszty m<sup>7</sup>Guo to na podstawie uzyskanych danych nie można ustalić, czy w przypadku wiązania mRNA domena katalityczna wiąże strukturę kapu czy raczej pierwszy transkrybowany nukleotyd. Nie udało się także ustalić czy obecność grupy tiofosforanowej ma istotny wpływ na siłę interakcji ligand-białko.

## 2.4.2. Badania ścieżek degradacji histonowego mRNA przy użyciu reporterowego mRNA

### 2.4.2.1. Wprowadzenie

We wielu wcześniejszych pracach doświadczalnych poliadenylowane transkrypty mRNA z wbudowanymi różnymi analogami kapu były wprowadzane do komórek gdzie badano ich stabilność oraz wydajność translacji. W opisywanych poniżej badaniach obserwowano los transkryptów posiadających zarówno strukturę kapu jak i motyw SL, konieczny do inicjacji translacji histonowego mRNA (patrz *Część literaturowa*). Zastosowanie egzogenego reporterowego mRNA zapewnia następujące zalety, które są bardzo trudne do osiągnięcia za pomocą plazmidów wyrażających histonowe mRNA i) Badanie kinetyki degradacji mRNA bez jego jednoczesnej syntezy ii) Możliwość wprowadzania zmian chemicznych na obydwu końcach łańcucha mRNA iii) Możliwość zmiany wydajności translacji badanego mRNA i sprawdzenia w jaki sposób wpływa to na jego stabilność iv) Badania są prowadzone na zbiorze początkowo takich samych, nienaruszonych cząsteczek RNA a nie na mieszaninie intermediatów procesu degradacji. W pracy doktorskiej przedstawiono jedynie część uzyskanych wyników, pokazujących, że egzogenne mRNA zawierające modyfikowaną strukturę kapu jest cennym narzędziem w badaniach biochemicznych. Dokładny opis eksperymentów znajduje się w pracy *RNA*, 2013, 19, 1-16.<sup>692</sup>

W badaniach wykorzystano szereg transkryptów mRNA lucyferazy uzyskanych *in vitro*, posiadających zarówno standardowe (m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GpppG) jak i odporne na degradację (m<sup>7</sup>Gpp<sub>BH3</sub>pm<sup>7</sup>G, BTH) struktury kapu, różne sekwencje 3' UTR oraz 5' UTR. W celu zapewnienia podobieństwa funkcjonalnego do endogennego mRNA otrzymane transkrypty posiadały także ogon poliA (**Rys. 2.42**). Argumentacją stojącą za wyborem analogu BTH do badań były jego pożądane właściwości biochemiczne: symetryczna struktura zapewniająca wbudowanie się w poprawny sposób do transkryptów (analog typu ARCA), całkowita odporność na działanie hDcp2, oraz zapewnienie większej wydajności kapowanych transkryptów *in vitro* oraz po wprowadzeniu do komórek.

### 2.4.2.2. Wpływ elementów strukturalnych na 3' i 5' końcach RNA na jego stabilność

*Eksperymenty zostały przeprowadzone przez Wei Sui, PhD*

Posługując się nukleoporacją transkrypty wprowadzono do komórek HeLa a postęp degradacji był monitorowany za pomocą qRT-PCR. Wykazano wtedy, że mRNA zawierające analog BTH posiadają znacznie dłuższy czas półtrwania niż mRNA zawierające niemodyfikowany analog ARCA, co wskazuje, że dekaping oraz degradacja 5'-3' mają istotny wkład do stabilności mRNA w testowanym systemie. Ostateczny zanik BTH-Luc-A60 mRNA był najprawdopodobniej wywołany inną ścieżką degradacji taką jak hydroliza 3'-5' prowadzona przez egzosom lub aktywność endonukleaz.

Ponadto w celu określenia czy egzogenne wprowadzone RNA jest rozpoznane i poddawane obróbce w taki sam sposób jak endogenne mRNA do otrzymanych transkryptów wprowadzono fizjologicznie istotne motywy sekwencyjne i zbadano ich wpływ na stabilność egzogenego mRNA. Jednym z nich był motyw ARE wprowadzony do 3' UTR transkryptu lucyferazy. Zgodnie z przewidywaniami takie mRNA było degradowane szybciej niż kontrolny transkrypt pozbawiony motywu ARE (**Tab. 2.15**).

**Tab. 2.15.** Właściwości biologiczne egzogennych mRNA wykorzystywanych w badaniach. Parametry kinetyczne zostały wyznaczone w serii (2-6) niezależnych eksperymentów.

No	mRNA <sup>1</sup>	Warunki <sup>2</sup>	Rozpad mRNA <sup>3</sup>				Wydajność translacji
			Opóźnienie		t <sub>1/2</sub>		
1	ARCA-Luc-A <sub>60</sub>	Standardowe	9,0 ± 3,0		33,6 ± 0,5		1,0 ± 0,0 <sup>4</sup>
2	ARCA-Luc-ARE-A <sub>60</sub>	Standardowe	0,0		15,4 ± 2,0		0,7 ± 0,1 <sup>4</sup>
3	BTH-Luc-A <sub>60</sub>	Standardowe	51,0 ± 4,0		31,0 ± 9,0		1,7 ± 0,2 <sup>4</sup>
4	ARCA-Luc-A <sub>50</sub>	Standardowe	5,0 ± 3,0		20,1 ± 1,5		0,8 ± 0,3 <sup>4</sup>
5	BTH-Luc-A <sub>50</sub>	Standardowe	30,0 ± 10,0		20,0 ± 1,8		1,4 ± 0,3 <sup>4</sup>
6	ARCA-Luc-ARE-A <sub>50</sub>	Standardowe	0,0		13,5 ± 2,2		0,0 <sup>4</sup>
7	ARCA-Luc-ARE-A <sub>50</sub>	Standardowe	0,0		18,5 ± 2,6		0,0 <sup>4</sup>
			5'		3'		
			Opóźnienie	t <sub>1/2</sub>	Opóźnienie	t <sub>1/2</sub>	
8	ARCA-Luc-SL	Standardowe	7,8 ± 4,1	20,0 ± 3,1	7,5 ± 4,8	18,5 ± 1,0	1,0 ± 0,0 <sup>5</sup>
9	ARCA-Luc-SL	HU	0,0	12,8 ± 1,9	0,0	12,5 ± 0,8	n.d
10	ARCA-Luc-SL	hDcp2 KD	35,0 ± 6,0	30,3 ± 6,7	n.d	n.d	n.d
11	ARCA-Luc-SL	TUTaza 4 KD	8,0 ± 2,0	30,3 ± 1,1	8,0 ± 2,0	26,9 ± 4,7	n.d
12	ARCA-Luc-SL	TUTaza 4 KD + HU	0,0	15,1 ± 2,9	0,0	15,5 ± 2,3	n.d
13	ARCA-Luc-SL	TUTaza 3 KD	10,0 ± 0,0	21,7 ± 5,4	0,0	22,5 ± 2,9	n.d
14	ARCA-Luc-SL*	Standardowe	10,0 ± 2,8	24,7 ± 9,3	8,0 ± 4,8	22,7 ± 6,3	1,3 ± 0,2
15	ARCA-Luc-SL*	HU	10,0 ± 0,0	17,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	19,8 ± 2,0	n.d
16	ARCA-Luc-SL-U <sub>10</sub>	Standardowe	0,0	18,5 ± 1,9	0,0	20,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1
17	ARCA-Luc-SL-U <sub>10</sub> *	Standardowe	0,0	14,6 ± 1,0	0,0	20,5 ± 1,0	0,5 ± 0,1
18	BTH-Luc-SL	Standardowe	38,4 ± 7,0	30,2 ± 4,4	30,0 ± 0,5	21,5 ± 1,5	1,8 ± 0,3
19	BTH-Luc-SL	HU	23,5 ± 5,0	27,1 ± 7,5	10,0 ± 5,0	13,3 ± 5,9	n.d
20	BTH-Luc-SL	hDcp2 KD	45,0 ± 5,0	41,8 ± 1,8	n.d	n.d	n.d
21	BTH-Luc-SL	TUTaza 4 KD	40,0 ± 8,7	46,0 ± 5,9	45,0 ± 0,0	56,8 ± 6,5	n.d
22	BTH-Luc-SL	TUTaza 4 KD + HU	26,7 ± 5,7	25,4 ± 0,9	30,0 ± 0,0	20,5 ± 6,0	n.d
23	BTH-Luc-SL	TUTaza 3 KD	20,0 ± 0,0	21,3 ± 4,5	20,0 ± 0,0	23,2 ± 1,8	n.d
24	BTH-Luc-SL*	Standardowe	27,5 ± 5,0	33,3 ± 8,0	31,3 ± 10,3	39,9 ± 5,5	2,4 ± 1,0
25	BTH-Luc-SL*	HU	25,0 ± 7,1	29,3 ± 10,3	30,0 ± 0,0	35,9 ± 2,4	n.d
26	BTH-Luc-SL-U <sub>10</sub>	Standardowe	20,0 ± 5,0	18,1 ± 0,0	10,0 ± 5,0	21,4 ± 0,5	0,8 ± 0,2
27	BTH-Luc-SL-U <sub>10</sub> *	Standardowe	20,0 ± 5,0	20,9 ± 0,0	10,0 ± 5,0	19,7 ± 1,0	0,8 ± 0,1
28	ARCA-Luc-TL	Standardowe	0,0	30,1 ± 1,0	n.d	n.d	0,0
29	BTH-Luc-TL	Standardowe	10,0 ± 0,0	29,4 ± 4,0	n.d	n.d	0,0

<sup>1</sup>mRNA oznaczone gwiazdką (\*) zostały zmodyfikowane na 3' końcu poprzez dodatek kordycepiny.

<sup>2</sup>Z uwagi na to, że nie stwierdzono statystycznej różnicy dla kinetyki rozpadu mRNA w niezainfekowanych komórkach HeLa i komórkach traktowanych NT shRNA analiza statystyczna dla Luc-SL mRNA w warunkach standardowych została uwzględnia eksperymenty prowadzone w obydwu typach komórek.

<sup>3</sup>Dla mRNA 1-7 wyznaczono ogólne parametry opisujące rozpad mRNA, bez specyfikacji na 5' i 3' koniec.

<sup>4</sup>Normalizacja wydajności translacji względem ARCA-Luc-A<sub>60</sub>.

### 2.4.2.3. Translacja i stabilność egzogennego histonowego mRNA

*Eksperymenty zostały przeprowadzone przez Wei Sui, PhD*

Opisany system eksperymentalny został zaadaptowany do badania degradacji reporterowego mRNA zawierającego 3' UTR z ludzkiego histonowego mRNA wprowadzonego do komórek HeLa zsynchronizowanych w fazie S cyklu komórkowego. Pomiar degradacji od końców 3' i 5' był śledzony przy wykorzystaniu odmiennych zestawów starterów do PCR (**Rys. 2.42C**). Zarówno mRNA zawierające analog ARCA jak i BTH ulegały zanikowi w kinetyce dwufazowej jednakże mRNA posiadające BTH wykazały znacznie większą stabilność (**Tab. 2.15**). Zastąpienie pętli SL przy użyciu innej poczwórnej pętli (TL) uniemożliwia wiązanie się histonowego mRNA z białkiem SLBP uniemożliwiając rozpoczęcie translacji. Takie reporterowe mRNA także nie było aktywne translacyjnie a jego rozpad zachodził znacznie szybciej (zgodne z założeniem, że zajęcie dekapingu jest czynnikiem determinującym degradację tylko aktywnych translacyjnie mRNA). W przypadku braku translacji inne procesy stają się dominujące i czas przestoju ulega znacznemu skróceniu.

#### 2.4.2.4. Destabilizacja histonowego mRNA przez hydroksymocznik.

*Eksperymenty zostały przeprowadzone przez Wei Sui, PhD*

W hodowli komórkowej stres replikacyjny może zostać zaindukowany poprzez dodatek hydroksymocznika (HU), inhibitora reduktazy rybonukleotydów, do podłoża hodowlanego. W takich warunkach zaobserwowano szybki rozpad egzogennej mRNA ( $t_{1/2} \sim 20$  min, zobacz **Tab. 2.15**). Dla transkryptów ARCA-Luc-SL obserwowano prawie całkowity zanik fazy przestoju dla sekwencji 3' oraz 5' natomiast dla odpornych na działanie Dcp2 transkrypty BTH-Luc-SL odnotowano znaczny spadek czasu półtrwania dla sekwencji 3'. Uzyskane rezultaty wskazują, że, podobnie do endogennej histonowej mRNA, reporterowe mRNA zawierające 3' UTR histonowej mRNA są destabilizowane przez obecność HU. Jest to zgodne ze wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi nokautów genetycznych komponentów egzozomu, które mają silniejszy wpływ stabilizujący na histonowe mRNA w obecności HU niż nokauty białek zaangażowanych w ścieżkę degradacji 5' -> 3'.

#### 2.4.2.5. Potwierdzenie roli Dcp2 w degradacji egzogennej mRNA

*Eksperymenty zostały przeprowadzone przez Wei Sui, PhD*

Zwiększona stabilność transkryptów BTH-Luc-SL w porównaniu ARCA-Luc-SL sugeruje, że faza przestoju jest związana z czasem potrzebnym do usunięcia kapu z mRNA. Dekapung inicjuje rozpad egzonukleolityczny 5'-3' jednakże gdy jest on blokowany (np. przez wprowadzenie kapu odpornego na działanie Dcp2) to faza szybkiej degradacji ulega opóźnieniu a mRNA jest degradowane przy udziale innych ścieżek rozpadu. W celu uzyskania pewności, że to Dcp2 a nie inne białko degradujące kap, jest odpowiedzialne za rozpad transkryptów ARCA-Luc-SL uzyskano linię komórkową z nokautem Dcp2 i wykonano na niej badania stabilności egzogennej mRNA. Otrzymane wyniki wskazały, że wprowadzone mRNA jest znacznie stabilniejsze w tej linii komórkowej co potwierdza hipotezę dotyczącą udziału Dcp2 w degradacji reporterowego mRNA.

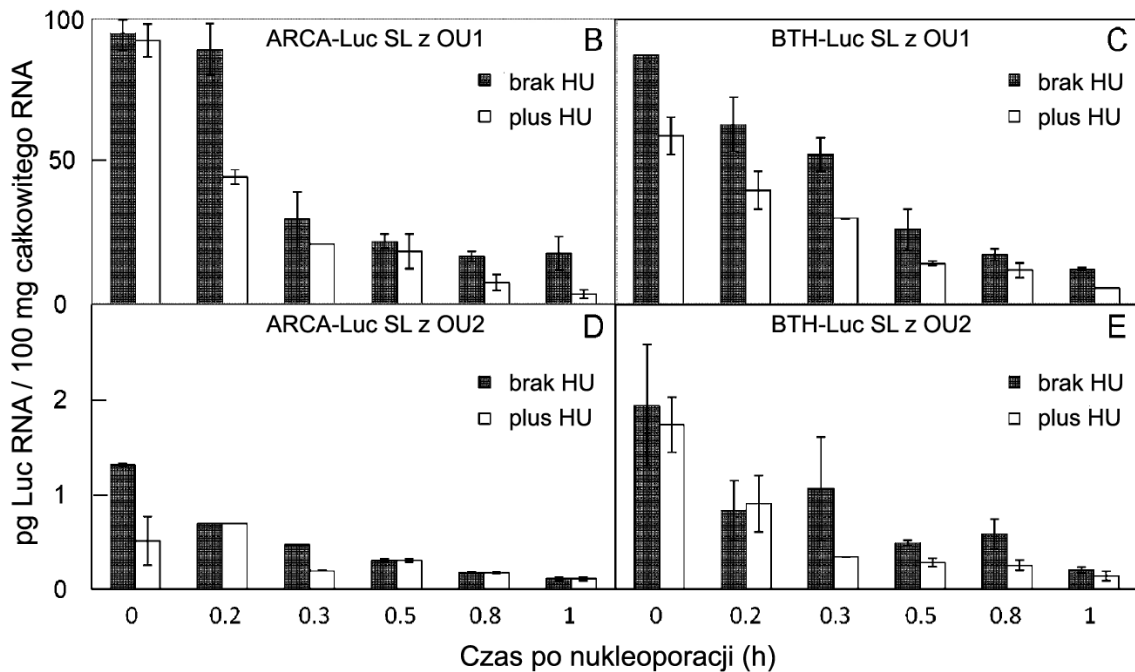
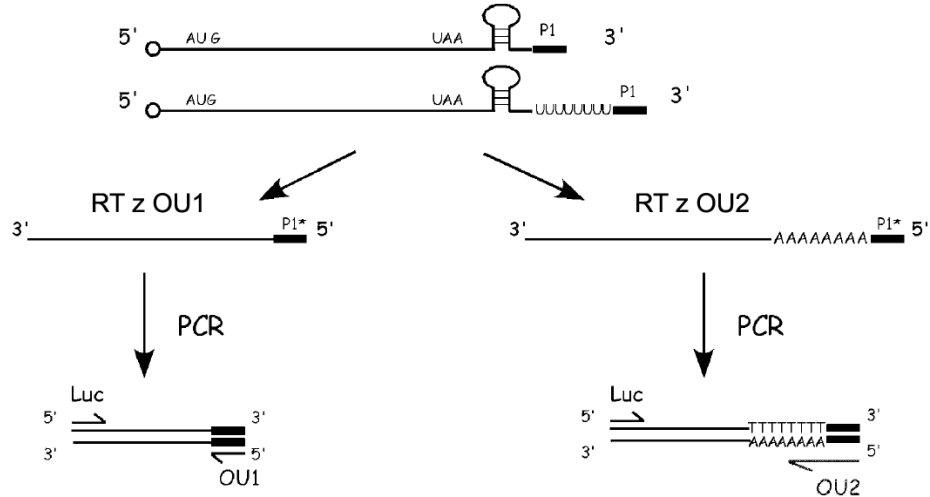
#### 2.4.2.6. Badania oligourydylacji histonowego mRNA

Wcześniejsze badania nad degradacją histonowej mRNA wskazywały na obecność łańcuchów poliU ulokowanych na 3' końcu transkryptów histonowej mRNA po ekspozycji komórek na HU. Jednakże eksperymenty te prowadzono na populacji niezmiennych w czasie (ang. *steady-state*) i nie było możliwe ustalenie czy oligourydylacja ma decydujący wpływ na kinetykę degradacji mRNA oraz czy zachodzi ona przed czy po etapie usuwania kapu. W celu przeprowadzenia badań poliurydylacji zaadaptowano wcześniej opracowany protokół ligacji RNA sprzężonej z RT-PCR (LC-RT-PCR, zobacz **Rys. 2.43A**). Całkowite RNA wyizolowane z komórek po nukleoporacji poddano ligacji do łącznika DNA (nazwanego P1) używając ligazy RNA T4 a w reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano dwa alternatywne startery. Starter OU1 był komplementarny do P1 zatem wszystkie RNA zligowane do P1 ulegają przekopiowaniu na cDNA. Starter OU2 posiadał dodatkowe 5 reszt adenozyne na 3' końcu komplementarnym do P1 przez co jedynie poliurydylowane mRNA mogły ulec odwrotnej transkrypcji. Wybór pięciu reszt A był kompromisem pomiędzy uzyskaniem znacznej ilości fałszywie pozytywnych wyników w przypadku użycia bardzo krótkiego traktu poliA a znaczną redukcją ilości wyników w przypadku użycia dłuższego łańcucha poliA. Poziom transkryptów ARCA-Luc-SL oraz BTH-Luc-SL amplifikowanych z użyciem OU1 zanikał stopniowo w czasie natomiast dodatek HU przyspieszał ten proces. Amplifikacja transkryptów z użyciem startera OU2 uwidoczniała, że poziom oligourydylowanego mRNA jest znacznie niższy, ponieważ stanowi ~1-2% poziomu transkryptów uzyskanych z OU1. W odróżnieniu od transkryptów pozbawionych ogona oligoU, obecność HU miała jedynie minimalny wpływ na ilość transkryptów uzyskanych z OU2. By poznać spektrum produktów uzyskanych z amplifikacji BTH-Luc-SL oraz ARCA-Luc-SL z użyciem starterów OU1 oraz OU2 przeprowadzono odwrotną transkrypcję z udziałem radioaktywnego ATP i przeprowadzono analizę powstałych produktów za pomocą wysokorozdzielczej elektroforezy SDS PAGE (**Rys. 2.44A**). Główny produkt uzyskany po amplifikacji z OU1 składał się z klastra transkryptów o długościach 224, 229 oraz 233 nt co jest

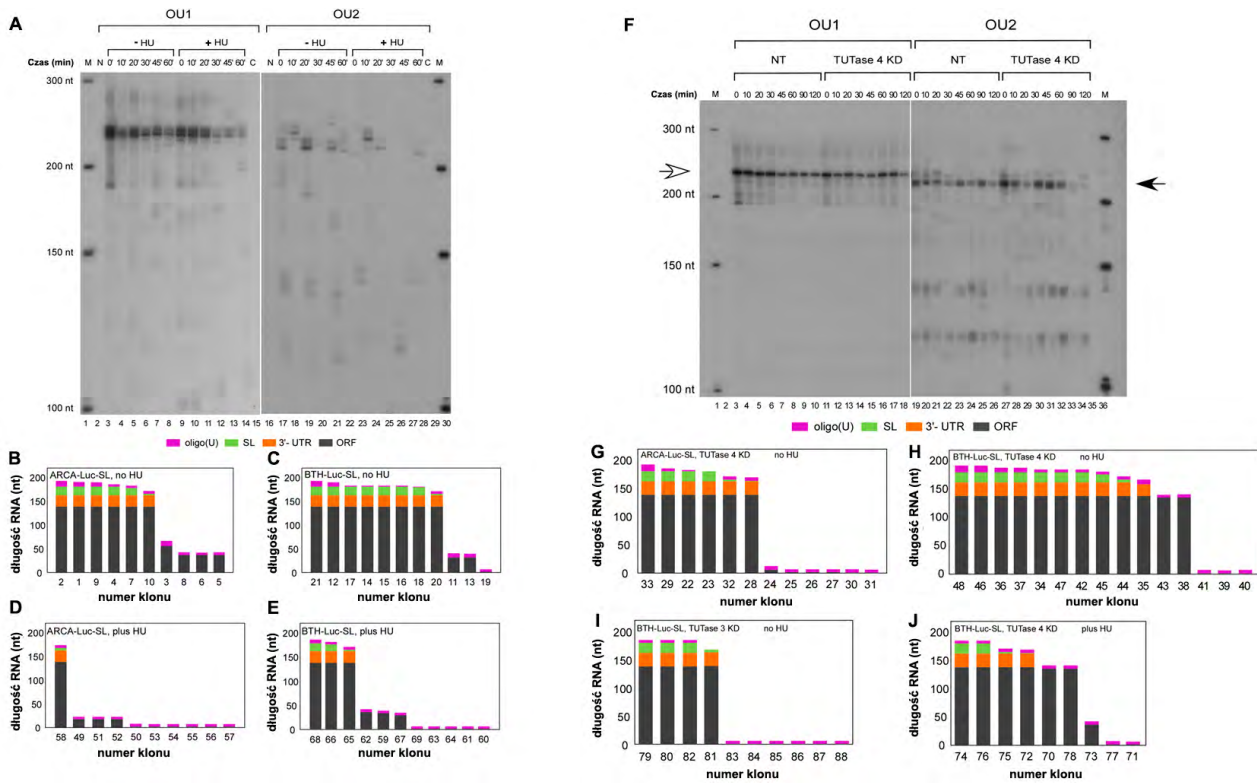


A

P1 Linker 5'- [phos]GGTCACCTTGATCTGAAGC[Amc7~Q] -3'  
 OU1 primer 5'- GCTTCAGATCAAGGTGACC -3'  
 OU2 primer 5'- GCTTCAGATCAAGGTGACCAAAAA -3'



**Rys. 2.43.** Detekcja oligourydylacji Luc-SL mRNA poprzez wykorzystanie RT-PCR sprzężonego z ligacją (LC-RT-PCR). (A) Schemat ideowy działania techniki LC-RT-PCR. Transkrypty ARCA-Luc-SL (B, D) lub BTH-Luc-SL (C, E) wprowadzono do komórek HeLa (po ich wcześniejszej synchronizacji do fazy S cyklu komórkowego) poprzez nukleoporcję. RNA zostały wyizolowane i oczyszczone, poddane ligacji do łącznika P1, amplifikowane z wykorzystaniem startera OU1 (B, C) lub OU2 (D, E) i oznaczone ilościowo za pomocą RT-PCR. Wybrane hodowle zostały natychmiast po nukleoporcji potraktowane HU (białe kolumny). Słupki błędów reprezentują podwójne powtórzenia eksperymentów.



**Rys. 2.44.** Analiza oligourydylacji RNA. (A) Transkrypty BTH-Luc-SL wprowadzono do komórek HeLa w fazie S cyklu komórkowego i po wydzieleniu RNA zostały amplifikowane przy pomocy LC-RT-PCR z użyciem startera OU1 (linie 3-14) lub OU2 (linie 17-28). Komórki były hodowane w standardowych warunkach (linie 3-8, 17-22) lub poddane działaniu HU (linie 9-14, 23-28). Znaczniki długości DNA oznaczono jako M (linie 1, 30). Produkty LC-RT-PCR z RNA wyizolowanych z komórek HeLa, do których nie wprowadzono transkryptów Luc-SL oznaczono jako N (linie 2, 16). Reakcje PCR, gdzie nie wprowadzono żadnego cDNA (kontrola bez matrycy) oznaczono jako C (linie 15, 29). Obraz reprezentuje jeden żel sekwencyjny ale lewa połowa pochodzi z filmu po ekspozycji przez 16 h, podczas gdy prawa połowa pochodzi z filmu poddanego ekspozycji przez 32h. (B-E) Produkty LC-RT-PCR z RNA wyizolowane po 30 minutach zostały amplifikowane z użyciem startera OU2, sklonowane oraz poddane sekwencjonowaniu. Dane uzyskano zarówno dla transkryptów ARCA-Luc-SL (B, D) oraz BTH-Luc-SL (C, E). Wszystkie sekwencje zawierają trakt poliU (magenta) oraz różnorodne kombinacje sekwencji SL (zielony), fragmentu 3' UTR powyżej SL (pomarańczowy) oraz ORF (szary). (F) Analiza produktów LC-RT-PCR uzyskanych z transkryptów Luc-SL w komórkach po nokaucie TUTazy 4. Produkty zostały analizowane w taki sam sposób jak w przypadku (A), poza tym, że mRNA wyizolowano z komórek po nokaucie (linie 11-18, 27-41) lub komórek NT (linie 3-10; 19-26). Biała strzałka wskazuje pozycję głównego produktu OU1 podczas gdy czarna strzałka wskazuje pozycję głównego produktu OU2. Znaczniki DNA oznaczono jako M (linie 1, 36). Obraz reprezentuje jeden żel sekwencyjny ale lewa połowa pochodzi z filmu po ekspozycji przez 7 h, podczas gdy prawa połowa pochodzi z filmu poddanego ekspozycji przez 70 h. (G-J). Podsumowanie analizy sekwencji z produktów LC-RT-PCR przeprowadzone tak samo jak w przypadku paneli B-E.

że nokaut TUTazy4 także stabilizuje transkrypty z niehydrolyzowalnym kapem sygnalizuje brak zależności degradacji 3'→5' od usunięcia struktury kapu. Natomiast obserwacja, że dodanie HU zaburza efekty nokautu TUTazy4 sugeruje zachodzenie szybkiej degradacji transkryptów z sekwencją SL po zablokowaniu syntezy DNA, która nie jest związana z aktywnością tego białka.

W celu lepszego zrozumienia udziału TUTazy4 w procesie degradacji histonowego mRNA porównano spektrum produktów LC-RT-PCR po nukleoporcji transkryptów ARCA-Luc-SL oraz BTH-Luc-SL do komórek HeLa z nokautem TUTazy4 jak i kontroli złożonej z niemodyfikowanych komórek. Podobnie jak w poprzednim przypadku posłużono się w tym celu wysokorozdzielczą elektroferezą SDS PAGE (Rys. 2.44F) Większość produktów uzyskanych z OU1 posiadało długość 231 nt, blisko długości nienaruszonego mRNA. Produkty uzyskane z OU2 były wciąż obecne, główne prążki widoczne na żelu miały długość 223 oraz 219 nt. Wykazano ponadto, że były one bardziej zauważalne i stabilne w czasie dla komórek z nokautem TUTazy4 niż kontroli.

Klonowanie i sekwencjonowanie produktów LC-RT-PCR pokazało że w komórkach z nokautem większość klonów

zawierających sekwencję SL to transkrypty BTH-Luc-SL (**Rys. 2.44G-J**). Sugeruje to, że opóźnienie degradacji 3'-5' zachodzi częściej na poziomie kompleksu SL/SLBP gdy poziom TUTazy4 jest zredukowany. Produkty zawierające pełną sekwencję kodującą ale brak 3' UTR zaobserwowano jedynie w komórkach z nokautem. Jest to spójne z modelem, gdzie założono, że opóźnienie degradacji 3'-5' zachodzi częściej na kodonie stop w przypadku redukcji poziomu TUTazy4. Dodatkowo zaobserwowano obecność poliurydylowanych produktów w komórkach z nokautem TUTazy3, które były podobne dla produktów widocznych w komórkach kontrolnych.

Warto nadmienić, że dalsze badania prowadzone w grupie prof. R. E. Rhoadsa udowodniły, że zablokowanie końca 3' histonowego mRNA za pomocą kordycepiny ma pozytywny wpływ na jego stabilność. Oznacza to, że ścieżka degradacji 3'-5' ma istotny wkład do ogólnego rozpadu histonowego mRNA.

#### **2.4.2.8. Dyskusja i komentarz uzyskanych wyników**

Wcześniejsze badania sugerowały, że histonowe mRNA podlega degradacji inicjowanej przez oligourydylację końca 3' oraz następujące po tym dekaping i hydroliza od 5' końca. Jednakże do tej pory nie udało się jednoznacznie roli dekapingu oraz wkładu pochodzącego od ścieżki 3'-5' w ogólnej degradacji histonowego mRNA. Ponadto nie ma jednoznacznej opinii czy oligourydylacja histonowego mRNA odgrywa kluczową rolę w jego inicjacji degradacji a jeśli tak czy występuje w innych przypadkach niż szybki rozpad tego mRNA pod koniec fazy S cyklu komórkowego.

Wykorzystanie niehydrolizowalnych analogów kapu pozwoliło na uzyskanie nowych informacji na temat stabilności histonowego mRNA w komórkach. Wykazano, że zarówno ścieżka degradacji 3'-5' jak i 5'-3' mają istotny wkład w degradację mRNA posiadających motyw strukturalny SL zarówno w fazie S jak i w sytuacji gdy synteza DNA ulega zahamowaniu. Urydylacja motywu SL predestynuje histonowe mRNA do szybszej degradacji (niezależnie od tego czy 3' koniec jest zablokowany przez kordycepinę). Ponieważ wzorzec oligourydylacji był taki sam dla transkryptów ARCA-Luc-SL oraz BTH-Luc-SL to bardzo prawdopodobne jest to, że proces ten jest niezależny od usuwania kapu z mRNA.

Użyty reporterowy mRNA wykazuje pewne różnice w porównaniu do endogennego histonowego mRNA. Po pierwsze wykorzystano ORF lucyferazy, po drugie takie mRNA nie posiada „historii jądrowej”, która może mieć wpływ na cytoplazmatyczną rolę mRNA. Jednakże szereg obserwacji sygnalizuje, że egzogenne histonowe mRNA jest metabolizowane w ten sam sposób jak jego endogenny odpowiednik. i) Obecność sekwencji SL zapewnia wydajną translację transkryptów Luc-SL poprzez wiązanie się do białka SLBP ii) mRNA Luc-SL są destabilizowane przez dodatek HU, podobnie jak endogenne histonowe mRNA iii) Zaobserwowane oligourydylowane produkty degradacji wykazują podobieństwo do wcześniej opisanych produktów rozpadu endogennych RNA.

Zaobserwowanie fazy przestoju w kinetyce rozpadu wprowadzonego mRNA zostało zinterpretowane jako czas upływający przed inicjacją dekapingu podczas gdy faza szybkiej degradacji odzwierciedla zastopowanie translacji i następczą hydrolizę mRNA. Wprowadzenie niehydrolizowalnego kapu wydłuża fazę przestoju (z ~10 do ~40 min) co świadczy o istotnej roli usuwania kapu w kontroli stabilności mRNA. Szybki rozpad niezdolnego do translacji egzogennego mRNA (mutacja w sekwencji SL) świadczy o tym, że jedynie mRNA związane z maszyną translacyjną jest chronione przed degradacją.

Do tej pory mechanizm i znaczenie oligourydylacji histonowego mRNA nie został dobrze poznany. Uzyskane tutaj wyniki sugerują, że obecność sekwencji SL jest wystarczająca by zapoczątkować oligourydylację, niezależnie od rodzaju ORF ponadto oligourydylacja przyspiesza degradację takiego mRNA. Modyfikacja końców 3' oraz 5' odpowiednio przez kordycepinę oraz niehydrolizowalny analog kapu stabilizuje transkrypt zarówno w standardowych warunkach jak i po dodaniu HU co jest zgodne z zaproponowanym modelem w którym obecność poliU jest wymagana dla egzozonukleolitycznej degradacji, niezależnie od jej kierunku.

Nie udało się jednoznacznie zidentyfikować która TUTaza jest zaangażowana w oligourydylację histonowego mRNA. Wcześniejsze doniesienia literaturowe sygnalizują, że w ten proces mogą być zaangażowane różne białka z grupy TUTaz. Przeprowadzone tutaj badania pokazały, że nokaut TUTazy4 spowalnia rozkład histonowego mRNA pod koniec fazy S cyklu komórkowego jednak nie ma on wpływu na rozkład indukowany obecnością HU. co wspiera model zakładający, że w kontroli trwałości histonowego mRNA zaangażowane są także inne polimerazy poliU RNA.



Analiza sklonowanych produktów LC-RT-PCR wskazała, że łańcuch poliU może być dołączony w różnych miejscach transkryptu jednak większość z nich znajdowała się w obszarze sekwencji SL lub jej sąsiedztwie. Wiele klonów było częściowo zdegradowanych aż do obszaru SL i miało tam przyłączony trakt poli(U). Blokowanie degradacji w takich przypadkach jest dość często obserwowane i zwykle jest wywołane obecnością złożonych struktur drugorzędowych RNA lub przyłączonych kompleksów białkowych. Zjawisko to może wymuszać re-oligourydlacja mRNA w celu jego dalszej degradacji. Co więcej, nie można wykluczyć, że proces ten jest katalizowany przez inną TUTazę niż „pierwotna” oligourydlacja nienaruszonego histonowego mRNA.

## 2.5. Podsumowanie badań własnych

- ❖ Przeprowadzono syntezę szeregu modyfikowanych chemicznie analogów kapu, zawierających modyfikacje w łańcuchu fosforanowym (metylenobisfosfonianowa, diimidofosforanowa, tiofosforanowa, boranofosforanowa), z których większość została otrzymana po raz pierwszy. Uzyskano 8 nowych analogów m<sup>7</sup>GTP oraz 11 analogów m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G. Kilka innych związków opisanych wcześniej w literaturze uzyskano na nowych drogach syntetycznych.
- ❖ Rozwinięto nowe metody syntezy nukleotydów zawierających wspomniane modyfikacje w łańcuchu fosforanowym. Pierwsza z metod opiera się na wykorzystaniu imidazolowej pochodnej β-cyjanofosforanu a druga na wykorzystaniu aktywowanych imidazolem nieorganicznych difosforanów. Wykorzystanie tych aktywowanych fosforanów/fosfonianów pozwala na syntezę związków, których uzyskanie za pomocą innych metod jest bardzo skomplikowane lub obecnie niemożliwe.
- ❖ Otrzymano szereg fluorescencyjnie znakowanych difosforanowych analogów kapu zdolnych do inkorporacji do mRNA (5 analogów m<sup>7</sup>GpppG oraz 5 mononukleotydowych analogów kapu). Analogi m<sup>7</sup>GpppG tego rodzaju nie były wcześniej opisane w literaturze, ponadto część z nich posiada modyfikacje metylenobisfosfonianową zapewniającą odporność na działanie enzymu Dcp2 lub DcpS. W serii przykładowych eksperymentów biofizycznych zaproponowano zastosowanie tych analogów kapu do badań oddziaływań kap-białko oraz pomiarów kinetyki enzymatycznej.
- ❖ Opisane wcześniej związki zostały poddane podstawowej analizie chemicznej oraz biochemicznej. Określono takie właściwości jak wiązanie się do białka eIF4E, odporność na degradację enzymatyczną, inkorporację do mRNA, podatność tak otrzymanych transkryptów na białko SpDcp2 oraz wydajność translacji zależnej od kapu (lub jej inhibicji) *in vitro*. W wyniku tych badań znaleziono m.in. szereg silnych inhibitorów translacji opartych na strukturze m<sup>7</sup>GTP.
- ❖ Odkryto serię nowych inhibitorów enzymu DcpS opartych na strukturze m<sup>7</sup>GDP oraz m<sup>7</sup>GTP. Wyznaczono stałe asocjacji do DcpS oraz w przypadku niektórych związków wartości IC<sub>50</sub>.
- ❖ Opracowano metodę poszukiwania inhibitorów kompleksu enzymatycznego SpDcp1/2 opartą na pomiarze szybkości hydrolizy kapu dla znakowanych radioaktywnie transkryptów. Postęp reakcji jest śledzony za pomocą wysokorozdzielczej elektroforezy SDS PAGE i następczej analizie densytometrycznej
- ❖ Stosując opisaną wcześniej metodę znaleziono szereg inhibitorów kompleksu Dcp1/2, którymi są analogi kapu zawierające modyfikację tio- lub boranofosforanową. Są to pierwsze i jak do tej pory jedyne małowcząsteczkowe inhibitory Dcp2 opisane w literaturze. Do dalszych badań kinetycznych i strukturalnych

wyselekcjonowano najsilniejszy inhibitor, m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>ppp<sub>s</sub>m<sup>7</sup>G izomer D3 (**14b**).

- ❖ Przeprowadzono szereg badań kinetycznych pozwalających na poznanie mechanizmu inhibicji Dcp2 przez **14b**. Związek ten jest inhibitorem mieszanym wykazującym powinowactwo zarówno do wolnego enzymu jak i kompleksu enzym-substrat. Wiąże się on silniej z wolnym enzymem a obecność jednostki regulatorowej kompleksu, Dcp1 nie ma istotnego wpływu na aktywność inhibitora.
- ❖ Wykazano, że wydłużenie mostka fosforanowego analogu kapu do tetrafosforanu czyni go podatnym na działanie enzymu Dcp2. Wcześniej uważano, że enzym ten jest katalitycznie aktywny jedynie wobec transkryptów RNA posiadających strukturę kapu i nie jest on zdolny do hydrolizy niezwiązanych analogów kapu.
- ❖ Wykorzystując spektroskopię NMR ustalono, które reszty aminokwasowe są odpowiedzialne za interakcje z inhibitorem, wyznaczono także w ten sposób szereg mikroskopowych stałych dysocjacji dla reszt aminokwasowych wiążących się z inhibitorem. Dodatkowo wykorzystując technikę DLS pokazano, że obecność szeregu innych analogów kapu nie wpływa na konformację kompleksu SpDcp1/2.
- ❖ Na podstawie danych kinetycznych oraz strukturalnych (NMR, DLS) zaproponowano ogólny mechanizm działania inhibitorów Dcp2. Przedstawiono także przykładowe doświadczenia pomocne w jego weryfikacji. Wstępne wyniki badań krystalograficznych także potwierdzają proponowany mechanizm.
- ❖ Na przykładzie badań degradacji histonowego mRNA pokazano zastosowania modyfikowanych chemicznie analogów kapu w badaniach biochemicznych nad metabolizmem mRNA w warunkach komórkowych.

# MATERIAŁY I METODY

## 3.1. Synteza organiczna

### 3.1.1. Podstawowe odczynniki i reagenty

Jeżeli nie zaznaczono inaczej rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne zakupiono z firmy Sigma-Aldrich i użyto bez dalszego oczyszczania lub innych procedur. We wszystkich eksperymentach używano wody dejonizowanej (mQ) oczyszczanej w dwustopniowym systemie TKA Pacific złożonym z odwrotnej osmozy i dejonizacji.

Bezwodny aceton i acetonitryl (zawartość  $H_2O < 5$  ppm, wyznaczona metodą Karla Fischera) otrzymywano przez destylację z nad  $P_4O_{10}$ . Bezwodną trietyloaminę, 2,6-lutydynę i THF otrzymywano przez destylację z nad KOH. Bezwodny DMF, DMSO i fosforan trimetylu uzyskano przez przechowywanie nad sitami molekularnymi  $3\text{Å}$  lub  $4\text{Å}$  przez co najmniej 24h przed użyciem. Bezwodny  $CH_2Cl_2$  otrzymano w dwustopniowej procedurze. W pierwszym etapie  $CH_2Cl_2$  ogrzewano do wrzenia pod chłodzeniem zwrotnym z  $CaH_2$  przez co najmniej 4 h a następnie rozpuszczalnik został przedestylowany. Wszystkie bezwodne rozpuszczalniki przechowywano nad sitami molekularnymi  $3\text{Å}$  lub  $4\text{Å}$  w butelkach z ciemnego szkła.

Wodny roztwór wodorowęglanu trietyloamoniowego (TEAB) stosowany w chromatografii jonowymiennej otrzymano nasycając gazowym  $CO_2$  mieszaninę  $585\text{ cm}^3$  destylowanej trietyloaminy i  $2415\text{ cm}^3$  wody mQ w temperaturze  $4^\circ C$  przez 48 h. Uzyskany w ten sposób bufor o stężeniu  $1,4\text{ M}$  i  $pH\ 7,8$  przechowywano w  $4^\circ C$  i rozcieńczano wodą MQ do potrzebnego (odpowiedniego) stężenia. Bufory do HPLC sporządzano z odczynników o czystości HPLC (J.T. Baker).

### 3.1.2. Przygotowanie soli trietyloamoniowych:

Jeżeli nie zaznaczono inaczej nukleotydy i nieorganiczne fosforany dostępne handlowo w postaci soli sodowych zamieniano na sole trietyloamoniowe (TEA) na kationicie Dowex  $W\times 8$  (Mesh 50–100) według poniższej procedury: wodny roztwór odpowiedniej soli nanoszono na kationit w postaci kwasowej lub soli trietyloamoniowej a następnie przez kolumnę przepuszczano wodę (ok.  $500\text{ cm}^3$ ). Tak otrzymany eluat odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. W końcowej fazie odparowywano 3-krotnie z bezwodnym etanolem ( $\sim 50\text{ cm}^3$ ) i suszono *in vacuo* nad  $P_4O_{10}$  by otrzymać suche sole trietyloamoniowe.

### 3.1.3. Metody chromatograficzne

#### 3.1.3.1. Chromatografia adsorpcyjna

Chromatografia kolumnowa

Do adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej używano silikażelu 70-230 Mesh (Silikażel 60).

Chromatografia płytkowa (TLC)

Stosowano płytki silikażelowe indykatozem z indykatozem fluorescencyjnym aktywnym przy długości fali  $254\text{ nm}$ , postępowanie chromatografii śledzono przy użyciu lampy UW ( $254\text{ nm}$ ).

#### 3.1.3.2. Chromatografia jonowymienna:

Jeżeli nie zaznaczono inaczej wszystkie nukleotydowe produkty pośrednie oraz końcowe wyizolowano stosując chromatografię jonowymienną na złożu DEAE-Sephadex A-25 (forma  $HCO_3^-$ ) używając liniowego gradientu buforu trietyloamina-węglan (TEAB) w wodzie MQ wedle poniższej procedury:

Rozcieńczoną mieszaninę reakcyjną nanoszono na kolumnę wypełnioną złożem DEAE-Sephadex. Następnie

kolumnę przemywano wodą mQ w celu usunięcia zanieczyszczeń takich jak kompleksy EDTA z kationami dwuwartościowymi oraz związków nie oddziałujących ze złożem np. nieprzereagowanych nukleozydów. W tym czasie wyciek z kolumny sprawdzano za pomocą 1% roztworu  $\text{AgNO}_3$ . Powstawanie białawego osadu świadczyło, że z kolumny wymywane są jeszcze zanieczyszczenia i inne nie wiązane przez złożę związki. Kiedy osad nie był już obserwowany rozpoczynano liniowy gradient buforu TEAB w wodzie mQ. Po skończonej chromatografii wszystkie frakcje analizowano za pomocą spektrofotometru UV-VIS stosując długość fali charakterystyczną dla pochodnych nukleotydu (260 nm). Frakcję zawierającą produkt łączono, mierzono całkowitą ilość jednostek optycznych w odpowiednim buforze (pH 6,0 dla pochodnych  $\text{m}^7\text{G}$ , za wyjątkiem pochodnych  $\text{m}^7\text{GpppG}$  oraz pH 7,0 dla innych nukleotydu) i odparowywano na wyparce próżniowej. W celu usunięcia buforu TEAB roztwór kilkakrotnie odparowywano z etanolem a produkty otrzymywano w postaci soli trietyloamoniowych. Wydajności były wyznaczane na podstawie pomiaru masy produktu albo spektrofotometrycznie, na w oparciu o ilość obliczonych jednostek gęstości optycznej produktu ( $\text{OD}_{260}$ ). W niniejszej pracy  $\text{OD}_{260}$  zdefiniowano jako absorpcję roztworu związku w 0,1 M buforze fosforanowym (pH = 6,0 lub 7,0) przy długości fali 260 nm pomnożoną przez objętość roztworu wyrażoną w  $\text{cm}^3$ .

### 3.1.3.3. Chromatografia RP-HPLC:

Na potrzeby pomiarów NMR oraz do wszystkich badań biofizycznych lub biochemicznych produkty syntez dodatkowo oczyszczano za pomocą pół-preparatywnego HPLC w układzie faz odwróconych i po trzykrotnie powtórzonej procedurze liofilizacji uzyskano w postaci soli amoniowych.

Pomiary analityczne przeprowadzono na aparacie HPLC Agilent Tech. Series 1200 wykorzystując kolumnę Supelcosil LC-18-T RP ( $4,6 \times 250$  mm, przepływ  $1,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ). W trakcie pomiaru stosowano detekcję UV przy 260 nm oraz detekcję fluorescencyjną (wzbudzenie przy 280 nm i emisja przy 337 nm).

Rozdziały pół-preparatywne przeprowadzono na urządzeniu Agilent Tech. Series 1200 używając kolumny Discovery RP Amide ( $21,2 \times 250$  mm,  $5 \mu\text{m}$ , przepływ  $5,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Stosowano takie same metody detekcji jak w przypadku pomiarów analitycznych.

#### Metoda analityczna I:

bufor A – 0,05 M roztwór  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH = 5,9

bufor B – mieszanina 1:1 (v/v) buforu A i metanolu.

Analizę prowadzono w liniowym gradiencie buforu B w buforze A od 0 do 50% B w ciągu 30 min.

#### Metoda analityczna II:

bufor A – 0,05 M roztwór  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH = 5,9

bufor B – mieszanina 1:1 (v/v) buforu A i metanolu.

Rozdział prowadzono w liniowym gradiencie buforu B w buforze A od 0 do 100% B w ciągu 30 min.

#### Metoda analityczna III:

bufor A – 0,05 M bufor fosforanowy, pH = 7,0

bufor B – mieszanina 1:1 (v/v) buforu A i metanolu.

Rozdział prowadzono w liniowym gradiencie buforu B w buforze A od 0 do 50% B w ciągu 30 min.

#### Metoda preparatywna I:

bufor A – 0,05 M roztwór  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH = 5,9

bufor B – mieszanina 1:1 (v/v) buforu A i acetonitrylu.

Rozdział prowadzono w liniowym gradiencie buforu B w buforze A od 0 do 30% B w ciągu 240 min.

## Metoda preparatywna II:

bufor A – 0,05 M roztwór  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH = 5,9

bufor B – mieszanina 1:1 (v/v) buforu A i acetonitrylu.

Rozdział prowadzono w liniowym gradiencie buforu B w buforze A od 0 do 30% B w ciągu 120 min.

### 3.1.4. Potwierdzenie struktury związków

Strukturę i homogeniczność każdego z końcowych produktów syntez potwierdzono za pomocą chromatografii RP HPLC, spektrometrii mas z jonizacją opartą na technice elektroosprawy w trybie jonów ujemnych (MS ESI<sup>-</sup>) lub jonów dodatnich (MS ESI<sup>+</sup>) oraz spektroskopii NMR. Widma  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{31}\text{P}$  NMR zarejestrowano w temperaturze 25°C na spektrometrze Varian UNITY-plus przy odpowiednio 399,94 MHz i 161,90 MHz. Przesunięcia w widmach  $^1\text{H}$  NMR odniesiono do 3-trimetylsilyl-[2,2,3,3-D<sub>4</sub>]-propionianu sodu (TSP) w  $\text{D}_2\text{O}$ , jako wzorca wewnętrznego a przesunięcia w widmach  $^{31}\text{P}$  NMR odniesiono do 20% kwasu ortofosforowego ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) w  $\text{D}_2\text{O}$ , jako wzorca wewnętrznego. Wysokorozdzielcze widma MS rejestrowano na spektrometrze LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific) albo Micromass QToF 1 MS natomiast widma o niższej rozdzielczości rejestrowano na spektrometrze API 3200 (AB Sciex).

Widma emisyjne i absorpcyjne znakowanych fluorescencyjnie analogów kapu wykonano w odgazowanym w eksykatorze 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0 na aparacie LS-55 (Perkin-Elmer). Widma absorpcyjne rejestrowano dla roztworów o stężeniu 10  $\mu\text{M}$  natomiast widma emisyjne dla roztworów o stężeniu 1  $\mu\text{M}$ . Grupa antranoilowa była wzbudzana przy 330 nm natomiast grupa mantranoilowa przy 345 nm.

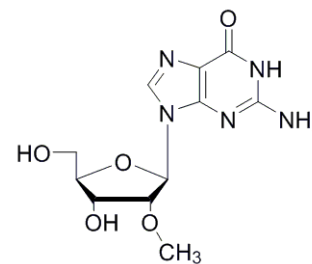
### 3.1.5. Syntezy organiczne

#### 3.1.5.1. Nukleozydy:

##### 2'-*O*-metyloguanozyna

W 500  $\text{cm}^3$  0,5 M wodnego roztworu KOH rozpuszczono 6-*O*-etylo-2'-*O*-metyloguanozynę (7,50 g; 23,94 mmol) i ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 2 h. Następnie produkt został oczyszczony przy pomocy chromatografii jonowymiennej używając złoża Dowex 1×2 (200-400 mesh) oraz 0,3 M buforu TEAB w systemie izokratycznym. Uzyskano 6,80 g (22,74 mmol; wydajność 95%) białego ciała stałego.

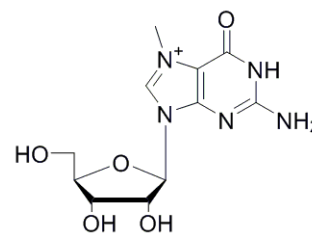
RP HPLC:  $R_T = 14,8$  min (Metoda analityczna I)



##### 7-metyloguanozyna

Suchą guanozynę (5 g; 17,53 mmol) zawieszono w 50  $\text{cm}^3$  DMA i dodano  $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$  (3,75  $\text{cm}^3$ ; 39,54 mmol; 2,26 equiv.). Reakcję prowadzono przez 5,5 h w temperaturze pokojowej. Gdy kontrola HPLC wykazała całkowitą konwersję do produktu pH mieszaniny doprowadzono do 8,0 za pomocą 25% wodnego roztworu  $\text{NH}_3$ . W następnym etapie dodano 200  $\text{cm}^3$  acetonu i mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 2 h w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 300  $\text{cm}^3$  acetonu w celu strącenia całości produktu. Osad odfiltrowano poprzez wirowanie (4 °C, 6000 rpm, 6 min) i przepłukiwano kolejno 80  $\text{cm}^3$  bezwodnego etanolu, 80  $\text{cm}^3$  eteru dietylowego oraz 30  $\text{cm}^3$  eteru dietylowego. Za każdym razem osad filtrowano poprzez wirowanie (4 °C, 6000 rpm, 6 min). Po wysuszeniu *in vacuo* nad  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  uzyskano 4,62 g (wydajność 90%, czystość 74%) białego ciała stałego.

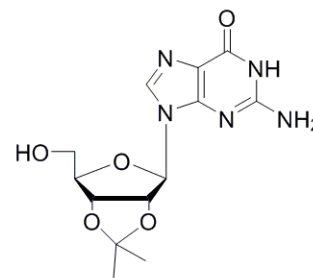
RP HPLC:  $R_T = 8,3$  min (Metoda analityczna I)



### 2',3'-*O*-izopropylidenoguanozyna

Guanozynę (2,20 g; 7,78 mmol) zawieszono w 90 cm<sup>3</sup> acetonu, po 5 min mieszania dodano kwas *p*-toluenosulfonowy (1,60 g; 9,3 mmol; 1,2 equiv.) oraz dimetoksypropan (7,6 cm<sup>3</sup>; 62 mmol, 8 equiv.). Reakcję prowadzono przez 16 h w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę odparowano do połowy pierwotnej objętości. W celu wytrącenia produktu dodano 1,2 cm<sup>3</sup> 25% wodnego roztworu amoniaku. Otrzymany produkt odfiltrowano poprzez wirowanie (4 °C, 6000 rpm, 6 min) a następnie wykrystalizowano z wody mQ (80 cm<sup>3</sup> rozpuszczalnika na 1 g produktu). Po wysuszeniu *in vacuo* nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> uzyskano 1,70 g (wydajność 66%) białego ciała stałego.

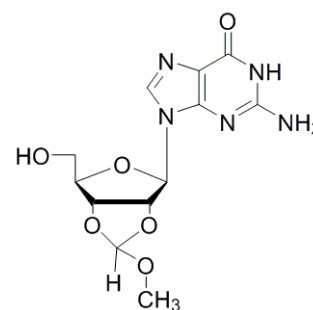
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 16,4 min (Metoda analityczna II)



### 2',3'-*O*-metoksymetylidenoguanozyna

Guanozynę (1,00 g; 3,53 mmol) oraz dihydrat kwasu metyzylenosulfonowego (1,03 g; 4,34 mmol, 1,23 equiv.) zawieszono w 5 cm<sup>3</sup> ortoestru metylu. Po 10 min obydwa substraty uległy rozpuszczeniu a po 20 min powstała biała zawiesina. Reakcję prowadzono przez 12 h i zakończono poprzez dodanie 2 cm<sup>3</sup> uprzednio przygotowanego 2 M roztworu metanolanu sodu w metanolu (0,23 g metalicznego sodu rozpuszczono w 5 cm<sup>3</sup> metanolu). Nieoczyszczony produkt przefiltrowano i przepłukano 3-krotnie za pomocą 4 cm<sup>3</sup> bezwodnego metanolu. Po wysuszeniu *in vacuo* nad KOH uzyskano 1,01 g (wydajność 88%) białego ciała stałego.

ESI<sup>+</sup> MS: obliczona: 326,05; wyznaczona: 326,05

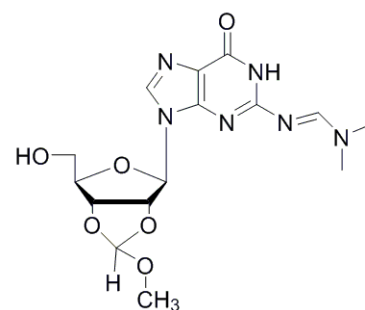


### 2-*N,N*-dimetyloformamidyno)-2',3'-*O*-metoksymetylidenoguanozyna

Reakcję prowadzono w atmosferze argonu. Do mieszanej zawiesiny 2',3'-*O*-metoksymetylidenoguanozyny (650 mg; 2 mmol) w 20 cm<sup>3</sup> bezwodnego acetonitrylu dodano strzykawką przez septum kolejno *N*-etylo-*N,N*-diizopropylaminy (1,0 cm<sup>3</sup>; 6,0 mmol; 3 equiv.) i dimetylooacetal *N,N*-dimetyloformamidu (0,8 cm<sup>3</sup>; 6,0 mmol; 3 equiv.). Reakcję prowadzono przez 15 h w temperaturze pokojowej i kontrolowano za pomocą TLC (silikazela, CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH/9:1). Kiedy analiza TLC wykazała zanik substratu (R<sub>F</sub> 0,40) i pojawienie się jednego produktu (R<sub>F</sub> 0,45) roztwór zatężono na wyparce do około 10 cm<sup>3</sup>, a uzyskany osad odsączono na lejku Schotta i przemyto acetonitrylem. Po wysuszeniu *in vacuo* nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> otrzymano 316 mg (wydajność 42%) szarego ciała stałego.

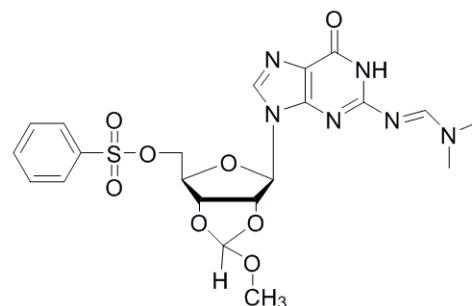
TLC (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH/9:1): R<sub>F</sub> 0,50

ESI<sup>+</sup> MS: obliczona: 383,17; wyznaczona: 383,17



### 2-*N,N*-dimetyloformamidyno)-2',3'-*O*-metoksymetyliden-5'-*O*-tosyloguanozyna

Reakcja prowadzona w atmosferze argonu. 2-*N,N*-dimetyloformamidyno)-2',3'-*O*-metoksymetylidenoguanozynę (125 mg; 0,33 mmol) rozpuszczono w 2,5 cm<sup>3</sup> bezwodnego CHCl<sub>3</sub>. Do roztworu dodano 4-DMAP (112 mg; 0,46 mmol; 1,4 equiv.) i chlorek *p*-toluenosulfonylu (260 mg; 0,66 mmol; 2 equiv.). Po 15 h mieszania, kontrola TLC (silikazela, CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH/8:2) wykazała zanik substratu (R<sub>F</sub> 0,42) i pojawienie się produktu (R<sub>F</sub> 0,55), ponadto widoczne były plamki od 4-DMAP (R<sub>F</sub> 0,14) i chlorku tosyłu (R<sub>F</sub> 0,75). Mieszaninę odparowano do konsystencji gęstego

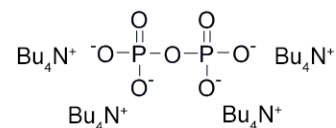


oleju a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii adsorpcyjnej na silikażelu stosując gradient 0-10% metanolu w CH<sub>3</sub>OH. Po wysuszeniu *in vacuo* nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> otrzymano 56 mg (wydajność 25%) żółtego ciała stałego. TLC (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH/8:2): R<sub>F</sub> 0,55  
ESI<sup>+</sup>MS: obliczona: 383,17; wyznaczona: 383,17

### 3.1.5.2. Fosforany i ich pochodne

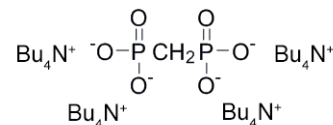
#### Pirofosforan; sól tributylamoniowa

Pirofosforan sodu (1,06 g; 4 mmol) rozpuszczono w 10 cm<sup>3</sup> wody MQ i przepuszczono przez żywicę jonowymienną Dowex 50 W × 8 (200–400 mesh, forma H<sup>+</sup>) a następnie żywicę przepłukano wodą mQ (~500 cm<sup>3</sup>). Eluat zebrano do kolby stożkowej zawierającej 1,45 cm<sup>3</sup> tributylaminy (1,5 equiv) i 50 cm<sup>3</sup> etanolu a następnie odparowano kilkakrotnie z bezwodnego etanolu a później acetonitrylu. W ostatnim etapie dodano niewielkiej ilości wody i poddano liofilizacji. Roztwór w DMF przygotowano poprzez rozpuszczenie otrzymanego szklanego ciała stałego w 4 cm<sup>3</sup> suchego DMF a powstały roztwór przechowywano w szczelnie zamkniętej kolbie nad sitami molekularnymi 4Å.



#### Metyleno(bisfosfonian); sól tributylamoniowa

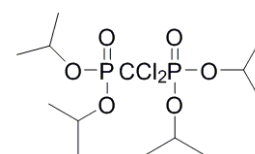
Kwas metyleno(bisfosfonianowy) (250 mg; 1,42 mmol) rozpuszczono w mieszaninie złożonej z 0,5 cm<sup>3</sup> tributylaminy (1,5 equiv.), 25 cm<sup>3</sup> etanolu i 200 cm<sup>3</sup> wody mQ. Mieszaninę odparowano kilkakrotnie z użyciem bezwodnego etanolu i acetonitrylu a następnie dodano niewielkiej ilości wody i poddano liofilizacji. Roztwór w DMF został przygotowany poprzez rozpuszczenie otrzymanego szklanego ciała stałego w 4 cm<sup>3</sup> suchego DMF powstały roztwór przechowywano w szczelnie zamkniętej kolbie nad sitami molekularnymi 4Å.



#### Tetrakis(izopropyl)-P1,P2-dichlorometyleno(bisfosfonian)

Do 150 cm<sup>3</sup> 5% roztworu NaOCl w wodzie dodano NaCl (2 g) i powstały roztwór ochłodzono na łaźni lodowej do temperatury 0 °C. Następnie do intensywnie mieszanego roztworu dodano tetrakis(izopropyl)-P1,P2-metyleno(bisfosfonian) (5 cm<sup>3</sup>; 15,68 mmol) i reakcję chlorowania prowadzono przez 30 min w temperaturze 0 °C. Następnie reakcję prowadzono przez kolejne 30 min w temperaturze pokojowej. Powstały osad produktu odsączono z mieszaniny reakcyjnej i przepłukano wodą mQ. Otrzymany osad rozpuszczono w CHCl<sub>3</sub> i 3-krotnie przepłukano z użyciem 40 cm<sup>3</sup> wody mQ. Fazę chloroformową zachowano i odparowano a powstałe szkliste ciało stałe rozpuszczono w niewielkiej ilości CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i ponownie odparowano. Po kilku godzinach szklista pozostałość uległa zestaleniu. Uzyskano 4,5 g (wydajność 70%) szarożółtego amorficznego ciała stałego.

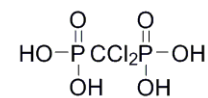
ESI<sup>+</sup>MS: obliczona: 413,08; wyznaczona: 413,08



### kwask P1,P2-dichlorometyleno(bisfosfonianowy)

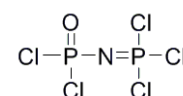
Do 0,5 cm<sup>3</sup> bezwodnego CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dodano bromek trimetylosililu (0,7 cm<sup>3</sup>; 5,3 mmol; 7,3 equiv.) oraz 300 mg tetrakis(izopropyl)-P1,P2-dichlorometyleno(bisfosfonian) (300 mg; 0,73 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w atmosferze argonu. Po 20 h pomiary na MS wykazały całkowite usunięcie grup izopropylowych. Zarówno CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> jak i nieprzereagowany bromek trimetylosililowy usunięto na wyparce próżniowej. Powstała oleista ciecz została 2-krotnie odparowana z 2 cm<sup>3</sup> bezwodnego CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i od razu użyta w następnym etapie syntezy.

ESI-MS: obliczona: 242,88; wyznaczona: 242,88



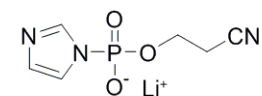
### trichloro-[(dichlorofosfonyl)imino]fosforan; P(O)Cl<sub>2</sub>-N=PCl<sub>3</sub>

PCl<sub>5</sub> (18,25 g; 87,5 mmol; 3,5 equiv.) i suchy (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,3 g; 25 mmol) zawieszono w 50 cm<sup>3</sup> 1,1,2,2-tetrachloroetanu. Mieszaninę doprowadzono do wrzenia i reakcję prowadzono przez 2 h pod chłodnicą zwrotną dopóki roztwór nie uzyskał złoto-brązowego zabarwienia. Następnie na sączku filtracyjnym usunięto osad nieprzereagowanych substratów a klarowny roztwór zatężono na wyparce do postaci gęstego brunatnego oleju, który został wykorzystany jako substrat do dalszych syntez.



### (2-cyanoetyl)-imidazolfosforan; sól litowa

Sól barową (5,0 g; 15,5 mmol) (2-cyanoetyl)-fosforanu zawieszono w 100 cm<sup>3</sup> wody i przepuszczono przez żywicę jonowymienną Dowex 50 W × 8 (200-400 mesh, forma H<sup>+</sup>) a następnie przepłukano wodą mQ (~500 cm<sup>3</sup>). Eluat zebrano do kolby stożkowej zawierającej 3,2 cm<sup>3</sup> TEA i 100 cm<sup>3</sup> etanolu i kilkakrotnie odparowano do sucha z bezwodnym etanolem i wysuszono *in vacuo* nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Tak otrzymana sól TEA wymieszano z imidazolem (10,54 g; 0,155 mol; 10 equiv.), 2,2'-ditiodipirydyną (10,13 g; 46 mmol; 3 equiv.), TEA (4 cm<sup>3</sup>; 30 mmol; 2 equiv.) oraz trifenylofosfiną (12 g; 46 mmol; 3 equiv.) w 25 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMF. Roztwór mieszano przez 7 h, powstały produkt wytrącono roztworem LiClO<sub>4</sub> (6,58 g; 61,90 mmol; 4 equiv.) w 250 cm<sup>3</sup> bezwodnego acetonitrylu. Po ochłodzeniu do 4 °C precypitat został odfiltrowany przez wirowanie (4 °C, 6000 rpm, 6 min), przemyty kilkakrotnie zimnym bezwodnym acetonitrylem i wysuszony *in vacuo* nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.



ESI-MS: obliczona: 200,0; wyznaczona: 200,0

<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 7,99 (s; 1 H); 7,37 (s; 1 H); 7,18 (s; 1 H); 4,07 (td; J = 5,8; 6;6 Hz; 2 H); 2,81 (t; J = 5,8 Hz; 32 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = -7,65 (t; J = 6,6 Hz; 1 P)

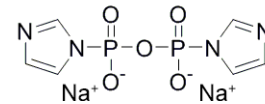
#### 3.1.5.2.1. Ogólna procedura syntezy diimidazolowych pochodnych difosforanów nieorganicznych

Pirofosforan lub jego analog (sól TEA, 1 equiv.), imidazol (20 equiv.), 2,2'-ditiodipirydyna (5 equiv.) oraz TEA (2 equiv.) rozpuszczono w bezwodnym DMF tak aby końcowe stężenie nukleotydu wynosiło około 0,1 M. Następnie dodano trifenylofosfinę (5 equiv.) i mieszaninę pozostawiono na 18 h. Produkt został strącony poprzez dodanie roztworu NaClO<sub>4</sub> (minimum 2,5 equiv. na jeden ładunek ujemny produktu) w suchym zimnym acetonie (~10 cm<sup>3</sup>/1 cm<sup>3</sup> DMF). Następnie mieszaninę schłodzono do około 4 °C i pozostawiona na kilka godzin w tej temperaturze. Wytrącony osad odfiltrowano poprzez wirowanie (4 °C, 6000 rpm, 6 min), przemyty kilkakrotnie zimnym, suchym acetonem oraz wysuszony *in vacuo* nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.



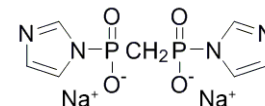
### **P1,P2-diimidazolopirofosforan; sól sodowa**

Wychodząc z pirofosforanu (sól TEA; 1,08 g; 2,84 mmol) uzyskano 0,88 g (sól sodowa; wydajność 97%) białego ciała stałego.



### **P1,P2-diimidazolometyleno(bisfosfonian); sól sodowa**

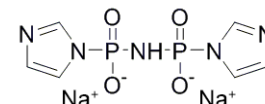
Wychodząc z metyleno(bisfosfonianu) (sól TEA; 1,08 g; 2,84 mmol) uzyskano 0,57 g (sól sodowa; wydajność 63%) białego ciała stałego.



### **P1,P2-diimidazoimidodifosforan; sól sodowa**

Wychodząc z imidodifosforanu (sól TEA, 0,20 g; 0,53 mmol) uzyskano 144 mg (sól sodowa, wydajność 84%) białego ciała stałego.

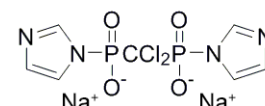
<sup>31</sup>P NMR (ppm)  $\delta$  = 0,50 (s; 1P)



### **P1,P2-diimidazolodichlorometyleno(bisfosfonian); sól sodowa**

Wychodząc z dichlorometyleno(bisfosfonianu) (sól TEA; 0,50 g; 1,12 mmol) uzyskano 0,31 g (sól sodowa; wydajność 71%) białego ciała stałego.

<sup>31</sup>P NMR (ppm)  $\delta$  = -11,28 (s; 1P).



## **3.1.5.3. Nukleotydy**

### **3.1.5.3.1. Pochodne imidazolowe nukleotydów:**

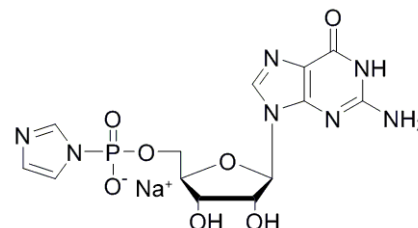
#### **Ogólna procedura przygotowania pochodnych imidazolowych nukleotydów:**

Odpowiedni nukleotyd (sól TEA, 1 equiv.), imidazol (10 equiv.) oraz 2,2'-ditiopirydyna (3 equiv.) rozpuszczono w bezwodnym DMF tak aby końcowe stężenie nukleotydu wynosiło około 0,1 M. Następnie dodano TEA (2 equiv.) oraz trifenylofosfinę (3 equiv.) i mieszaninę pozostawiono na 8-10 godzin. Produkt został strącony poprzez dodanie roztworu NaClO<sub>4</sub> (minimum 2.5 equiv. na jeden ładunek ujemny produktu) w suchym acetonie (~10 cm<sup>3</sup>/1 cm<sup>3</sup> DMF). Następnie mieszanina została schłodzona do około 4 °C i pozostawiona na kilka godzin w tej temperaturze. Wytrącony osad odfiltrowano poprzez wirowanie (4 °C, 6000 rpm, 6 min), przemyty kilkukrotnie zimnym, suchym acetonem oraz wysuszony *in vacuo* nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.

#### **5'-O-(Guanozyno)-P1-imidazolofosforan; sól sodowa; GMP-Im/Na<sup>+</sup>**

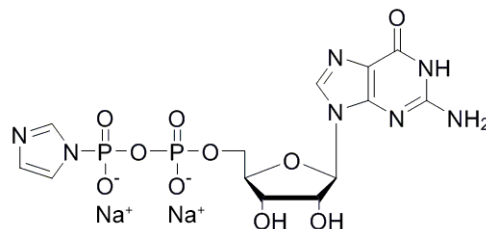
Wychodząc z GMP (sól TEA; 250 mg; 0,54 mmol) otrzymano 221 mg (sól sodowa; wydajność 95%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 8,0 min (Metoda analityczna I)



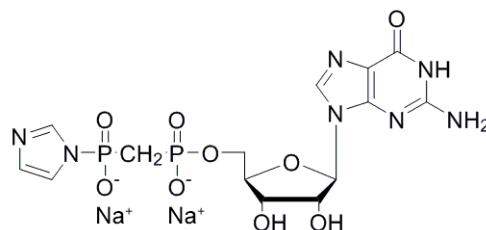
### 5'-O-(Guanozyno)-P2-imidazodifosforan; sól sodowa; GDP-Im/ Na<sup>+</sup>

Wychodząc z GDP (sól TEA; 300 mg; 0,467 mmol) otrzymano 250 mg (sól sodowa; wydajność 98%) białego ciała stałego.  
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 4,5 min (Metoda analityczna I)



### 5'-O-(Guanozyno)-(P2-imidazolo-P1,P2-metylenobisfosfonian); sól sodowa; GpCH<sub>2</sub>p-Im/Na<sup>+</sup>

Wychodząc z GpCH<sub>2</sub>p (sól TEA; 150 mg; 0,234 mmol) otrzymano 118 mg (sól sodowa; wydajność 95%) białego ciała stałego.  
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 4,5 min (Metoda analityczna I)



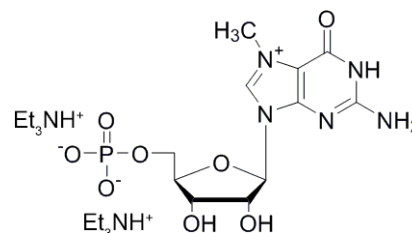
#### 3.1.5.3.2. Selektywna reakcja metylowania w pozycji N7

Grupa metylowa w pozycji N7 wprowadzona jest w reakcji nukleotydu guaninowego z jodkiem metylu, CH<sub>3</sub>I prowadzonej w DMSO. Odpowiedni nukleotyd rozpuszczano w suchym DMSO (stężenie nukleotydu ~0,1 M). Następnie dodawano, w zależności od substratu 8-16 equiv. CH<sub>3</sub>I. Roztwór mieszano dopóki pomiar na RP HPLC nie wykazał zaniku substratu. Reakcję zakończano poprzez dodanie ~10 objętości wody mQ a pH roztworu doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Faza wodną przemywano kilkakrotnie niewielką objętością eteru dietylowego. W razie potrzeby resztki jodu zredukowano za pomocą Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Z fazy wodnej usuwano resztki eteru na wyparce obrotowej a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex.

#### 3.1.5.3.3. Monofosforany nukleozydów:

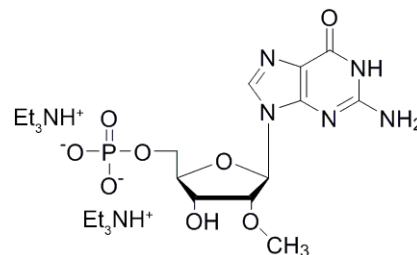
### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-monofosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GMP

GMP (sól TEA; 500 mg; 1,08 mmol; 1equiv.) rozpuszczono w 12,5 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,6 cm<sup>3</sup>, 9,3 mmol; 8,9 equiv.). Reakcję prowadzono przez 3 h i zakończono poprzez dodanie 150 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,7 M). Otrzymano 4950 OD<sub>260</sub> (sól TEA, wydajność 40%) białego ciała stałego.  
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 5,0 min (Metoda analityczna I)



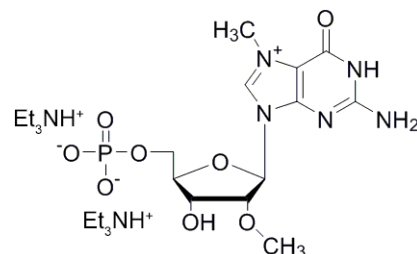
### 5'-O-(2'-O-Metyloguanozyno)-monofosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>2'-O</sup>GMP

2'-O-Metyloguanozynę (1 g; 3,4 mmol) zawieszono w 20 cm<sup>3</sup> bezwodnego trifosforanu metylu i schłodzono na łaźni lodowej do temperatury 0 °C. Do chłodnej zawiesiny dodano świeżo destylowanego POCl<sub>3</sub> (0,63 cm<sup>3</sup>; 6,8 mmol; 2 equiv.). Reakcję prowadzono przez 2 h i zakończono przez dodanie 200 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH roztworu doprowadzono do 7,0 za pomocą stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,7 M). Otrzymano 1,33 g (sól TEA; wydajność 74%) białego ciała stałego. RP HPLC: R<sub>T</sub> = 8,0 min (Metoda analityczna I)



### 5'-O-(7,2'-O-Dimetyloguanozyno)-monofosforan; sól trietyloamoniowa; m<sub>2</sub><sup>2',7'-O</sup>GMP

m<sup>2'-O</sup>GMP (sól TEA; 500 mg; 1,04 mmol) rozpuszczono w 12 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,6 cm<sup>3</sup>; 9,3 mmol; 9 equiv.). Reakcję prowadzono przez 3 h i zakończono poprzez dodanie 150 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,7 M). Otrzymano 8500 OD<sub>260</sub> (sól TEA, wydajność 70%) białego ciała stałego. RP HPLC: R<sub>T</sub> = 8,7 min (Metoda analityczna I)

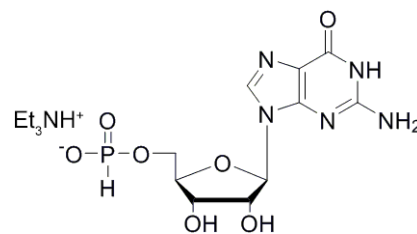


### 5'-O-(Guanozyno)-H-fosfonian; sól trietyloamoniowa; Gp<sub>H</sub>

2',3'-diizopropylidenoguanozynę (750 mg; 2,32 mmol; 1 equiv.) zawieszono w 11 cm<sup>3</sup> fosforanu trimetylu i ochłodzono do 0 °C na łaźni lodowej. Następnie dodano świeżo destylowany PCl<sub>3</sub> (0,22 cm<sup>3</sup>; 3,45 mmol; 1,5 eq.) a reakcję prowadzono przez 2 h. Zakończono ją przez dodanie 150 cm<sup>3</sup> wody i doprowadzenie pH roztworu do 1,5 za pomocą stałego NaHCO<sub>3</sub>. W celu usunięcia grupy izopropylidenuj roztwór ogrzewano go przez 2 h pod chłodzeniem zwrotną w temp 60 °C. Po zakończeniu ogrzewania pH roztworu doprowadzono do 7,0 za pomocą stałego NaHCO<sub>3</sub> a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej używając liniowego gradientu TEAB 0-0,8 M. Uzyskano 22450 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 80%) białego ciała stałego.

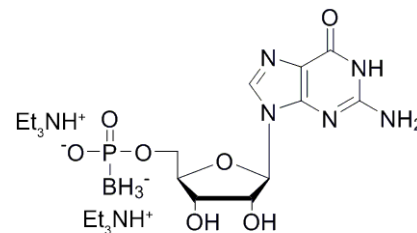
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 10,4 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 346,06; wyznaczona: 346,01



### 5'-O-(Guanozyno)-boranofosforan; sól trietyloamoniowa; Gp<sub>BH3</sub>

Reakcję prowadzono w atmosferze argonu. Do kolby stożkowej dodano 75 cm<sup>3</sup> bezwodnego acetonitrylu przez który przepuszczano argon. Po 20 min zawieszono H-fosfonian guanozyny (sól TEA; 330 mg; 0,77 mmol; 1 equiv.) a następnie po kolejnych 20 min dodano BSA (3,75 cm<sup>3</sup>; 17,4 mmol; 24 equiv.) i reakcję prowadzono aż do całkowitego rozpuszczenia osadu. Następnie dodano kompleks boran-dimetylosulfid w roztworze THF (0,75 cm<sup>3</sup>; 1,35 mmol; 1,75 equiv.) i reakcję pozostawiono na 30 min. Następnie rozpuszczalnik usunięto na wyparce a stałą pozostałość rozpuszczono w 60 cm<sup>3</sup> bezwodnego metanolu, gdzie dodano 0,15 cm<sup>3</sup> destylowanej TEA. Po 30 minutach rozpuszczalnik usunięto a produkt



rozpuszczono i odparowano 2-krotnie w 10 cm<sup>3</sup> metanolu a następnie takiej samej objętości wody mQ. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej używając liniowego gradientu TEAB 0-0,9 M. Uzyskano 223 mg (sól TEA, wydajność 72%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,5 min (Metoda analityczna I)

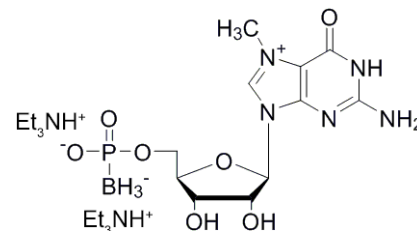
ESI-MS: obliczona: 360,09; wyznaczona: 360,20

### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-boranofosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub>

Gp<sub>BH3</sub> (sól TEA; 253 mg; 0,64 mmol; 1 equiv.) rozpuszczono w 12 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,4 cm<sup>3</sup>; 8,1 mmol; 12,7 equiv.). Reakcję prowadzono przez 3 h i zakończono poprzez dodanie 100 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,8 M). Otrzymano 170 mg OD<sub>260</sub> (sól TEA; 0,35 mmol; wydajność 70%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 8,7 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 374,10; wyznaczona: 374,10

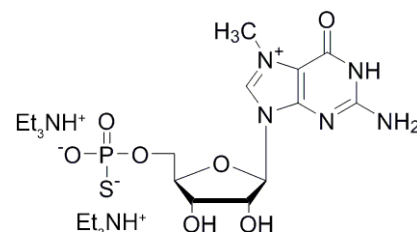


### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-tiofosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gp<sub>S</sub>

7-metyloguanozynę (830 mg, 2,79 mmol; 1 equiv.) zawieszono w 12 cm<sup>3</sup> bezwodnego fosforanu trimetylu i ochłodzono do temperatury 0 °C. Następnie dodano świeżo destylowany PSCl<sub>3</sub> (0,6 cm<sup>3</sup>; 5,9 mmol; 2,1 equiv.) i 2,6-lutydynę (0,67 cm<sup>3</sup>; 8,69 mmol; 3,15 equiv.). Roztwór mieszano dopóki pomiar na HPLC nie wykazał całkowitego zaniku substratu. Po 4,5 h do mieszaniny dodano roztwór BaCl<sub>2</sub> (10,5 g) rozpuszczonego w 105 cm<sup>3</sup> wody mQ a następnie pH zostało doprowadzone do 8,0 przy użyciu TEA. Do tak przygotowanego roztworu dodano 350 cm<sup>3</sup> etanolu (96%) a całość przeniesiono do 4 °C na 12 h. Powstały osad zwirowano (4 °C, 6000 rpm, 6 min) i przemyto 96% etanolem. Opłukany osad zawieszono w wodzie mQ i zwirowano (4 °C, 6000 rpm, 6 min), supernatant z nad osadu zebrano a samą procedurę powtórzono jeszcze dwukrotnie. Wszystkie zebrane frakcje połączono w jedną a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,6 M). Otrzymano 574 mg (sól TEA; 0,35 mmol; wydajność 42%) żółtawego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,5 min (Metoda analityczna I)

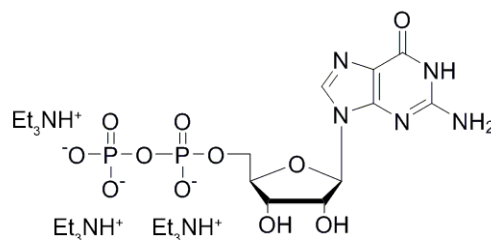
ESI-MS: obliczona: 392,04; wyznaczona: 394,30



### 3.1.5.3.4. Difosforany nukleozydów:

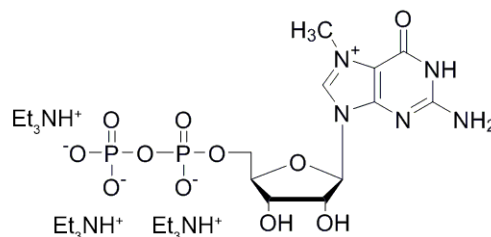
#### 5'-O-(Guanozyno)-difosforan; sól trietyloamoniowa; GDP

Ortofosforan (sól TEA; 440 mg; 2,30 mmol; 2 equiv.) oraz bezwodny  $ZnCl_2$  (750 mg; 5,75 mmol; 5 equiv.) zawieszono w 2  $cm^3$  bezwodnego DMF i mieszano dopóki reagenty nie uległy rozpuszczeniu. W innym naczyniu reakcyjnym GMP-Im (sól sodowa; 490 mg; 1,15 mmol; czystość 85%; 1 equiv.) oraz bezwodny  $ZnCl_2$  (750 mg; 5,58 mmol; 5 equiv.) zawieszono w 2  $cm^3$  bezwodnego DMF i mieszano dopóki reagenty nie uległy rozpuszczeniu. Następnie wymieszano obydwie roztwory i do powstałej mieszaniny dodano TEA (0,13  $cm^3$ ; 1,71 mmol; 1,5 equiv.). Reakcje prowadzono przez 20 h i zatrzymano poprzez dodanie EDTA (4,5 g; 12 mmol) rozpuszczonego w roztworze (1,97 g; 24 mmol)  $NaHCO_3$ . Produkt został oczyszczony za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,0 M). Otrzymano 7480  $OD_{260}$  (sól TEA; wydajność 65%) białego ciała stałego.  
RP HPLC:  $R_T = 3,5$  min (Metoda analityczna I)



#### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-difosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GDP

GDP (sól TEA; 395 mg; 0,62 mmol; 1 equiv.) rozpuszczono w 6  $cm^3$  bezwodnego DMSO, następnie dodano  $CH_3I$  (0,6  $cm^3$ ; 9,3 mmol; 15 equiv.). Reakcję prowadzono przez 2 godziny, zakończono poprzez dodanie 75  $cm^3$  wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego  $NaHCO_3$ . Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,9 M). Otrzymano 3890  $OD_{260}$  (sól TEA; wydajność 53%).  
RP HPLC:  $R_T = 5,0$  min (Metoda analityczna I)



#### Ogólna procedura syntezy 5'-O-imidodifosforanów nukleozydów:

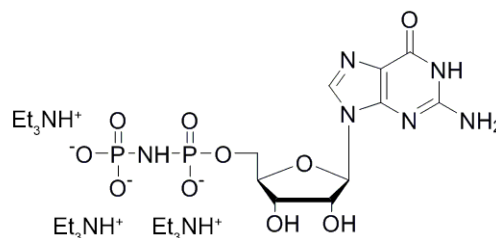
Suszony nad  $P_4O_{10}$  nukleozyd zawieszono w bezwodnym fosforanie trimetylu (aby uzyskać stężenie około 0,1 M) a całość schłodzono w łaźni lód/chlorek sodu do ok  $-8$  °C. Do chłodnej zawiesiny dodano roztwór  $Cl_3PNP(O)Cl_2$  (3 equiv.) a reakcję prowadzono w temperaturze  $-8$  °C dopóki pomiary na RP HPLC i MS nie wykazały zaniku substratu. Podwyższenie temperatury reakcji może prowadzić do powstania większej ilości produktów ubocznych. Reakcję zakończono przez dodanie 10 objętości wody mQ. Następnie pH doprowadzono do 7,0 za pomocą stałego  $NaHCO_3$  a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,0 M).

### 5'-O-(Guanozyno)-P1,P2 imidodifosforan; sól trietyloamoniowa; GpNHp

Guanozynę (500 mg; 1,776 mmol) zawieszono w 18,75 cm<sup>3</sup> bezwodnego fosforanu trimetylu. Do chłodnej zawiesiny dodano roztwór Cl<sub>3</sub>PNP(O)Cl<sub>2</sub> (1,75 cm<sup>3</sup>) a reakcję prowadzono przez 2 h, zakończono przez dodanie 200 cm<sup>3</sup> wody mQ i zobojętniono do pH 7,0. Następnie produkt przejściowy poddano hydrolizie przez pozostawienie na 1 h. Otrzymano 12265 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 58%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 3,0 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 425,00; wyznaczona 425,00

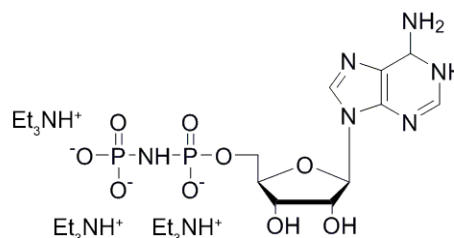


### 5'-O-(Adenozyno)-P1,P2-imidodifosforan; sól sodowa; sól trietyloamoniowa; ApNHp

Adenozynę (500 mg; 1,87 mmol) zawieszono w 20 cm<sup>3</sup> bezwodnego fosforanu trimetylu. Do chłodnej zawiesiny dodano roztwór Cl<sub>3</sub>PNP(O)Cl<sub>2</sub> (1,75 cm<sup>3</sup>) a reakcję prowadzono przez 1 h, zakończono przez dodanie 200 cm<sup>3</sup> wody MQ i zobojętniono. Produkt przejściowy poddano hydrolizie przez pozostawienie w roztworze na 1.5 h. Otrzymano 13000 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 44%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 3,5 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 441,00; wyznaczona 441,00

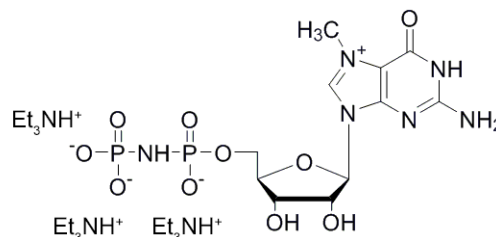


### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1,P2-imidodifosforan; sól sodowa; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GpNHp

GpNHp (sól TEA; 460 mg; 0,73 mmol; 1 equiv.) rozpuszczono w 9 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,36 cm<sup>3</sup>; 5,5 mmol; 8 equiv.). Reakcję prowadzono przez 3,5 h i zakończono poprzez dodanie 75 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,9 M). Otrzymano 3040 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 37%).

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 3,5 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 455,05; wyznaczona 425,00



### Ogólna procedura syntezy 5'-O-metylenobisfosfonianów nukleozydów

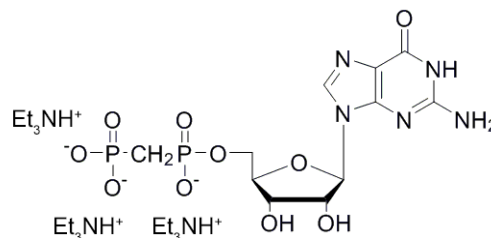
Suszony nukleozyd zawieszono w bezwodnym fosforanie trimetylu (aby uzyskać stężenie około 0,1 M) a całość schłodzono na łaźni lodowej do ok 0 °C. Do chłodnej zawiesiny dodano CH<sub>2</sub>(POCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (4 equiv.) a reakcję prowadzono w temperaturze 0 °C dopóki pomiary na RP HPLC i MS nie wykazały zaniku substratu. Podwyższenie temperatury reakcji może prowadzić do powstania większej ilości produktów ubocznych 2'-O i 3'-O fosfonylacji, natomiast zastosowanie niedomiaru metylenobis (dichlorku fosfoniowego) skutkuje powstawaniem symetrycznego adduktu NpCH<sub>2</sub>pN (gdzie N – użyty nukleozyd), który jest bardzo trudny do usunięcia na drodze chromatografii jonowymiennej. Reakcję zakończono przez dodanie 10 objętości wody mQ. Następnie pH zostało doprowadzone do 7,0 za pomocą stałego NaHCO<sub>3</sub> a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,0 M).

### 5'-O-(Guanozyno)-P1,P2 metyleno(bisfosfonian); sól trietyloamoniowa; GpCH<sub>2</sub>p

Guanozynę (250 mg; 0,88 mmol) zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> bezwodnego fosforanu trimetylu. Do chłodnej zawiesiny dodano CH<sub>2</sub>(POCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (883 mg; 3,52 mmol), reakcję prowadzono przez 1,5 h i zakończono przez dodanie 100 cm<sup>3</sup> wody mQ oraz zobojętniono do pH 7,0. Otrzymano 7115 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 67%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 4,0 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 440,0; wyznaczona 440,0

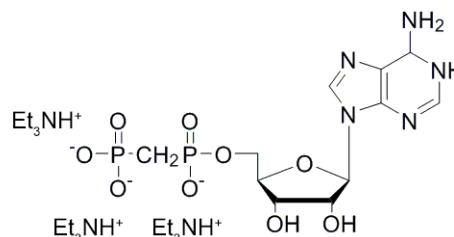


### 5'-O-(Adenozyno)-P1,P2-metyleno(bisfosfonian); sól trietyloamoniowa; ApCH<sub>2</sub>p

Adenozynę (300 mg; 1,12 mmol) zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> bezwodnego fosforanu trimetylu. Do chłodnej zawiesiny dodano CH<sub>2</sub>(POCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (1,12 g; 4,48 mmol), reakcję prowadzono przez 1,5 h a zakończono przez dodanie 100 cm<sup>3</sup> wody mQ i zobojętnienie do pH 7,0. Otrzymano 10260 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 61%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 4,5 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 424,0; wyznaczona 424,0



### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1,P2-metyleno(bisfosfonian); sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p

#### Metoda 1

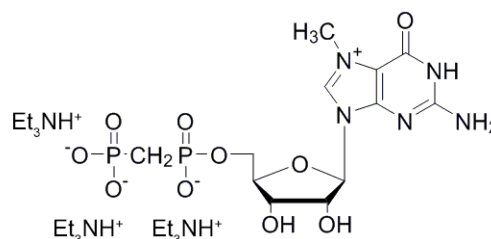
7-metyloguanozynę (300 mg; 0,742 mmol) zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> bezwodnego fosforanu trimetylu. Do ochłodzonej na łaźni lodowej zawiesiny dodano metylenobis (dichlorek fosfoniowy) (500 mg; 2,0 mmol; 3 equiv.) a reakcję prowadzono przez 3 h, zakończono przez dodanie 100 cm<sup>3</sup> wody mQ i zobojętniono. Otrzymano 4800 OD<sub>260</sub> (sól TEA, wydajność 57%) białego ciała stałego.

#### Metoda 2

GpCH<sub>2</sub>p (sól TEA; 250 mg; 0,39 mmol) rozpuszczono w 4,2 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,2 cm<sup>3</sup>; 3,11 mmol; 9 equiv.). Reakcja prowadzono przez 3 h i zakończono poprzez dodanie 50 cm<sup>3</sup> wody mQ, pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>, a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,0 M). Otrzymano 2260 OD<sub>260</sub> (sól TEA, wydajność 51%) białego ciała stałego.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 5,0 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 454,05; wyznaczona 454,05



### 3.1.5.3.5. Trifosforany nukleozydów:

#### Ogólna procedura wydłużania łańcucha fosforanowego o jedną jednostkę fosforanową

##### Sprzęganie

Odpowiedni nukleotyd (sól TEA; 1 equiv.) zawieszono w 3 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMF. Następnie do zawiesiny dodano (2-cyanoetylo)-imidazolofosforan (sól litowa; 3 equiv.) oraz bezwodny MgCl<sub>2</sub> (8 equiv.). Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej dopóki pomiary na RP HPLC i MS nie wykazały zaniku substratu. Następnie reakcje zatrzymywano poprzez dodanie 10-krotnej objętości wody mQ, a produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex.

##### Usuwanie grupy β-cyanoetylowej z terminalnego fosforanu

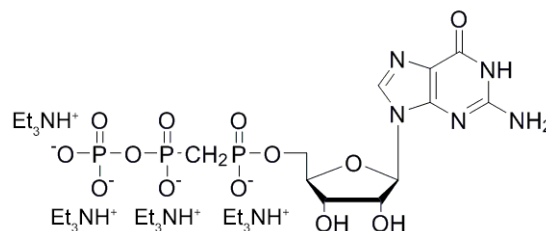
Odpowiedni nukleotyd (sól TEA) zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> 0,2 M roztworu KOH w wodzie mQ. Roztwór ogrzano do 50 °C; w czasie prowadzenia reakcji dodawano systematycznie niewielkie objętości roztworu KOH. Reakcja prowadzona była do czasu gdy pomiary na RP HPLC i MS nie wykazały całkowitego usunięcia grupy β-cyanoetylowej (zazwyczaj 5-6 h). Następnie pH doprowadzono do 7,0 za pomocą stałego NaHCO<sub>3</sub>, a produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex.

#### 5'-O-(Guanozyno)-P1,P2-metylenotrifosforan; sól trietyloamoniowa; GpCH<sub>2</sub>pp

Wychodząc z GpCH<sub>2</sub>p (sól TEA; 65 mg; 0,1 mmol) uzyskano 64 mg (sól TEA; 0,08 mmol, wydajność 78%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania 1,5 h, czas deprotekcji 5,0 h.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 2,6 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 520,0041; wyznaczona: 520,0024



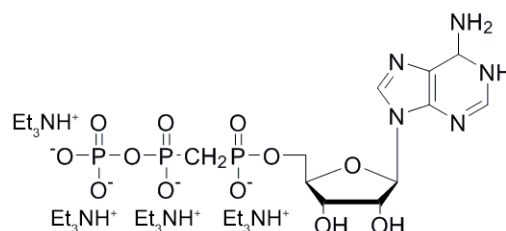
<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 8,15 (s; 1 H); 5,93 (d; J = 6,2 Hz; 1 H); 4,83 (dd; J = 6,2; 5,0 Hz; 1 H); 4,57 (dd; J = 5,0; 3,4 Hz; 1 H); 4,32–4,37 (m; 1 H); 4,16–4,21 (m; 2 H); 2,37 (t; J = 20,4 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 18,37 (td; J = 20,4; 8,5 Hz; 1 P); 7,53 (dtd; J = 24,7; 20,4; 20,4; 8,5 Hz; 1P); -9,90 (d; J = 24,9 Hz; 1 P)

#### 5'-O-(Adenosyl)-P1,P2-metylenotrifosforan; sól trietyloamoniowa; ApCH<sub>2</sub>pp

Wychodząc z ApCH<sub>2</sub>p (sól TEA; 68 mg; 0,11 mmol) uzyskano 64 mg (sól TEA; 0,08 mmol, wydajność 76%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania 1,5 h, czas deprotekcji 5,0 h.

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 4,0 min (Metoda analityczna I); ESI-MS: obliczona: 504,0092; wyznaczona: 504,0077



<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 8,56 (s; 1 H); 8,26 (s; 1H); 6,14 (d; J = 5,7 Hz; 1 H); 4,85 – 4,80 (m; 1 H); 4,58 (t; J = 4,7; 4,2 Hz; 1 H); 4,46–4,42 (m; 1 H); 4,40–4,36 (m; 1 H); 4,27 (dd; J = 4,0; 8,2 Hz; 1 H); 2,38 (t; J = 20,4 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 18,67 (td; J = 21,5; 9,3 Hz; 1 P); 7,29 (dtd; J = 24,9; 21,5; 21,5; 9,5 Hz; 1 P); -8,80 (d; J = 24,9 Hz; 1 P)

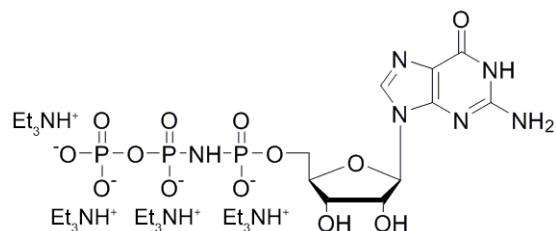


### 5'-O-(Guanozyno)-P1,P2-imidotrifosforan; sól trietyloamoniowa; GpNHpp

Wychodząc z GpNHp (sól TEA; 158 mg; 0,185 mmol) uzyskano 108 mg (sól TEA; 0,108 mmol; wydajność 72%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania 1,5 h, czas deprotekcji 5,0 h.

RP HPLC:  $R_T = 4,0$  min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 520,9994; wyznaczona: 520,9988



$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 8,29$  (s; 1 H); 5,95 (d;  $J = 6,0$  Hz; 1 H); 4,81 (dd;  $J = 5,0$ ; 6,0 Hz; 1 H); 4,57 (dd;  $J = 3,7$ ; 5,0 Hz; 1 H); 4,39–4,34 (m; 1 H); 4,21–4,14 (m; 2 H)

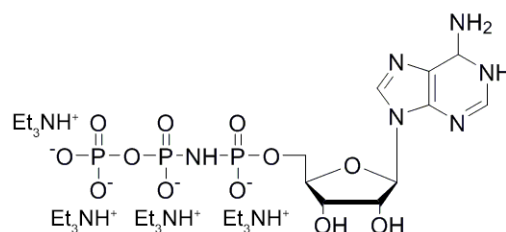
$^{31}\text{PNMR}$  (ppm)  $\delta = 0,62$  (dt;  $J = 6,0$ ; 5,9 Hz; 1 P); -9,74 (d;  $J = 20,5$  Hz; 1 P); -11,10 (dd;  $J = 20,5$ ; 6,1 Hz; 1 P)

### 5'-O-(Adenozyno)-P1,P2-imidotrifosforan; ApNHpp

Wychodząc z ApCH<sub>2</sub>p (sól TEA; 68 mg; 0,11 mmol) uzyskano 64 mg (sól TEA; 0,08 mmol; wydajność 77%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania 1,5 h, czas deprotekcji 5,0 h.

RP HPLC:  $R_T = 3,4$  min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 505,0092; wyznaczona: 505,0027



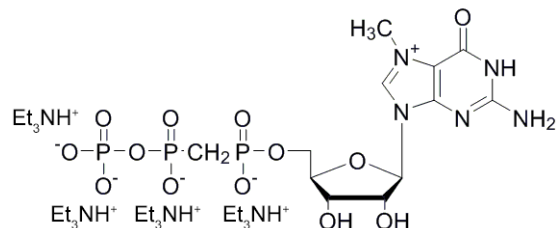
$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta$  8,57 (s; 1 H); 8,26 (s; 1 H); 6,15 (d;  $J = 5,7$  Hz; 1 H); 4,82 (dd;  $J = 5,7$ ; 5,0 Hz; 1 H); 4,61 (dd;  $J = 5,0$ ; 3,5 Hz; 1 H); 4,39–4,43 (m; 1 H); 4,18–4,25 (m; 1 H); 4,12–4,18 ppm (m; 1 H)  $^{31}\text{PNMR}$  (ppm)  $\delta = 0,68$  (dt;  $J = 6,3$ ; 5,7 Hz; 1 P); -9,51 (d;  $J = 21,0$  Hz; 1 P); -11,16 (dd;  $J = 21,0$ ; 6,3 Hz; 1 P)

### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1,P2-metylenotrifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>pp

Wychodząc z m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p (sól TEA, 162 mg; 0,109 mmol) uzyskano 55 mg (sól TEA; 0,084 mmol; wydajność 33%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania 2 h, czas deprotekcji 5 h.

RP HPLC:  $R_T = 3,8$  min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 505,0092 wyznaczona: 505,0027



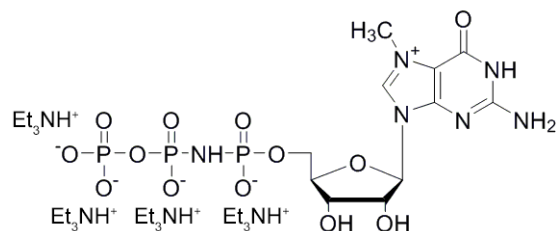
$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,39$  (s; 1 H); 6,07 (d;  $J = 5,7$  Hz; 1 H); 4,70 (dd;  $J = 5,7$ ; 5,0 Hz; 1 H); 4,57 (dd;  $J = 5,0$ ; 3,5 Hz; 1 H); 4,39 (m; 1 H); 4,34–4,17 (m; 2 H); 4,13 (s; 3 H); 2,41 (dt;  $J = 20,18$ ; 4,5 Hz; 2 H)

$^{31}\text{PNMR}$  (ppm)  $\delta = 18,6$  (bs; 1 P); 7,22 (m; 1 P); -11,16 (d;  $J = 20,18$  Hz; 1 P)

### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1,P2-imidotrifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GpNHpp

GpNHpp (sól TEA; 88 mg; 0,09 mmol, czystość 80%) rozpuszczono w 2 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,08 cm<sup>3</sup>; 0,12 mmol; 12 eq). Reakcję prowadzono przez 3 h, zakończono poprzez dodanie 20 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 475 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 49%) białego ciała stałego.

RP HPLC:  $R_T = 4,5$  min (Metoda analityczna I)



ESI-MS: obliczona: 505,0092; wyznaczona: 505,0027

$^1\text{H NMR}$  (ppm) =  $\delta$  9,35 (s; 1 H); 6,07 (d;  $J = 3,5$  Hz; 1 H); 4,69 (dd;  $J = 4,1; 3,5$  Hz; 1 H); 4,57 (dd;  $J = 5,1; 4,1$  Hz; 1 H); 4,41 (m; 1 H); 4,31–4,15 (m; 2 H); 4,13 (s; 3 H)

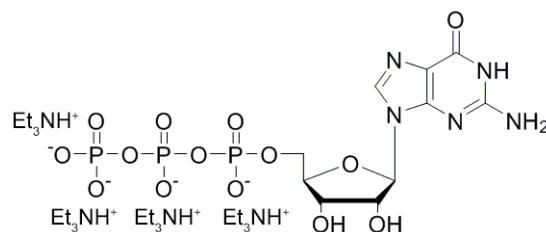
$^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 0,88$  (bs; 1 P); -9,51 (m; 1 P); -11,16 (bs; 1 P)

### Ogólna procedura wydłużania łańcucha fosforanowego o dwie jednostki fosforanowe:

Odpowiednią pochodną P1,P2-diimidazolową oraz odpowiedni chlorek metalu (8 lub 20 equiv.) dodano do bezwodnego DMF i mieszano intensywnie dopóki obydwie substraty uległy rozpuszczeniu. Następnie dodano odpowiedni monofosforan nukleozydu (1 equiv.; końcowe stężenie  $\sim 0,1$  M) a reakcję prowadzono aż pomiary na HPLC i MS nie wykazały zaniku substratu. Reakcję zakończono przez dodanie 10 objętości wody mQ lub roztworu EDTA i  $\text{NaHCO}_3$  w wodzie MQ. Produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient 0-1,2 M buforu TEAB), a następnie oczyszczono na RP HPLC.

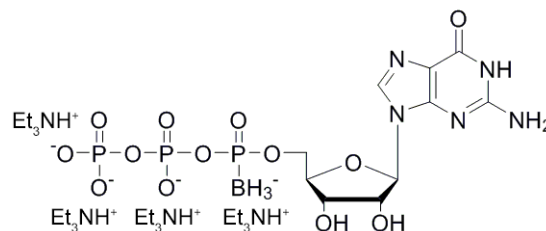
### 5'-O-(Guanozyno)-trifosforan; sól trietyloamoniowa; GTP

Wychodząc z GMP (sól TEA; 0,42 g; 0,9 mmol) i Im-pp-Im (sól sodowa; 1,18 g; 3,6 mmol) oraz bezwodnego  $\text{MgCl}_2$  (0,7 g; 7,2 mmol) uzyskano 7200  $\text{OD}_{260}$  (sól TEA; wydajność 65%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania 4 h. RP HPLC:  $R_T = 4,5$  min (Metoda analityczna I) ESI-MS: obliczona: 521,98; wyznaczona: 521,98



### 5'-O-(Guanozyno)-P1-boranotrifosforan; sól trietyloamoniowa; Gp<sub>BH3</sub>pp

Wychodząc z Gp<sub>BH3</sub> (sól TEA; 333 mg; 0,73 mmol) i Im-pp-Im (sól sodowa; 929 mg; 2,9 mmol) oraz bezwodnego  $\text{MgCl}_2$  (1,38 g; 14,5 mmol) uzyskano 257 mg (sól TEA; wydajność 44%) żółtawego ciała stałego. Czas sprzęgania: 48 h. Pobrano 125  $\text{OD}_{260}$  związku i po rozdzielu na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów D1: 2,5 mg; D2: 2,0 mg.



ESI-MS: obliczona: 520,0212; wyznaczona: 520,0223

#### izomer D1:

RP HPLC:  $R_T = 4,5$  min (Metoda 1)

$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 8,20$  (s; 1 H); 5,95 (d;  $J = 6,0$  Hz; 1 H); 4,81 (d;  $J = 6,0$  Hz; 1 H); 4,62 (d;  $J = 2,5$  Hz; 1 H); 4,37 (d;  $J = 2,5$  Hz; 1 H); 4,29 (m; 1 H); 4,16 (m; 1 H); 0,47 (m; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 83,93$  (d;  $J = 29,3$  Hz; 1 P); -10,34 (d;  $J = 16,5$  Hz; 1 P); -22,96 (dd;  $J = 29,3; 16,5$  Hz; 1 P)

#### izomer D2:

RP HPLC:  $R_T = 5,0$  min (Metoda 1)

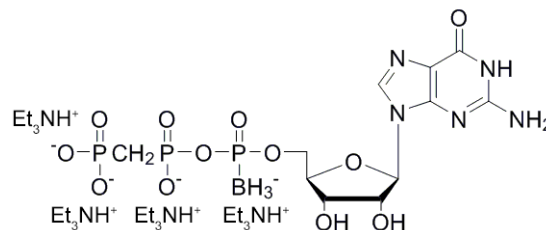
$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 8,18$  (s; 1 H); 5,94 (d;  $J = 5,1$  Hz; 1 H); 4,82 (dd;  $J = 5,1; 3,4$  Hz; 1 H); 4,54 (dd;  $J = 3,4; 2,5$  Hz; 1 H); 4,37 (d;  $J = 2,5$  Hz; 1 H); 4,24 (m; 2 H); 0,43 (m; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 83,40$  (d;  $J = 34,4$  Hz; 1 P); -10,50 (d;  $J = 22,4$  Hz; 1 P); -22,95 (dd;  $J = 34,4; 22,4$  Hz; 1 P)

### 5'-O-(Guanozyno)-P1-borano-P2,P3-metylenotrifosforan; sól trietyloamoniowa; Gp<sub>BH3</sub>pCH<sub>2</sub>p

Wychodząc z GP<sub>BH3</sub> (sól TEA; 207 mg; 0,45 mmol) i Im-pCH<sub>2</sub>p-Im (sól sodowa; 572 mg; 1,79 mmol) oraz bezwodnego MgCl<sub>2</sub> (850 mg; 8,95 mmol) uzyskano 145 mg (sól TEA; wydajność 39%) żółtawego ciała stałego. Czas sprzęgania: 6 h. Pobrano 5 mg związku i po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów D1: 1,2 mg; D2: 1,1 mg.

ESI-MS: obliczona: 518,04; wyznaczona: 518,04



#### izomer D1:

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 4,2 min (Metoda 1)

<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 8,19 (s; 1 H); 5,95 (d; J = 6,0 Hz; 1 H); 4,78 (nachodzi z sygnałem HDO; 1 H); 4,59 (dd; J = 4,8 Hz; J = 4,3 Hz; 1 H); 4,36 (m; 1 H); 4,30-4,14 (m; 2 H); 2,34 (t; J = 20,3 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 82,49 (bs; 1 P); 15,15 (dt; J = 19,8 Hz; J = 8,8 Hz; 1 P); 8,57 (ddt; J = 21,5; 19,8; 8,8 Hz; 1 P)

#### izomer D2:

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 4,6 min (Metoda 1)

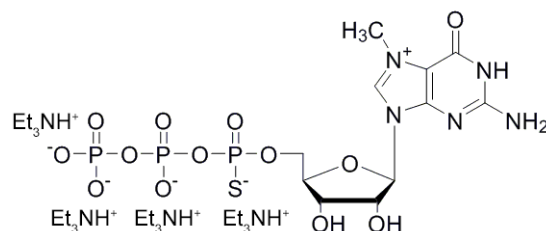
<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 8,17 (s; 1 H); 5,95 (d; J = 5,5 Hz; 1 H); 4,80 (nachodzi z sygnałem HDO; 1 H); 4,52 (bs; 1 H); 4,36 (m; 1 H); 4,31-4,13 (m; 2 H); 2,33 (t; J = 20,6 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR: (ppm) δ = δ 83,44 (bs; 1P); 14,72 (s; 1 P); 7,96 (s; 1 P)

### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1-tio trifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>pp

Wychodząc z m<sup>7</sup>GP<sub>s</sub> (sól TEA; 90 mg; 0,188 mmol) i Im-pp-Im (sól sodowa; 300 mg; 0,94 mmol) oraz bezwodnego ZnCl<sub>2</sub> (500 mg; 3,67 mmol) uzyskano 51,2 mg (sól TEA; wydajność 32%) żółtawego ciała stałego. Czas sprzęgania: 24 h.

ESI-MS: obliczona: 551,98; wyznaczona: 552,01



#### izomer D1:

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,4 min (Metoda 1)

<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 9,36 (s; 1 H); 6,08 (d; J = 6,0 Hz; 1 H); 4,74 (m; 1 H); 4,63 (dd; J = 4,8 Hz; J = 4,3 Hz; 1 H); 4,43 (m; 1 H); 4,36 (m; 2 H); 4,1 (s; 3 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 44,97 (bs; 1 P); -8,46 (dt; J = 19,8; 8,8 Hz; 1 P); 22,92 (ddt; J = 21,5; 19,8; 8,8 Hz; 1 P)

#### izomer D2:

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,5 min (Metoda 1)

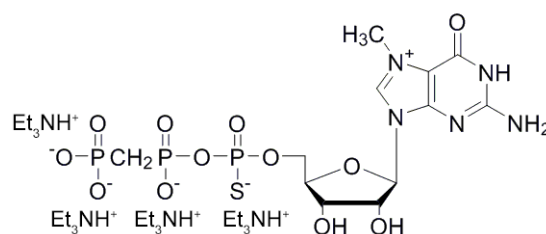
<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 9,31 (s; 1 H); 6,09 (d; J = 5,5 Hz; 1 H); 4,74 (m; 1 H); 4,57 (bs; 1 H); 4,45 (m; 1 H); 4,33 (m; 1 H); 4,13 (m; 1H); 4,12 (t; J = 20,6 Hz; 2 H); 4,1 (s; 3 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 44,05 (bs; 1 P); -10,11 (s; 1 P); -23,21 (s; 1 P)

### 5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1-tio-P2,P3-metylenotrifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gp<sub>s</sub>pCH<sub>2</sub>p

Wychodząc z m<sup>7</sup>GP<sub>s</sub> (sól TEA; 50 mg; 0,11 mmol) i Im-pCH<sub>2</sub>p-Im (sól sodowa; 208 mg; 0,65 mmol) oraz bezwodnego ZnCl<sub>2</sub> (360 mg; 2,64 mmol) uzyskano 51,2 mg (sól TEA; wydajność 32%) żółtawego ciała stałego. Czas sprzęgania 24 h. Po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów D1: 8,5 mg; D2: 6,5 mg.

ESI-MS: obliczona: 549,99692; wyznaczona: 549,99563

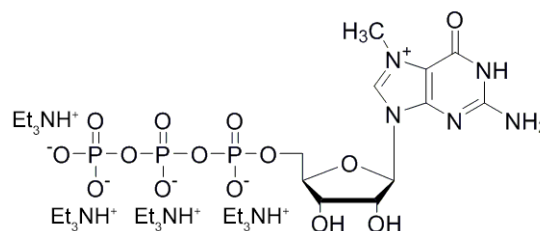


**izomer D1:**RP HPLC:  $R_T = 5,8$  min (Metoda 1) $^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 9,30$  (s; 1 H); 6,04 (d;  $J = 3,2$  Hz; 1 H); 4,68 (dd;  $J = 4,7; 3,2$  Hz; 1 H); 4,58 (dd;  $J = 5,3; 4,7$  Hz; 1 H); 4,40 (m; 1 H); 4,37-4,24 (m; 2 H); 4,13 (s; 3 H); 2,39 (t;  $J = 20,4$  Hz; 2 H) $^{31}\text{P}$  NMR (ppm)  $\delta = 43,63$  (d;  $J = 32,3$  Hz; 1 P); 15,93 (bs; 1 P); 9,17 (bs; 1 P)**izomer D2:**RP HPLC:  $R_T = 6,0$  min (Metoda 1) $^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 9,28$  (s; 1H); 6,08 (d;  $J = 3,2$  Hz; 1H); 4,67 (dd;  $J = 4,6; 3,3$  Hz; 1H); 4,50 (dd;  $J = 4,6; 5,5$  Hz; 1 H); 4,40 (m; 1 H); 4,36 (m; 1 H); 4,29-4,27 (m; 1 H); 4,16 (s; 3 H); 2,38 (t;  $J = 20,2$  Hz; 2 H) $^{31}\text{P}$  NMR (ppm)  $\delta = 43,23$  (d;  $J = 32,2$  Hz; 1 P); 15,43 (dt;  $J = 19,5; 8,3$  Hz; 1 P); 9,48 (ddt;  $J = 32,2; 9,5; 8,8$  Hz; 1 P)**5'-O-(7-Metyloguanozyno)-trifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GTP**

GTP (sól TEA; 7000 OD<sub>260</sub>) rozpuszczono w 8 cm<sup>3</sup> wody MQ. W ciągu 1 h dodawano 0,1 cm<sup>3</sup> (CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> w odstępach 10 min a pH mieszaniny reakcyjnej było utrzymywane przy wartości 4,0 za pomocą 0,3 M wodnego roztworu NaOH. Reakcję prowadzono aż do całkowitego zaniku substratu. Po 3 h dodano 100 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0. Produkt został oczyszczony przy pomocy chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 4680 OD<sub>260</sub> (sól TEA salt; wydajność 63%) białego ciała stałego.

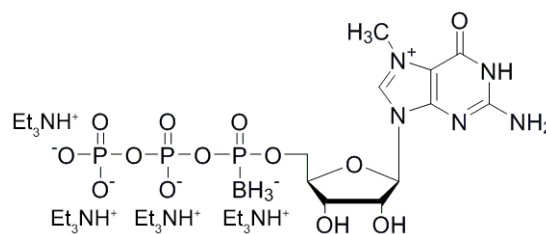
RP HPLC:  $R_T = 5,0$  min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 534,00; wyznaczona: 534,00

**5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1-boranotrifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub>pp**

Gp<sub>BH3</sub>pp (sól TEA; 104 mg; 0,127 mmol) rozpuszczono w 1,5 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,075 cm<sup>3</sup>; 0,11 mmol; 13 equiv.). Reakcję prowadzono przez 2 h, zakończono poprzez dodanie 25 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 42,6 mg (sól TEA, wydajność 40%) białego ciała stałego. Po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów D1: 7,5 mg; D2: 6,6 mg.

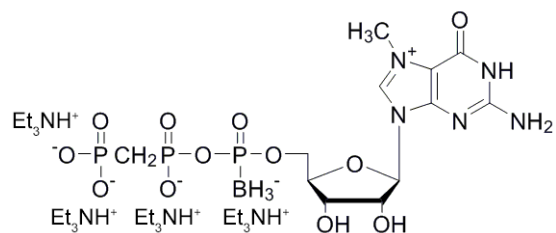
ESI-MS: wyznaczona: 534,03556; obliczona: 534,03690

**izomer D1:**RP HPLC:  $R_T = 6,0$  min (Metoda 1) $^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 9,22$  (s; 1 H); 6,08 (d;  $J = 3,6$  Hz; 1 H); 4,70 (dd;  $J = 4,3; 3,6$  Hz; 1H); 4,49 (m; 1 H); 4,45 (bs; 1H); 4,35-4,25 (m; 2 H); 4,16 (s; 3 H) $^{31}\text{P}$  NMR (ppm)  $\delta = 83,65$  (bs; 1 P); -10,55 (d;  $J = 19,8$  Hz; 1 P); -22,65 (dd;  $J = 30,5; 20,4$  Hz; 1 P)**izomer D2:**RP HPLC:  $R_T = 6,6$  min (Metoda 1) $^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 9,13$  (s; 1 H); 6,08 (d;  $J = 3,2$  Hz; 1 H); 4,70 (dd;  $J = 4,7; 3,6$  Hz; 1 H); 4,61 (dd;  $J = 5,3; 4,7$  Hz; 1 H); 4,42 (bs; 1 H); 4,37-4,22 (m; 2 H); 4,16 (s; 3H) $^{31}\text{P}$  NMR (ppm)  $\delta = 83,90$  (bs; 1 P); -10,38 (d;  $J = 19,0$  Hz; 1 P); -22,64 (dd;  $J = 28; 19,0$  Hz; 1 P)

**5'-O-(7-Metyloguanozyno)-P1-borano-P2,P3-metylenotrifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gp<sub>BH3</sub>pCH<sub>2</sub>p**

**Metoda 1**

Wychodząc z m<sup>7</sup>GP<sub>BH3</sub> (sól TEA; 900 OD<sub>260</sub>; 0,08 mmol) i Im-pCH<sub>2</sub>p-Im (sól sodowa; 90 mg; 0,28 mmol) oraz bezwodnego MgCl<sub>2</sub> (140 mg; 1,48 mmol) uzyskano 328 OD<sub>260</sub> mg (sól TEA; wydajność 36%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania: 6 h. Po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów D1: 2,2 mg; D2: 2,5 mg.



**Metoda 2**

Gp<sub>BH3</sub>pp (sól TEA; 140 mg; 0,171 mmol) rozpuszczono w 2,5 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,115 cm<sup>3</sup>; 0,16 mmol; 9 equiv.). Reakcję prowadzono przez 2 h, zakończono poprzez dodanie 33 cm<sup>3</sup> wody mQ a pH doprowadzono do 7,0 używając stałego NaHCO<sub>3</sub>. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 44,2 mg (sól TEA, wydajność 31%) białego ciała stałego. Po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów D1: 4,0 mg; D2: 3,0 mg.

ESI MS: wyznaczona: 532,05751; obliczona: 532,05763

**izomer D1:**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 5,7 min (Metoda 1)

<sup>1</sup>H NMR(ppm) δ = 9,12 (s; 1 H); 6,08 (d; J = 3,0 Hz; 1 H); 4,69 (dd; J = 4,4; 3,0 Hz; 1H); 4,58 (m; 1H); 4,42 (m; 1 H); 4,35-4,25 (m; 2H); 4,16 (s; 3 H); 2,32 (t; J = 20,3 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 82,49 (bs; 1 P); 15,15 (dt; J = 20,3; 8,8 Hz; 1 P); 8,57 (ddt; J = 30,0; 20,3; 8,8 Hz; 1 P)

**izomer D2:**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,3 min (Metoda 1)

<sup>1</sup>H NMR(ppm) δ = 9,21 (s; 1 H); 6,08 (d; J = 3,3 Hz; 1 H); 4,68 (dd; J = 4,5; 3,3 Hz; 1 H); 4,49 (m; 1H); 4,44 (m; 1 H); 4,37-4,22 (m; 2 H); 4,16 (s; 3 H); 2,34 (t; J = 20,3 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 82,51 (bs; 1 P); 15,17 (dt; J = 19,8; 8,6 Hz; 1 P); 8,63 (ddt; J = 30,1; 20,3 Hz; 8,8 Hz; 1 P)

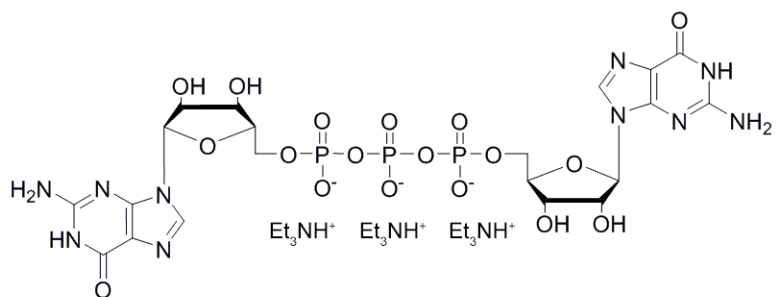
**3.1.5.3.6. Dinukleotydowe analogi kapu**

**Ogólna procedura sprzęgania pochodnych imidazolowych nukleotydów z nukleotydami**

W każdym przypadku sprzęganie prowadziło do wydłużenia łańcucha polifosforanowego o jedną grupę fosforanową. Osiągnięto to poprzez rozpuszczenie odpowiedniego imidazolidu (~1,25 equiv.) z odpowiednim nukleotydem (sól TEA; 1 equiv.) i bezwodnym ZnCl<sub>2</sub> (8 equiv.) w bezwodnym DMF. Gdy pomiary na RP HPLC i MS wykazały zanik substratu reakcje zatrzymywano poprzez dodanie roztworu EDTA (1,25 mol na 1 mol ZnCl<sub>2</sub>) w wodnym roztworze (2,5 mol na 1 mol ZnCl<sub>2</sub>) NaHCO<sub>3</sub>. W kolejnym etapie pH doprowadzono do 7,0 a produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex.

**5'-O-(P1-guanozyno-5'-O-P3-guanozyno)-trifosforan; sól trietyloamoniowa; GpppG**

Sól TEA ortofosforanu (0,6 g; 3,00 mmol; 1,5 equiv.) oraz bezwodny ZnCl<sub>2</sub> (1,1 g; 8 mmol; 4 equiv.) zawieszono w 3 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMF i mieszano dopóki reagenty nie uległy rozpuszczeniu. W innym naczyniu reakcyjnym GMP-Im (sól sodowa; 0,87 g; 2 mmol; 1 equiv.) oraz bezwodny ZnCl<sub>2</sub> (1,1 g; 8 mmol; 4 equiv.) zawieszono w

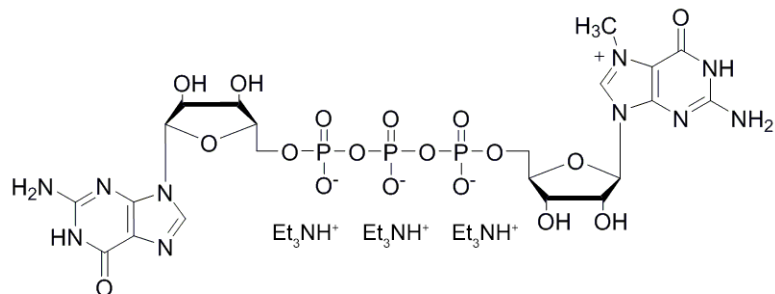


2 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMF i mieszano dopóki reagenty nie uległy rozpuszczeniu. Następnie wymieszano obydwa roztwory i do powstałej mieszaniny dodano TEA (0,4 cm<sup>3</sup>; 3 mmol; 1,5 equiv.). Reakcje prowadzono przez 8 godzin, w tym czasie dodawano systematycznie GMP-Im (sumarycznie 1,0 g; 2,3 mmol; 1,15 equiv.) oraz ZnCl<sub>2</sub>. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie EDTA (8,25 g; 22,25 mmol) rozpuszczonego w roztworze NaHCO<sub>3</sub> (3,78 g; 45,0 mmol). Produkt został oczyszczony za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,0 M). Otrzymano 18800 OD<sub>260</sub> (GpppG; sól TEA; wydajność 36%) białego ciała stałego. Z innych frakcji chromatograficznych uzyskano 24000 OD<sub>260</sub> (GDP; sól TEA; wydajność 47%) białego ciała stałego.

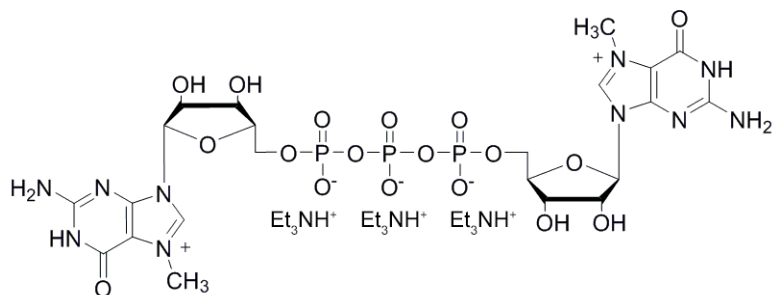
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 5,5 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 787,07; wyznaczona: 787,00

**5'-O-(P1-7-metyloguanozyno-5'-O-P3-guanozyno)-trifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>GpppG**



**5'-O-(P1-7-metyloguanozyno-5'-O-P3-7-metyloguanozyno)-trifosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gpppm<sup>7</sup>G**



Obydwa związki zostały uzyskane w jednej reakcji metylowania. GpppG (18800 OD<sub>260</sub>, 0,78 mmol) zawieszono w 9 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO. W celu poprawienia rozpuszczalności naczynie ogrzano za pomocą suszarki. Następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,6 cm<sup>3</sup>; 11 equiv.) Pomiary na HPLC wykazały dominowały oczekiwane produkty metylacji. Reakcja została zakończona po 75 minutach, gdy pomiary na HPLC wykazały obecność obydwu produktów metylacji w podobnym stosunku molowym. Z powodu znikomej ilości wydzielonego jodu nie była konieczna ekstrakcja. Produkty zostały oczyszczone za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,0 M). Otrzymano 7300 OD<sub>260</sub> m<sup>7</sup>GpppG (sól TEA, wydajność 42%) oraz 6900 OD<sub>260</sub> m<sup>7</sup>Gpppm<sup>7</sup>G (sól TEA, wydajność 42%).

**m<sup>7</sup>GpppG:**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,3 min (Metoda analityczna I)

ESI-MS: obliczona: 802,02; wyznaczona: 802,00

**m<sup>7</sup>Gpppm<sup>7</sup>G:**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 7,0 min (Metoda analityczna I)

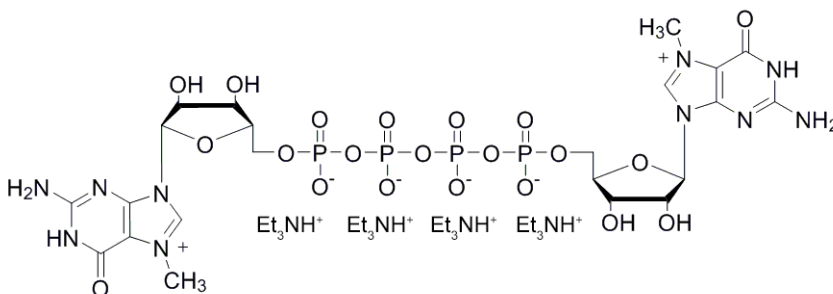
ESI-MS: obliczona: 815,10; wyznaczona: 815,10

## Ogólna procedura syntezy pochodnych m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G

Odpowiedni P1,P2-diimidazolofosforan (0,5-0,9 equiv.) oraz odpowiedni chlorek metalu (MgCl<sub>2</sub> dla boranofosforanów i ZnCl<sub>2</sub> dla niemodyfikowanych fosforanów lub tiofosforanów; 8 equiv.) dodano do bezwodnego DMF i mieszano intensywnie dotąd aż obydwa substraty uległy rozpuszczeniu. Następnie dodano odpowiedni monofosforan nukleozydu (1 equiv., końcowe stężenie ~0,2 M) a reakcję prowadzono dopóki pomiary na HPLC i MS nie wykazały zaniku substratu. Reakcję zakończono przez dodanie 10 objętości wody mQ lub roztworu EDTA i NaHCO<sub>3</sub> w wodzie mQ. Produkt uzyskano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient 0-1,2 M buforu TEAB), a następnie oczyszczono na RP HPLC.

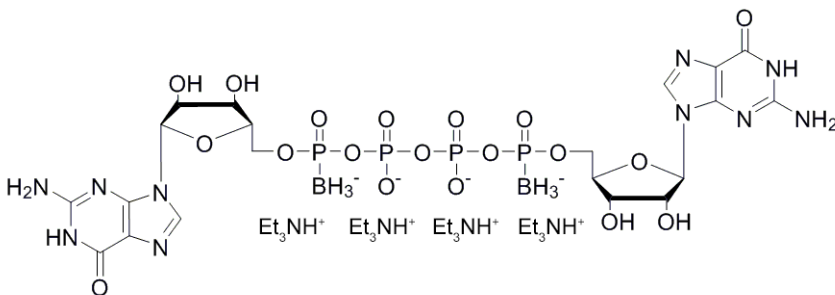
### 5'-O-(P1-7-metyloguanozyno-5'-O-P4-7-metyloguanozyno)-tetrafosforan; sól trietyloamoniowa m<sup>7</sup>Gppppm<sup>7</sup>G

Wychodząc z m<sup>7</sup>GMP (sól TEA; 90 mg; 0,2 mmol) i Im-pp-Im (sól sodowa; 48 mg; 0,15 mmol; 0,75 equiv.) uzyskano 660 OD<sub>260</sub> (sól TEA, wydajność 37%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania: 48 h. Po oczyszczeniu na RP-HPLC uzyskano 16,4 mg czystego związku pod postacią soli amoniowej.  
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,5 min (Metoda analityczna I)



### 5'-O-(P1-Guanozyno-5'-O-P4-guanozyno)-P1,P4-diboranotetrafosforan; sól trietyloamoniowa; Gp<sub>BH3</sub>ppp<sub>BH3</sub>G

Wychodząc z Gp<sub>BH3</sub> (sól TEA; 103 mg; 0,22 mmol) i Im-pp-Im (sól sodowa, 60 mg; 0,19 mmol; 0,87 equiv.) uzyskano 192 mg (sól TEA, wydajność 69%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania: 150 h. Pobrano 10 mg związku i po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów D1: 1,3 mg; D2: 2,6 mg; D3: 1,4 mg.  
ESI-MS: obliczona: 861,05; wyznaczona: 861,09



#### izomer D1:

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 5,9 min (Metoda analityczna I)

<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = 8,13 (s; 2H); 5,90 (d; J = 6,0 Hz; 2 H); 4,80 (częściowe nakładanie się z sygnałem HDO; m; 2 H); 4,61 (dd; J = 4,8; 3,4 Hz; 2H); 4,33 (dd; J = 6,4; 3,4 Hz; 2 H); 4,30-4,15 (m; 4 H); 0,48 (m; 6 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 80,67 (m; 2 P); -26,04 (d; J = 17,6 Hz; 2 P)

#### izomer D2:

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 6,6 min (Metoda analityczna I)

<sup>1</sup>H NMR (ppm) δ = (8,15 (s; 1 H); 8,10 (s; 1 H); 5,88 (d; J = 6,0 Hz; 1 H); 5,86 (d; J = 5,5 Hz; 1 H); 4,78 (częściowe nakładanie się z sygnałem HDO; m; 2 H); 4,61 (dd; J = 4; 3,2 Hz; 1 H); 4,52 (dd; J = 4,7; 3,2 Hz; 1 H); 4,33 (bd; J = 3,0 Hz; 2 H); 4,30-4,15 (m; 4 H); 0,48 (m; 6 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm) δ = 80,91 (m; 2 P); -26,13 (d; J = 26,4 Hz; 2 P)

**Izomer D3:**

RP HPLC:  $R_T = 7,9$  min (Metoda analityczna I)

$^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 8,17$  (s; 2 H); 5,85 (s; 2 H); 4,80 (częściowe nakładanie się z sygnałem HDO; m; 2 H); 4,48 (m; 2 H); 4,30-4,05 (m; 6 H); 0,48 (m; 6 H)

$^{31}\text{P}$  NMR (ppm):  $\delta$  80,88 (m; 2 P); -25,99 (m; 2 P)

**5'-O-(P1-Guanozyno-5'-O-P4-guanozyno)-P1,P4-diborano-P2,P3-metylenotetrafosforan;**  
**trietyloamoniowa;  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{pCH}_2\text{pp}_{\text{BH}_3}\text{G}$**

sól

Wychodząc z  $\text{Gp}_{\text{BH}_3}$  (sól TEA; 110 mg; 0,23 mmol) i  $\text{Im-pCH}_2\text{p-Im}$  (sól sodowa; 60 mg; 0,19 mmol; 0,84 equiv.) uzyskano 229 mg (sól TEA; wydajność 79%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania: 25 h  
 Pobrano 10 mg związku i po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów:

D1: 1,3 mg; D2: 2,7 mg; D3: 1,3 mg.

ESI-MS: obliczona: 859,11; wyznaczona: 859,09

**izomer D1:**

RP HPLC:  $R_T = 6,0$  min (Metoda analityczna I)

$^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 8,13$  (s; 2 H); 5,93 (d;  $J = 5,0$  Hz; 2 H); 4,75 (częściowe nakładanie się z sygnałem HDO; m; 2 H); 4,63 (dd;  $J = 4,7$  Hz;  $J = 4,2$  Hz; 2 H); 4,33 (bs; 2 H); 4,27-4,13 (m; 4 H); 2,67 (t;  $J = 21,4$  Hz; 2 H); 0,45 (m; 6 H)

$^{31}\text{P}$  (ppm)  $\delta = 78,69$  (m; 2P); 3,68 (dd;  $J = 48,3$ ; 21,4 Hz; 2 P)

**izomer D2:**

RP HPLC:  $R_T = 6,3$  min (Metoda analityczna I)

$^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 8,24$  (s; 1 H) 8,13 (s; 1 H); 5,91 (d;  $J = 5,5$  Hz; 1 H); 5,89 (d;  $J = 6,0$  Hz; 1 H) 4,73 m; 2 H); 4,58 (dd;  $J = 4,7$ ; 4,2 Hz; 1 H); 4,51 (dd;  $J = 4,7$ ; 4,0 Hz; 1 H); 4,33 (bs; 1 H); 4,28-4,15 (m; 4 H); 2,67 (t;  $J = 21,0$  Hz; 2 H); 0,43 (m; 6 H)

$^{31}\text{P}$  NMR (ppm)  $\delta = 79,74$  (m; 2 P); 3,89 (m; 2 P)

**izomer D3:**

RP HPLC:  $R_T = 7,5$  min (Metoda analityczna I)

$^1\text{H}$  NMR (ppm)  $\delta = 8,12$  (s; 2 H); 5,86 (d;  $J = 6,0$  Hz; 2 H); 4,74 (m; 2 H); 4,50 (dd;  $J = 5,0$ ; 3,7 Hz; 2H); 4,32 (dd;  $J = 6,6$ ; 4,0 Hz; 2 H); 4,28-4,15 (m; 4 H); 2,67 (t;  $J = 20,9$  Hz; 2 H); 0,43 (m; 6 H)

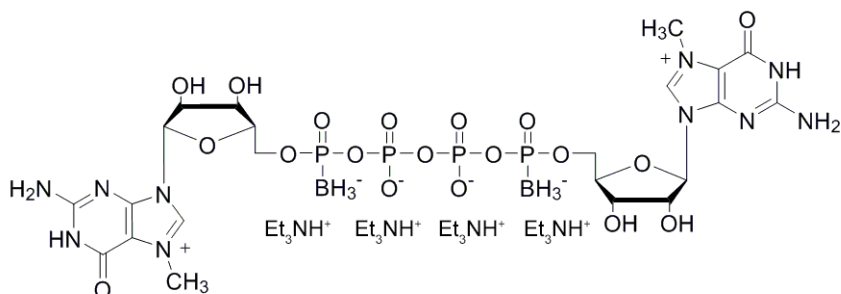
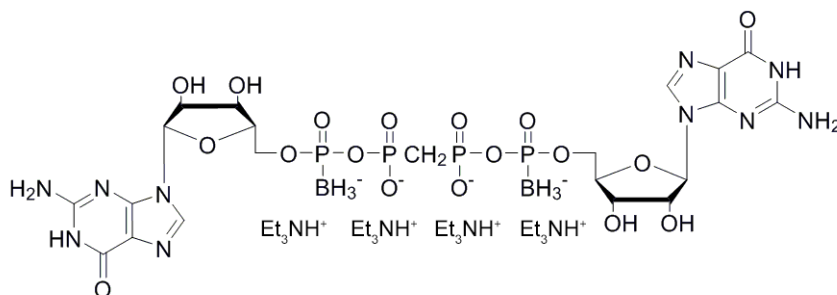
$^{31}\text{P}$  NMR (ppm)  $\delta = 79,83$  (m; 2 P); 4,15 (bs; 2 P)

**5'-O-(P1-7-Metyloguanozyno-5'-O-P4-7-metyloguanozyno)-P1,P4-diboranotetrafosforan;**  
**trietyloamoniowa;  $\text{m}^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}\text{ppp}_{\text{BH}_3}\text{m}^7\text{G}$**

sól

**Metoda 1**

Wychodząc z  $\text{m}^7\text{Gp}_{\text{BH}_3}$  (sól TEA; 75 mg; 0,16 mmol) i  $\text{Im-pp-Im}$  (sól sodowa; 48 mg; 0,15 mmol; 0,95 equiv.) uzyskano 90 mg (sól TEA, wydajność 48%) białego ciała stałego. Czas sprzęgania: 70 h.





## Metoda 2

$Gp_{BH_3}ppp_{BH_3}G$  (sól TEA; 105 mg; 0,83 mmol) rozpuszczono w 1,0 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,19 cm<sup>3</sup>; 0,17 mmol; 20 equiv.). Reakcja prowadzona przez 2 h i zakończono poprzez dodanie 15 cm<sup>3</sup> wody mQ. pH doprowadzono do 7,0 używając 1 M wodnego roztworu KOH a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 760 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 31%; czystość 63%) białego ciała stałego. Po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów: D1: 4,6 mg; D2: 1,6 mg; D3: 4,2 mg.

ESI-MS: obliczona: 891,13785; wyznaczona: 891,13635

### izomer D1:

RP HPLC:  $R_T = 9,6$  min (Metoda analityczna I)

<sup>1</sup>H NMR (ppm)  $\delta = 9,15$  (s; 1 H); 9,10 (s; 1 H); 6,04 (d;  $J = 3,0$  Hz; 1 H); 6,00 (d;  $J = 3,5$  Hz; 1 H); 4,66 (m; 1 H); 4,63 (m; 1 H); 4,59 (m; 1 H); 4,46 (m; 1 H); 4,41 (bs; 2 H); 4,37-4,25 (m; 4 H); 4,14 (s; 6 H); 0,37 (m; 6 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm)  $\delta = 80,64$  (m; 2 P); -26,04 (d;  $J = 28,8$  Hz; 2 P)

### izomer D2:

RP HPLC:  $R_T = 9,8$  min (Metoda analityczna I)

<sup>1</sup>H NMR (ppm)  $\delta = 9,08$  (s; 2 H); 6,04 (d;  $J = 3,2$  Hz; 2 H); 4,68 (dd;  $J = 4,8; 3,2$  Hz; 2 H); 4,61 (m; 2 H); 4,40 (m; 2 H); 4,36-4,23 (m; 4 H); 4,13 (s; 6 H); 0,28 (m; 6 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm)  $\delta = 80,64$  (m; 2 P); -26,04 (d;  $J = 28,8$  Hz; 2 P)

### izomer D3:

RP HPLC:  $R_T = 10,2$  min (Metoda analityczna I)

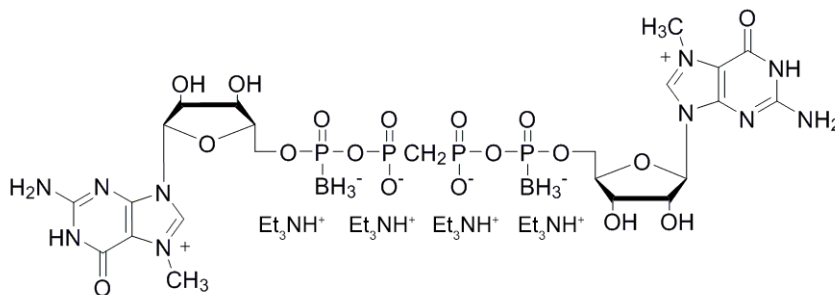
<sup>1</sup>H NMR (ppm)  $\delta = 9,19$  (s; 1 H); 5,99 (d;  $J = 3,2$  Hz; 1 H); 4,68 (dd;  $J = 4,8; 3,2$  Hz; 2 H); 4,63 (bs; 2 H); 4,51-4,25 (m; 8 H); 4,13 (s; 6 H); 0,28 (m; 6 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm)  $\delta = 80,69$  (m; 2 P); -26,20 (d;  $J = 25,9$  Hz; 2 P)

## 5'-O-(P1-7-Metyloguanozyno-5'-O-P4-7-metyloguanozyno)-P1,P4-diborano-P2,P3-dimetylonotetrafosforan; sól trietyloamoniowa; m<sup>7</sup>Gp<sub>BH<sub>3</sub></sub>pCH<sub>2</sub>pp<sub>BH<sub>3</sub></sub>m<sup>7</sup>G

## Metoda 1

Wychodząc z m<sup>7</sup>Gp<sub>BH<sub>3</sub></sub> (sól TEA; 75 mg; 0,16 mmol) i Im-pCH<sub>2</sub>p-Im (sól sodowa, 48 mg; 0,15 mmol; 0,95 equiv.) uzyskano 57 mg (sól TEA, wydajność 26%) białego ciała stałego. Czas sprężania: 70 h.



## Metoda 2

$Gp_{BH_3}pCH_2pp_{BH_3}G$  (sól TEA; 100 mg; 0,08 mmol) rozpuszczono w 1.0 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMSO, następnie dodano CH<sub>3</sub>I (0,18 cm<sup>3</sup>; 0,16 mmol; 20 eq). Reakcja prowadzona przez 2 h i zakończono poprzez dodanie 15 cm<sup>3</sup> wody mQ. Następnie pH doprowadzono do 7,0 używając 1 M wodnego roztworu KOH a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 590 OD<sub>260</sub> (sól TEA; wydajność 14%) białego ciała stałego. Po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów: D1: 4,6 mg; D2: mg 1,6 mg; D3: 3,1 mg).

ESI-MS: obliczona: 889,15858; wyznaczona: 889,15722

### izomer D1:

RP HPLC:  $R_T = 9,7$  min (Metoda analityczna I)

<sup>1</sup>H NMR (ppm)  $\delta = 9,17$  (s; 1 H); 9,10 (s; 1 H); 6,05 (d;  $J = 2,5$  Hz; 1 H); 6,04 (d;  $J = 3,2$  Hz; 1 H); 4,64 (m; 2 H); 4,58 (m; 1 H); 4,46 (m; 1 H); 4,40 (m; 2 H); 4,34-4,23 (m; 4 H); 4,14 (s; 6 H); 2,67 (t;  $J = 20,9$  Hz; 2 H); 0,37 (m; 6 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm)  $\delta = 79,23$  (m; 2 P); 3,68 (m; 2 P)

### izomer D2:

RP HPLC:  $R_T = 9,8$  min (Metoda analityczna I)

$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,08$  (s; 2 H); 6,05 (d;  $J = 2,5$  Hz; 2 H); 4,64 (dd;  $J = 4,3; 3,0$  Hz; 2 H); 4,56 (m; 2 H); 4,40 (m; 2 H); 4,30-4,24 (m; 4 H); 4,12 (s; 6 H); 2,53 (t;  $J = 20,8$  Hz; 2 H); 0,27 (m; 6 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 79,23$  (m; 2 P); 3,68 (m; 2 P)

**izomer D3:**

RP HPLC:  $R_T = 10,2$  min (Metoda analityczna I)

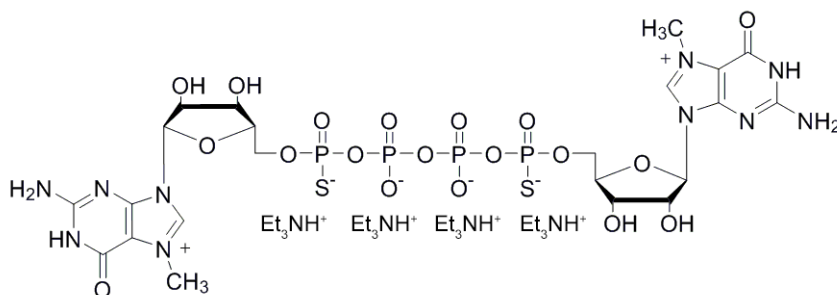
$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,16$  (s; 2 H); 6,05 (d;  $J = 2,5$  Hz; 2 H); 6,01 (d;  $J = 2,5$  Hz; 2 H); 4,63 (m; 2 H); 4,50-4,40 (m; 4 H); 4,35-4,27 (m; 4 H); 4,15 (s; 6 H); 2,52 (t;  $J = 20,8$  Hz; 2 H); 0,36 (m; 6 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 82,59$  (m; 2P); 7,74 (m; 2P)

**5'-O-(P1-7-Metyloguanozyno-5'-O-P4-7-metyloguanozyno)-P1,P4-ditiotetrafosforan; sól trietyloamoniowa;  $m^7\text{Gp}_s\text{ppp}_s m^7\text{G}$**

Wychodząc z  $m^7\text{Gp}_s$  (sól TEA; 165 mg; 0,33 mmol) i Im-pp-Im (sól sodowa, 54 mg; 0,165 mmol; 0,5 equiv.) uzyskano 211 mg (sól TEA; wydajność 48%) żółtawego ciała stałego. Czas sprzęgania: 45 h. Pobrano 10 mg związku i po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów: D1+D2: 3,15 mg; D3: 1,4 mg.

ESI- MS: obliczona: 927,01643; wyznaczona: 927,01435



**izomery D1/D2:**

RP HPLC:  $R_T = 9,0$  (D1); 9,3 (D2) min (Metoda analityczna I)

$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,32$  (s; 1 H); 9,29 (s; 1 H); 6,03 (m; 2 H); 4,69 (m; 2 H); 4,56 (m; 2 H); 4,45-4,27 (m; 6 H); 4,15 (s; 3 H); 4,14 (s; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 44,11$  (m; 2 P); -23,40 (m; 2 P)

**izomer D3:**

RP HPLC:  $R_T = 10,8$  min (Metoda analityczna I)

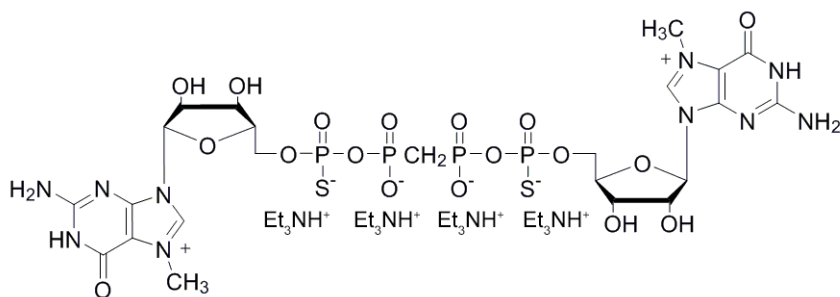
$^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,28$  (s; 1 H); 6,04 (d;  $J = 3,5; 2$  H); 4,69 (dd;  $J = 5,0; 3,5$  Hz; 2H); 4,55 (m; 2 H); 4,45-4,40 (m; 4 H); 4,37-4,29 (m; 2 H); 4,15 (s; 6 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 40,27$  (d;  $J = 14,7$  Hz; 2 P); -23,40 (m; 2 P)

**5'-O-(P1-7-Metyloguanozyno-5'-O-P4-7-metyloguanozyno)-P1,P4-ditio-P2,P3-dimetylonotetrafosforan; sól trietyloamoniowa;  $m^7\text{Gp}_s\text{pCH}_2\text{pp}_s m^7\text{G}$**

Wychodząc z  $m^7\text{Gp}_s$  (sól TEA; 165 mg; 0,33 mmol) i Im-pp-Im (sól sodowa; 54 mg; 0,165 mmol; 0,5 equiv.) uzyskano 162 mg (sól TEA, wydajność 37%) żółtawego ciała stałego. Czas sprzęgania: 18 h.

Pobrano 10 mg związku i po rozdziale na RP HPLC uzyskano następujące ilości diastereizomerów: D1: 1.0 mg; D2: 2.1 mg; D3: 1.3 mg. ESI- MS: obliczona: 925,03715; wyznaczona: 925,03514



**izomer D1:**RP HPLC:  $R_T = 8,9$  min (Metoda analityczna I) $^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,33$  (s; 2 H); 6,07 (d;  $J = 3,3$  Hz; 2 H); 4,71 (m; 2 H); 4,58 (m; 2 H); 4,44-4,26 (m; 6 H); 4,16 (s; 6 H); 2,69 (t;  $J = 21,0$  Hz; 2 H) $^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 42,34$  (d;  $J = 32,2$  Hz; 2 P); 7,07 (m; 2 P)**izomer D2:**RP HPLC:  $R_T = 9,3$  min (Metoda analityczna I) $^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,34$  (s; 1 H); 9,32 (s; 1 H); 6,07 (d;  $J = 3,3$  Hz; 1 H); 6,06 (d;  $J = 3,3$  Hz; 1 H); 4,70 (m; 2 H); 4,59 (m; 1 H); 4,59 (m; 1 H); 4,54 (m; 1 H); 4,45-4,25 (m; 6 H); 4,17 (s; 3 H); 4,15 (s; 3 H); 2,69 (m; 2 H) $^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 42,11$  (m; 2 P); 7,00 (m; 2 P)**izomer D3:**RP HPLC:  $R_T = 10,2$  min (Metoda analityczna I) $^1\text{H NMR}$  (ppm)  $\delta = 9,29$  (s; 2 H); 6,05 (d;  $J = 3,0$  Hz; 2 H); 4,68 (m; 2 H); 4,54 (m; 2 H); 4,42 (m; 4 H); 4,31 (m; 2 H); 4,15 (s; 6 H); 2,69 (t;  $J = 20,6$  Hz; 2 H) $^{31}\text{P NMR}$  (ppm)  $\delta = 42,3$  (m; 2 P); 7,19 (m; 2 P)**3.1.5.3.7. Znakowane fluorescencyjnie nukleotydy****Ogólna procedura znakowania fluorescencyjnego przy użyciu bezwodników kwasu antranoilowego lub N-metyloantranilowego.**

Odpowiedni nukleotyd (sól sodowa lub TEA; 1 equiv.) rozpuszczono w wodzie mQ, pH doprowadzono do 9,5 przy pomocy 1M NaOH. Do mieszanego roztworu dodano 0,2 equiv. odpowiedniego bezwodnika a pH utrzymywano przy wartości 9,5 za pomocą 0,3 M roztworu NaOH. Bezwodnik dodawano w małych ilościach (około 0.2 equiv.) dopóki cały substrat nie uległ konwersji do produktu, co kontrolowano za pomocą RP-HPLC. Reakcja przebiegała w czasie 6-8 h a następnie pH obniżono do 7,0 za pomocą 50% kwasu octowego a mieszaninę reakcyjną przefiltrowano przez filtr strzykawkowy 60  $\mu\text{m}$ .

**Oczyszczanie znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów za pomocą chromatografii wykluczania oraz ich konwersja w sole sodowe.**

Produkty oczyszczono za pomocą chromatografii wykluczania na żywicy Sephadex G15 (GE Healthcare). Zobojętnioną i przefiltrowaną (filtr strzykawkowy 60  $\mu\text{m}$ ) mieszaninę reakcyjną odparowano do 1-2  $\text{cm}^3$  i naniesiono na kolumnę z żywicą Sephadex, a następnie używając wody mQ jako eluenta zbierano frakcje o objętości 2-3  $\text{cm}^3$ . We frakcjach wykazujących absorbcji (260 nm) obecność produktu sprawdzano na RP-HPLC (Metoda analityczna II), frakcje zawierające produkt łączono a znakowany nukleotyd po odparowaniu rozpuszczalnika pod obniżonym ciśnieniem izolowano jako sól TEA. Sól tą przekształcano w sól sodową przez wytrącenie za pomocą bezwodnego roztworu  $\text{NaClO}_4$  (stężenie odpowiadające minimum 2.5 equiv. na jeden ładunek negatywny) w acetonie (~20  $\text{cm}^3$  acetonu na 1  $\text{cm}^3$  roztworu nukleotydu w wodzie mQ). Następnie zawiesinę schłodzono do około 4  $^\circ\text{C}$ , osad odsączono poprzez wirowanie (4  $^\circ\text{C}$ , 6000 rpm, 6 min), przepłukano kilkakrotnie zimnym, bezwodnym acetonem oraz wysuszono *in vacuo* nad  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ .

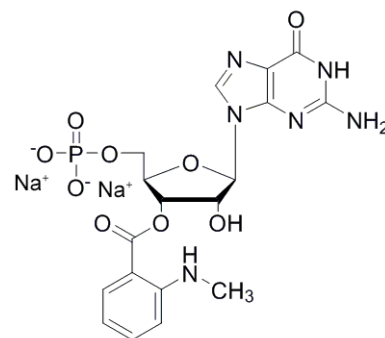
### 5'-O-(2'(3')-O-Mantranoiloguanozyno)-monofosforan; sól trietyloamoniowa; 3'(2') Mant-GMP

GMP (sól TEA salt; 100 mg; 0,25 mmol) rozpuszczono w 5,5 cm<sup>3</sup> wody mQ. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,8 M). Otrzymano 13,2 mg (sól TEA; wydajność 10% ) białego ciała stałego.

ESI-MS: obliczona: 495,10; wyznaczona: 495,10

**izomer C2'**: RP HPLC: R<sub>T</sub> = 17,3 min (Metoda analityczna II)

**izomer C3'**: RP HPLC: R<sub>T</sub> = 17,8 min (Metoda analityczna II)



### 5'-O-(2'(3')-O-Mantranoilo-7-metyloguanozyno)-monofosforan; sól trietyloamoniowa; 3'(2') Mant-m<sup>7</sup>GMP

#### Metoda 1

m<sup>7</sup>GMP (sól TEA; 160 mg; 0,33 mmol) rozpuszczono w 5,5 cm<sup>3</sup> wody mQ. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,8 M). Otrzymano 1520 jednostek optycznych (sól TEA; wydajność 31%) bladeżółtego ciała stałego.

#### Metoda 2 (sól sodowa)

Oczyszczanie za pomocą chromatografii wykluczania oraz konwersja w sól sodową. Wychodząc z 77 mg m<sup>7</sup>GMP (sól sodowa) uzyskano 1,4 mg (sól sodowa; wydajność 2%) bladeżółtego ciała stałego.

ESI-MS: obliczona: 509,11911; wyznaczona: 509,12169

#### izomer C2'

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 17,7 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 8,04 (m; 1 H); 7,55 (m; 1 H); 6,87 (m; 1 H); 6,77 (m; 1 H); 6,36 (d; J = 4,2 Hz; 1 H); 5,79 (dd; J = 4,2; 5,0 Hz; 1 H); 4,8 (m; nakłada się z pikiem HDO; 1 H); 4,53 (m; 1 H); 4,16–4,04 (m; 2 H); 4,14 (s; 3 H); 2,87 (s; 3 H)

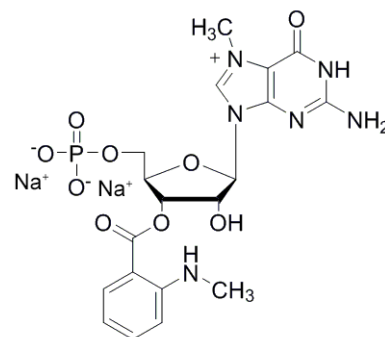
<sup>31</sup>P NMR (ppm): 3,87 (s; 1 P)

#### izomer C3'

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 18,3 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 8,10 (m; H 1); 8,04; 7,55 (m; 1 H); 6,90 (1H; m; H3); 6,77 (m; 1 H); 6,26 (d; J = 5,6 Hz; 1 H); 5,65 (dd; J = 4,8; 3,0 Hz; 1 H); 5,02 (dd; J = 5,7; 4,8 Hz; 1 H); 4,71 (m; 1 H); 4,23–4,19 (m; 1 H); 4,14 (s; 1 H); 4,10–4,05 (m; 1 H); 2,91 (s; 3 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm): 3,87 (s; 1 P)



### 5'-O-(2'(3')-O-Mantranoilo-7-metyloguanozyno)-difosforan; sól trietyloamoniowa; 3'(2') Mant-m<sup>7</sup>GDP

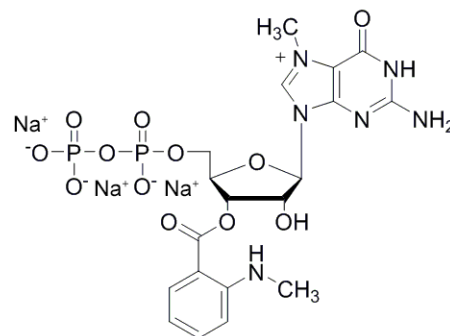
#### Metoda 1

m<sup>7</sup>GDP (sól TEA; 100 mg; 0,137 mmol; czystość 90%) rozpuszczono w 2,5 cm<sup>3</sup> wody mQ. Produkt został oczyszczony za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 1900 jednostek optycznych (sól TEA; wydajność 92%) bladeżółtego ciała stałego.

#### Metoda 2 (sól sodowa)

Oczyszczanie za pomocą chromatografii wykluczania oraz konwersja w sól sodową. Wychodząc z 101 mg m<sup>7</sup>GDP (sól TEA) uzyskano 18,8 mg (sól sodowa, wydajność 18%) bladeżółtego ciała stałego.

ESI-MS: obliczona: 589,085466; wyznaczona: 589,08546.



**izomer C2':**

RP HPLC:  $R_T = 14,6$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H NMR}$  (ppm): 8,04 (m; 1 H); 7,54 (m; 1 H); 6,87 (m; 1 H); 6,74(m; 1 H); 6,32 (s;  $J = 3,0$  Hz; 1 H1); 5,78 (dd;  $J = 3,0; 5,0$  Hz; 1 H); 4,87 (dd;  $J = 5,3; 5,0$  Hz; 1 H); 4,51 (m; 1 H); 4,45–4,27 (m; 2 H); 4,12 (s; 3 H); 2,86 (s; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm): -6,05 (s; 1 P); -10,52 (s; 1 P)

**izomer C3':**

RP HPLC:  $R_T = 15,6$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H NMR}$  (ppm): 8,09 (m; 1 H); 7,54 (m; 1 H); 6,87 (m; 1 H); 6,74 (m; 1 H); 6,24 (d;  $J = 5,9$  Hz; 1 H); 5,66 (1H; dd;  $J = 5,4; 3,4$  Hz; 1 H); 5,07 (1H; dd;  $J = 5,9; 5,4$  Hz; 1 H); 4,73 (m; 1 H); 4,45–4,27 (m; 1 H); 4,14 (s; 3 H); 2,89 (s; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm): -6.05 (s; 1 P); -10.52 (s; 1 P)

**5'-O-(2'(3')-O-Mantranoilo-7-metyloguanozyno)-P1,P2-metyleno(bisfosfonian); sól trietyloamoniowa; 3'(2') Mant-m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p**

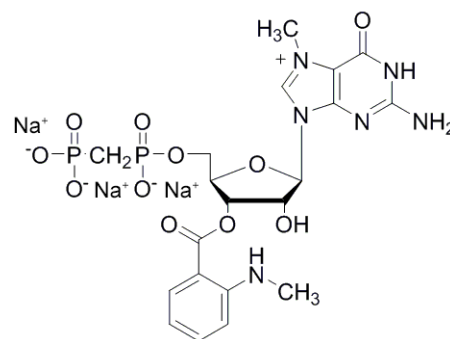
**Metoda 1**

m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p (TEA salt; 120 mg; 0,176 mmol) rozpuszczono w 3,0 cm<sup>3</sup> wody mQ. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 1400 jednostek optycznych (sól TEA; wydajność 53%) bladeżółtego ciała stałego.

**Metoda 2 (sól sodowa)**

Oczyszczanie za pomocą chromatografii wykluczania oraz konwersja w sól sodową. Wychodząc z 64 mg m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p uzyskano 6,6 mg (sól sodowa; wydajność 10%) bladeżółtego ciała stałego.

ESI-MS: obliczona: 587,10620; wyznaczona: 587,10641

**izomer C2':**

RP HPLC:  $R_T = 14,9$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H NMR}$  (ppm): 8,04 (m; 1 H); 7,54 (m; 1 H); 6,87(m; 1 H); 6,74 (m; 1 H); 6,32 (d;  $J = 3,0$  Hz; 1 H); 5,67 (m; 1 H); 4,84 (m; 1 H); 4,57 (m; 1 H); 4,36 (m; 1 H); 4,13 (s; 3 H); 2,86 (s; 3 H); 2,22 (d; 2 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm): 22,44 (s; 1 P); 11,84 (s; 1 P)

**izomer C3':**

RP HPLC:  $R_T = 16,1$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H NMR}$  (ppm): 8,10 (m; 1 H); 7,54 (m; 1 H); 6,87(m; 1 H); 6,74 (m; 1 H); 6,24 (d;  $J = 6,0$  Hz; 1 H); 5,51 (m; 1 H); 5,10 (m; 1 H); 4,73 (m; 1 H); 4,36 (m; 2 H); 4,15 (s; 3 H); 2,89 (s; 3 H); 2,22 (d; 2 H)  $^{31}\text{P NMR}$  (ppm): 22,44 (s; 1 P); 11,84 (s; 1 P)

**5'-O-(2'(3')-O-Antranoilo-7-metyloguanozyno)-difosforan; sól trietyloamoniowa; 3'(2') Ant-m<sup>7</sup>GDP**

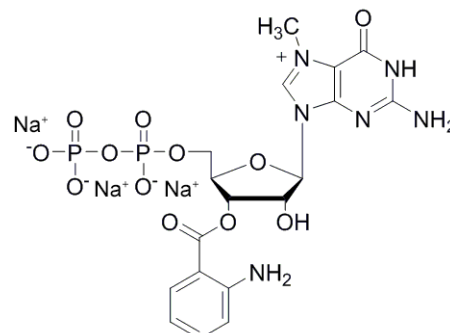
**Metoda 1**

m<sup>7</sup>GDP (sól TEA; 250 mg; 0,378 mmol; czystość 90%) rozpuszczono w 6,5 cm<sup>3</sup> wody mQ. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,2 M). Otrzymano 1304 jednostek optycznych (sól TEA; wydajność 26%) bladeżółtego ciała stałego.

**Metoda 2 (sól sodowa)**

Oczyszczanie za pomocą chromatografii wykluczania oraz konwersja w sól sodową. Wychodząc z 101 mg m<sup>7</sup>GDP uzyskano 12,4 mg (sól sodowa, wydajność 11%) bladeżółtego ciała stałego.

ESI-MS: obliczona: 575,06982; wyznaczona: 575,07000



**izomer C2':**

RP HPLC:  $R_T = 10,8$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H NMR}$  (ppm): 8,01 (m; 1 H); 7,42 (m; 1 H); 6,86 (m; 1 H); 6,82 (m; 1 H); 6,36 (m;  $J = 1,8$  Hz; 1 H); 5,84 (m; 1 H); 4,90 (dd;  $J = 6,2; 5,5$  Hz; 1 H); 4,42 (m; 1 H); 4,47–4,26 (m; 2 H); 4,14 (s; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm): -6,31 (d;  $J = 23,0$  Hz; 1 P); -10,76 (d;  $J = 23,0$  Hz; 1 P)

**izomer C3':**

RP HPLC:  $R_T = 11,6$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H NMR}$  (ppm): 8,04 (m; 1 H); 7,42 (m; 1 H); 6,86 (m; 1 H); 6,82 (m; 1 H); 6,25 (d;  $J = 5,6$  Hz; 1 H); 5,67 (m; 1 H); 5,09 (dd;  $J = 5,6; 5,2$  Hz; 1 H); 4,52 (m; 1 H); 4,47–4,26 (m; 2 H); 4,16 (s; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm): -6,31 (d;  $J = 23,0$  Hz; 1 P); -10,76 (d;  $J = 23,0$  Hz; 1 P)

**5'-O-(3'-O-Antranoilo-7,2'-O-dimetyloguanozyno)-monofosforan; sól trietyloamoniowa; Ant- $m_2^{7,2'-O}\text{GMP}$** **Metoda 1**

$m^{7,2'-O}\text{GMP}$  (sól TEA; 100 mg; 0,2 mmol) rozpuszczono w 4  $\text{cm}^3$  wody mQ. Produkt oczyszczono przy pomocy chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-0,8 M). Otrzymano 630 jednostek optycznych (sól TEA; wydajność 21%) bledożółtego ciała stałego.

**Metoda 2 (sól sodowa)**

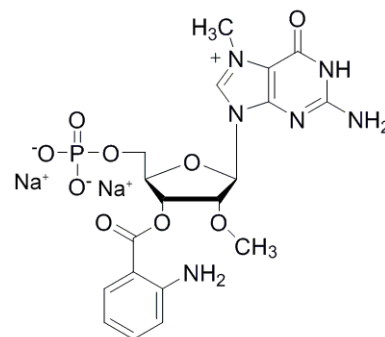
Oczyszczanie za pomocą chromatografii wykluczania oraz konwersja w sól sodową. Wychodząc z 77 mg  $m^{7,2'-O}\text{GMP}$  (sól TEA) uzyskano 26,7 mg (sól sodowa, wydajność 44%) bledożółtego ciała stałego.

RP HPLC:  $R_T = 14,6$  min (Metoda analityczna II)

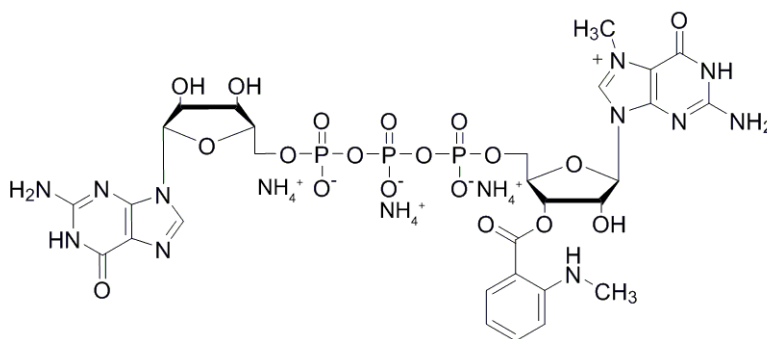
ESI-MS: obliczona: 509,11911; wyznaczona: 509,12169

$^1\text{H NMR}$  (ppm): 7,86 (m; 1 H); 7,37 (m; 1 H); 6,81 (m; 1 H); 6,68 (m; 1 H); 6,27 (d;  $J = 5,5$  Hz; 1 H); 5,74 (dd;  $J = 4,9; 2,7$  Hz; 1 H); 4,75 (dd;  $J = 5,5; 4,9$  Hz; 1 H); 4,71 (m; 1 H); 4,20–4,08 (m; 2 H); 4,08 (s; 3 H); 3,51 (s; 3 H)

$^{31}\text{P NMR}$  (ppm): 3,56 (s; 1 P)

**3.1.5.3.7.1. Syntezy dinukleotydowych analogów kapu znakowanych fluorescencyjnie:****5'-O-(P1-3'(2')-O-Antranoilo-7-metyloguanozyno-5'-O-P3-guanozyno)-trifosforan; sól amoniowa; 3'(2') Ant- $m^7\text{GpppG}$** 

Ant- $m^7\text{GDP}$  (sól TEA; 60 mg; 0,08 mmol), GMP-Im (sól sodowa; 48 mg; 0,12 mmol) i bezwodny  $\text{ZnCl}_2$  (125 mg; 0,93 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DMF. Po 70 minutach reakcję zatrzymano przez dodanie EDTA (400 mg; 1,19 mmol) w wodnym roztworze  $\text{NaHCO}_3$  (200 mg; 2,38 mmol). WkolejnymetapiepH doprowadzonodo7,0 a produkt wyizolowano przy pomocy chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,4 M). Otrzymano 760 jednostek optycznych (wydajność 39%) bledożółtego ciała stałego. Produkt oczyszczono na RP-HPLC i uzyskano 25,4 mg (sól  $\text{NH}_4$ ; wydajność 34%) końcowego produktu.



ESI-MS: obliczona: 920,11725; wyznaczona: 920,11565

**izomer C2':**

RP HPLC:  $R_T = 9,9$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 9,13 (s; 1 H); 7,99 (s; 1 H); 7,86 (m; 1 H); 7,36 (m; 1 H); 6,76 (m; 1 H); 6,70 (m; 1 H); 6,18 (d;  $J = 3,0$  Hz; 1 H); 5,78 (d;  $J = 5,5$  Hz; 1 H); 5,72 (dd;  $J = 3,0; 4,5$  Hz; 1 H); 4,75 (m; nakłada się z sygnałem HDO; 1 H); 4,61 (dd;  $J = 5,5; 5,2$ ; 1 H); 4,50–4,21 (m; 6 H); 4,47 (dd;  $J = 5,2; 2,1$ ; 1 H); 4,07 (s; 3 H)

$^{31}\text{P}$  NMR (ppm): -10,59 (m;  $J = 19,5$  Hz; 2 P); -22,26 (d;  $J = 19,5$  Hz; 1 P)

**izomer C3':**

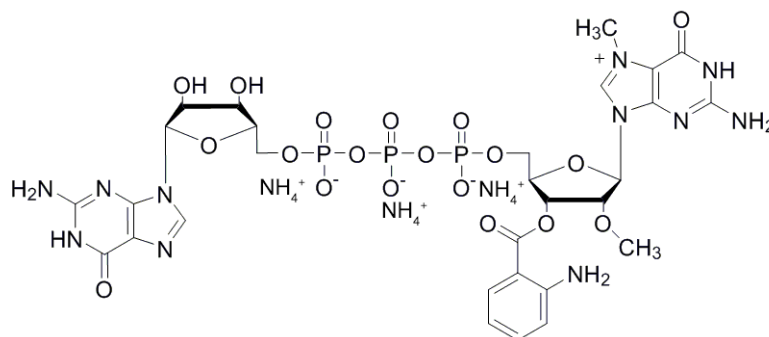
RP HPLC:  $R_T = 10,6$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 9,21 (s; 1 H); 7,99 (s; 1 H); 7,86 (m; 1 H); 7,36 (m; 1 H); 6,80 (m; 1 H); 6,70 (m; 1 H); 6,10 (d;  $J = 6,0$  Hz; 1 H); 5,78 (d;  $J = 5,5$  Hz; 1 H); 5,51 (1H; dd;  $J = 5,1; 2,8$  Hz; 1 H); 4,97 (dd;  $J = 6,0; 5,1$  Hz; 1 H); 4,66 (m; 1 H); 4,61 (1H; dd;  $J = 5,5; 5,2$ ; 1 H); 4,50–4,21 (m; 6 H); 4,47 (1H; dd;  $J = 5,2; 2,1$  Hz; 1 H); 4,09 (s; 3 H)

$^{31}\text{P}$  NMR (ppm): -10,59 (m;  $J = 19,5$  Hz; 2 P); -22,26 (d;  $J = 19,5$  Hz; 1 P)

**5'-O-(P1-3'-O-Antranoilo-7,2'-O-dimetyloguanozino-5'-O-P3-guanozino)-trifosforan; sól amoniowa; Ant-m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GpppG**

Ant-m<sub>2</sub><sup>7,2'-O</sup>GMP (sól TEA; 32 mg; 0,06 mmol) oraz GDP-Im (sól sodowa; 39 mg 0,07 mmol) I bezwodny ZnCl<sub>2</sub> (90 mg; 0,67 mmol) rozpuszczono w 0,5 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMF. Po 90 minutach reakcję zatrzymano poprzez dodanie EDTA (185 mg; 0,55 mmol) w wodnym roztworze NaHCO<sub>3</sub> (92 mg; 1,1 mmol). W kolejnym etapie pH zostało doprowadzone do 7,0 a produkt został wyizolowany za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,4 M). Otrzymano 1250 jednostek optycznych (wydajność 83%) białozółtego ciała stałego. Produkt oczyszczono na HPLC i uzyskano 15,4 mg (sól NH<sub>4</sub>; wydajność 26%).



ESI-MS: obliczona: 934,1329; wyznaczona: 934,13275

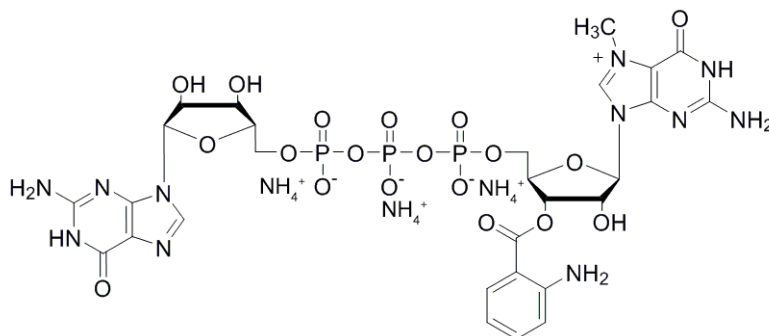
RP HPLC:  $R_T = 11,5$  min (Metoda analityczna II)

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 9,20 (s; 1 H); 8,03 (s; 1 H); 7,84 (m; 1 H); 7,38 (m; 1 H); 6,81 (m; 1 H); 6,71 (m; 1 H); 6,10 (d;  $J = 5,5$  Hz; 1 H); 5,78 (d;  $J = 5,5$  Hz; 1 H); 5,60 (t;  $J = 3,2$  Hz; 1 H); 4,66 (m; 2 H); 4,61 (t;  $J = 5,5; 5,0$  Hz; 1 H); 4,45 (dd;  $J = 5,0; 3,4$ ; 1 H); 4,42 (s; 1 H); 4,30 (m; 4H); 4,10 (s; 3 H); 3,47 (s; 3 H)

$^{31}\text{P}$  NMR (ppm): -10,60 (d;  $J = 18,5$  Hz; 2 P); -22,19 (d;  $J = 18,5$  Hz; 1 P)

**5'-O-(P1-3'(2')-O-Mantranoilo-7-metyloguanozyno-5'-O-P3-guanozyno)-trifosforan; sól amoniowa; 3'(2')Mant-m<sup>7</sup>GpppG**

Mant-m<sup>7</sup>GDP (sól TEA; 90 mg; 0,115 mmol), GMP-Im (sól sodowa; 70 mg; 0,168 mmol) i bezwodny ZnCl<sub>2</sub> (180 mg; 1,34 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DMF. Po 70 minutach reakcję zatrzymano poprzez dodanie EDTA (560 mg; 1,5 mmol) w wodnym roztworze NaHCO<sub>3</sub> (252 mg; 3 mmol). W kolejnym etapie pH doprowadzono do 7,0 a produkt wyizolowano przy pomocy chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,4 M).



Otrzymano 1070 jednostek optycznych (wydajność 36%) bladeżółtego ciała stałego.

Produkt oczyszczono na HPLC i uzyskano 19,4 mg (sól NH<sub>4</sub>; wydajność 17%).

ESI-MS: obliczona: 934,329; wyznaczona: 934,13313

**izomer C2':**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 12,7 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 9,12 (s; 1 H); 7,98 (s; 1 H); 7,87 (m; 1 H); 7,42 (m; 1 H); 6,68 (m; 1 H); 6,61 (m; 1 H); 6,16 (d; J = 2,7 Hz; 1 H); 5,77 (d; J = 4,2 Hz; 1 H); 5,65 (m; 1 H); 4,65 (m; 1 H); 4,58 (dd; J = 5,2; 5,0 Hz; 1 H); 4,51 (m; 1 H); 4,42–4,20 (m; 5 H); 4,05 (s; 3 H); 2,74 (s; 3 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm): -14,44 (d; J = 19,1 Hz; 2 P); -26,00 (d; J = 19,1 Hz; 1 P)

**izomer C3':**

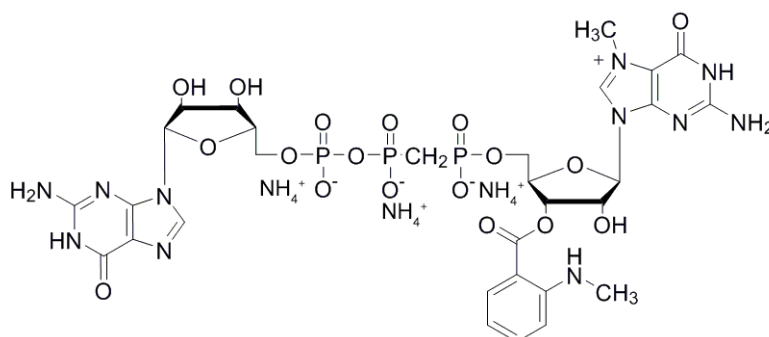
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 13,5 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 9,17 (s; 1 H); 7,98 (s; 1 H); 7,81 (m; 1 H); 7,42 (m; 1 H); 6,68 (m; 1 H); 6,53 (m; 1 H); 6,10 (d; J = 5,7 Hz; 1 H); 5,77 (d; J = 4,2 Hz; 1 H); 5,49 (m; 1 H); 4,98 (dd; J = 5,7; 5,2 Hz; 2 H); 4,65 (m; 1 H); 4,47 (m; 2 H); 4,42–4,20 (m; 5 H); 4,05 (s; 3 H); 2,82 (s; 3 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm): -14,44 (d; J = 19,1 Hz; 2 P); -26,00 (d; J = 19,1 Hz; 1 P)

**5'-O-(P1-3'(2')-O-Mantranoilo-7-metyloguanozyno-5'-O-P3-guanozyno)-P1,P2-(metyleno)trifosforan; sól amoniowa; 3'(2')Mant-m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>ppG**

Mant-m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p (sól TEA; 59 mg; 0,08 mmol), GMP-Im (sól sodowa; 39 mg; 0,08 mmol) i bezwodny ZnCl<sub>2</sub> (80 mg; 0,6 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DMF. Po 4 godzinach reakcję zatrzymano poprzez dodanie EDTA (240 mg; 0,63 mmol) w wodnym roztworze NaHCO<sub>3</sub> (110 mg; 1,33 mmol). W kolejnym etapie pH doprowadzono do 7,0 a produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,4 M). Otrzymano 460 jednostek optycznych (wydajność 23%) bladeżółtego ciała stałego.





Produkt oczyszczono na RP-HPLC i uzyskano 6,3 mg (sól NH<sub>4</sub>; wydajność 8%).

ESI-MS: obliczona: 932,15363; wyznaczona: 932,15324

**izomer C2':**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 12,3 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 9,41 (s; 1 H); 8,00 (s; 1 H); 7,93 (m; 1 H); 7,47 (m; 1 H); 6,99 (m; 1 H); 6,93 (m; 1 H); 6,22 (m; 1 H); 5,78 (m; 1 H); 5,67 (m; 1 H); 4,67 (m; nałożony z sygnałem HDO; 1 H); 4,62 (m; 1 H); 4,52 (m; 1 H); 4,48 (m; 1 H); 4,39–4,20 (m; 5 H); 4,05 (s; 3 H); 2,74 (s; 3 H); 2,42 (m; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm): 18,31 (m; 1 P); 8,04 (s; 1 P); -10,09 (s; 1 P)

**izomer C3':**

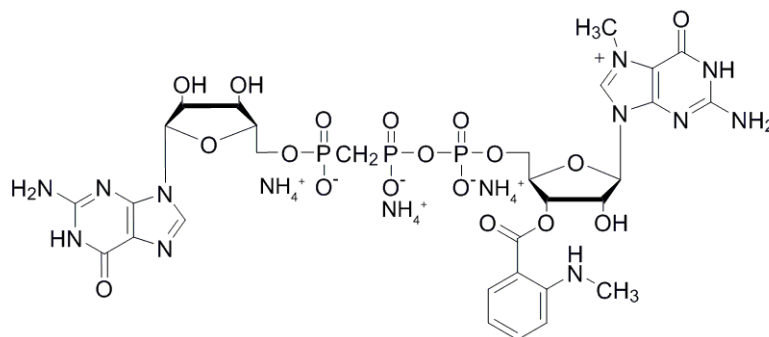
RP HPLC: R<sub>T</sub> = 13,3 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 9,49 (s; 1 H); 8,02 (s; 1 H); 7,93 (m; 1 H); 7,47 (m; 1 H); 6,76 (m; 1 H); 6,67 (m; 1 H); 6,14 (m; 1 H); 5,78 (m; 1 H); 5,55 (m; 1 H); 5,07 (m; 1 H); 4,92 (m; nałożony z HDO; 1 H); 4,62 (m; 1 H); 4,52 (m; 1 H); 4,48 (m; 1 H); 4,39–4,20 (m; 1 H); 4,05 (s; 3 H); 2,82 (s; 3 H); 2,42 (m; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm): 18,31 (m; 1 P); 8,04 (s; 1 P); -10,09 (s; 1 P)

**5'-O-(P1-3'(2')-O-Mantranoilo-7-metyloguanozyno-5'-O-P3-guanozyno)-P2,P3-(metyleno)trifosforan; sól amoniowa; 3'(2')Mant-m<sup>7</sup>GppCH<sub>2</sub>pG**

Mant-m<sup>7</sup>GMP (sól TEA; 49 mg; 0,08 mmol), GpCH<sub>2</sub>p-Im (sól sodowa; 50 mg; 0,08 mmol) i bezwodny ZnCl<sub>2</sub> (110 mg; 0,8 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DMF. Po 10 godzinach reakcję zakończono przez dodanie EDTA (330 mg; 0,9 mmol) w wodnym roztworze NaHCO<sub>3</sub> (150 mg; 1,8 mmol). W kolejnym etapie pH doprowadzono do 7,0 a produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex (gradient TEAB 0-1,4 M).



Otrzymano 675 jednostek optycznych (wydajność 36%) bledożółtego ciała stałego. Produkt oczyszczono na HPLC i uzyskano 8,8 mg (sól NH<sub>4</sub>; wydajność 12% zaobserwowano częściowy rozkład podczas liofilizacji). ESI-MS: obliczona: 932,15363; znaleziona: 932,15313

**izomer C2':**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 12,4 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 9,20 (s; 1 H); 8,01 (s; 1 H); 7,89 (m; 1 H); 7,44 (m; 1 H); 6,70 (m; 1 H); 6,61 (m; 1 H); 6,18 (d; J = 3,5 Hz; 1 H); 5,72 (d; J = 4,7 Hz; 1 H); 5,64 (1H; dd; J = 5,2; 3,5 Hz; 1 H); 4,68 (m; nałożony z sygnałem HDO; 1 H); 4,62 (dd; J = 5,2; 4,5 Hz; 1 H); 4,45 (1H; t; J = 4,5 Hz; 1 H); 4,40–4,16 (m; 6 H); 4,06 (s; 3 H); 2,73 (s; 3 H); 2,38 (m; J = 20,5 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm): 18,05 (m; 1 P); 8,36 (m; 1 P), -10,18 (m; 1 P)

**izomer C3':**

RP HPLC: R<sub>T</sub> = 13,2 min (Metoda analityczna II)

<sup>1</sup>H NMR (ppm): 9,24 (s; 1 H); 8,01 (s; 1 H); 7,89 (m; 1 H); 7,44 (m; 1 H); 6,70 (m; 1 H); 6,61 (m; 1 H); 6,10 (d; J = 5,9 Hz; 1 H); 5,74 (d; J = 5,2 Hz; 1 H); 5,48 (dd; J = 4,7; 2,7 Hz; 1 H); 4,97 (dd; J = 5,9; 4,7 Hz; 1 H); 4,62 (dd; J = 5,2; 4,5 Hz; 1 H); 4,49 (s; 1 H); 4,45 (1H; t; J = 4,5 Hz; 1 H); 4,40–4,16 (m; 6 H); 4,06 (s; 3 H); 2,79 (s; 3 H); 2,38 (t; J = 20,5 Hz; 2 H)

<sup>31</sup>P NMR (ppm): 18,05 (m; 1 P); 8,36 (m; 1 P); -10,18 (m; 1 P)

## 3.2. Badania fizykochemiczne

### 3.2.1 Badania fluorescencyjnie znakowanych analogów kapu.

(przeprowadzone przez zespół badawczy prof. Z. Wieczorka)

#### 3.2.1.1. Wyznaczanie charakterystyki spektralnej badanych związków

Do sporządzenia wszystkich roztworów użyto 0,067 M buforu PBS. Widma absorpcyjne zarejestrowano za pomocą spektrofotometru Cary 5000 UV-Vis-NIR (Varian Inc.) wykorzystując kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 1 cm. Do wyznaczenia wartości  $pK_a$  oraz widm absorpcyjnych poszczególnych form jonowych wykorzystano opisaną wcześniej metodę.<sup>301</sup> Widma emisyjne zarejestrowano używając spektrofluorymetru Cary Eclipse (Varian Inc.) oraz bloku grzewczego termostatowanego w temperaturze  $25,0 \pm 0,1$  °C. Widma emisji i wzbudzenia rejestrowano w kuwecie o wymiarach 1,0 cm × 0,4 cm w temperaturze 25 °C. Kwantowe wydajności fluorescencji wyznaczono poprzez porównanie integralnej intensywności widm emisyjnych stanu przejściowego w maksimum długofalowym absorpcji z roztworem siarczanu chininy w 0,1 M kwasie siarkowym, przyjmując, że jej wartości wynosi 0,57. Gęstości optyczne próbek nigdy nie przekraczały 0,1. Fotostabilność badanych związków oceniono przy pomocy czasowo-zależnych pomiarów stanu przejściowego fluorescencji, zarejestrowanych przy maksymalnie otwartej szczelinie wzbudzenia.

#### 3.2.1.2. Pomiary czasów życia fluorescencji

Czasy życia fluorescencji związków były wyznaczone przy długości fali 340 nm w temperaturze 20 °C w buforze PBS. Źródłem wzbudzenia była sub-nanosekundowa dioda pulsacyjna LED, PLS-340, kontrolowana przez sterownik PDL800-D a czas trwania pulsu optycznego wynosił 410 ps. Intensywności zaniku były zbierane w technice domeny czasu używając miernika czasu fluorescencji FluoTime 200 (PicoQuant, GmbH) wyposażonego w mikrokanałowy fotopowielacz płytkowy R3809U-50 (MCP-PMT, Hamamatsu) oraz moduł PicoHarp300 TCSPC. Polaryzatory ustawiono do warunków kąta magicznego, a fluorescencje obserwowano poprzez monochromator pojedynczej emisji o długości ogniskowej 100 mm (ScienceTech 9030). Czasy życia fluorescencji obliczono używając pakietu obliczeniowego FluoFit (wersja 4,4) poprzez dopasowanie uzyskanych danych doświadczalnych do funkcji monowkładniczych. Analiza uwzględniała iteratywne dopasowanie sumy funkcji wykładniczych do zarejestrowanych eksperymentalnie krzywych zaniku.

### 3.2.2. Pomiary NMR

Konformacja pierścienia D-rybozy została wyznaczona z widm <sup>1</sup>H NMR na podstawie wartości stałych sprzężenia  $J_{1,2'}$  oraz  $J_{3,4'}$  używając poniższych równań<sup>524, 525</sup>:

$$J_{1,2'} = 9,3(1-X_N) = 9,3X_S \quad \text{Rów. 3.1}$$

$$J_{2,3'} = 4,6X_N + 5,3(1-X_N) \quad \text{Rów. 3.2}$$

$$J_{3,4'} = 9,3X_N \quad \text{Rów. 3.3}$$

Gdzie  $X_N$  oraz  $X_S$  oznaczają ułamki molowe związku odpowiednio w konformacji N oraz S

Dane uzyskane z analizy widm <sup>1</sup>H NMR wykorzystano także do wyznaczenia populacji regioizomerów 2' oraz 3' znakowanych fluorescencyjnie analogów kapu. Porównano intensywność sygnałów charakterystycznych dla danych izomerów i na tej podstawie oszacowano równowagę regioizomerów.

### **3.3. Badania biochemiczne**

#### **3.3.1. Materiały i odczynniki**

##### **3.3.1.1. Powszechnie stosowane bufor**

Przed użyciem wszystkie bufor były filtrowane i/lub autoklawowane.

##### **Bufor do lizy Dcp1/2**

300 mM NaCl, 39 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM imidazol, 4 mM 2-merkaptioetanol, 0,5% (v/v) Igepal C-630, pH 7,5

##### **Bufor A do elucji Dcp1/2**

300 mM NaCl, 39 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM imidazol, 4 mM 2-merkaptioetanol, 100 mM imidazol, pH 7,5

##### **Bufor B do elucji Dcp1/2**

300 mM NaCl, 39 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM imidazol, 4 mM 2-merkaptioetanol, 250 mM imidazol, pH 7,5

##### **Bufor Dcp1/2**

50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% (v/v) glicerol, pH 7,5

##### **Bufor do lizy Dcp1**

500 mM NaCl, 20 mM HEPES, 10 mM imidazol, 10 mM 2-merkaptioetanol, 0,5% (v/v) Igepal C-630, pH 7,5

##### **Bufor do płukania Dcp1**

500 mM NaCl, 20 mM HEPES, 10 mM imidazol, 10 mM 2-merkaptioetanol, pH 7,5

##### **Bufor do elucji Dcp1**

500 mM NaCl, 250 mM imidazol, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 34,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM 2-merkaptioetanol, pH 7,5

##### **Bufor NMR**

200 mM NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 28,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 21,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM DTT, pH 7,0

##### **Bufor NMR do miareczkowania nukleotydów**

150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM DTT, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O = 9:1, pH 7,0

##### **Bufor do krystalizacji Dcp2**

100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM DTT, pH 7,0

### **Bufor PBS**

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

### **Bufor kinetyczny do badań Dcp1/2**

50 mM Tris/HCl, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,01% NP-40, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 8,0

### **Bufor do badań degradacji analogów kapu przez Dcp1/2**

150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT,

### **Pożywki bakteryjne**

#### **LB**

Pożywka przygotowana używając komercyjnie dostępnego LB (Fischer Scientific) zgodnie z instrukcją. Odpowiedni antybiotyk został dodany do stężenia 100 mg · dm<sup>-3</sup>.

#### **M9**

42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 mM NaCl, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2% glukoza, 10<sup>-4</sup>% tiamina, 10<sup>-3</sup>% biotyna, 18 mM <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, pH 7,0 (6,0 w przypadku podłoża sporządzonego na bazie D<sub>2</sub>O). Odpowiedni antybiotyk został dodany do stężenia 100 mg · dm<sup>-3</sup>.

### **3.3.1.2. Przygotowanie białek do badań biochemicznych i biofizycznych.**

Jeżeli nie zaznaczono inaczej wszystkie procedury odbywały się w temperaturze 4 °C. Wszystkie transformacje wykonano metodą szoku termicznego wykorzystując bakterie chemokompetentne. Jeżeli nie napisano inaczej wszystkie hodowle bakteryjne prowadzono na stałej lub płynnej pożywce LB przygotowanej w standardowy sposób.

#### **3.3.1.2.1. eIF4E**

*(otrzymane przez pracowników Zakładu Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego)*

Mysie białko eIF4E (eIF4E<sub>28-217</sub>) było wyrażane w *Escherichia coli*, szczep BL21(DE3) w systemie ekspresyjnym wektora pET. Białko eIF4E oczyszczano z ciałek inkuzyjnych poprzez odmywanie białek bakteryjnych roztworem buforowym zawierającym 1 M chlorowodorek guanidyny i rozpuszczono w roztworze buforowym z 6 M chlorowodorkiem guanidyny. Rekonstrukcję białka do formy natywnej prowadzono w procesie jednostopniowej dializy względem buforu: 50 mM Hepes (pH 7,2), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 2mM DTT. Białko natywne oczyszczono do stanu homogennego metodą chromatografii jonowymiennej na kolumnie HiTrap SP (GE Healthcare). Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie ( $\epsilon_{280} = 53400 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ ).

#### **3.3.1.2.2. hDcpS**

*(otrzymane przez pracowników Zakładu Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego)*

Ludzkie białko DcpS ze znacznikiem heksahistydynowym było wyrażane w *E. coli*, szczep BL21(DE3) (temperatura 37° C, indukcja IPTG) i oczyszczane za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu niklowym (GE Healthcare) w warunkach natywnych. W celu otrzymania homogenicznej frakcji białka hDcpS był następnie oczyszczany za pomocą chromatografii wykluczania (sączenia molekularnego) używając kolumny Pharmacia

Superdex-200 (GE Healthcare) w buforze o następującym składzie: 0,05 M KCl, 0,2 mM EDTA, 20% (v/v) glicerol (pH 7,6). Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie ( $\epsilon_{280} = 30400 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ ).

### 3.3.1.2.3. SpDcp1/2

#### Wariant 1

Białka SpDcp1 oraz SpDcp2<sub>1-243</sub>, pochodzące z *Schizosaccharomyces pombe* poddano koekspresji (His-GB1-spDcp1 oraz spDcp2) w komórkach *E. coli* szczep BL21(DE3)pLysS. Z hodowanej przez noc kultury bakteryjnej pobrano 5 cm<sup>3</sup> i dodano do 1 dm<sup>3</sup> płynnej pożywki LB. Tak inokulowane LB wytrząsano w 37 °C dopóki OD<sub>600</sub> nie osiągnęło wartości 0,5. Wtedy obniżono temperaturę do 20 °C i komórki zaindukowano przez dodanie 1 cm<sup>3</sup> 1M roztworu IPTG. Bakterie wytrząsano w 20 °C przez 18 h.

Komórki zostały zwirowane (5000 rpm, 4 °C, 30 min) i zawieszono w buforze do lizy Dcp1/2. Następnie dodano lizozymu i poddano sonikacji (2 min w trybie pulsacyjnym, powtórzono 3-krotnie). Lizat po homogenizacji zwirowano (15000 rpm, 4 °C, 30 min) i dodano do złoża niklowego (GE Healthcare, 1,5 cm<sup>3</sup> objętości złoża na 1 dm<sup>3</sup> hodowli bakteryjnej). Następnie przez 1 h mieszano złożo z lizatem bakteryjnym. Zložo zawieszono na kolumnie i przepłukano dwukrotnie w buforze do lizy Dcp1/2. Białko zawieszono w buforze elucyjnym A i zebrano eluat. Procedurę powtórzono dla buforu elucyjnego B. Stężenie białka oszacowano spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, standardowy program do wyznaczania stężenia białka) i dodano DDT do końcowego stężenia 5 mM. Wstępnie oczyszczone białko poddano chromatografii wykluczania w systemie HPLC (Waters 625, Waters) używając kolumny półpreparatywnej (Sephadex 300, GE Healthcare) w buforze Dcp1/2, w systemie izokratycznym. Stężenie całkowitego białka wyznaczono metodą Bradforda oraz densytometrycznie (elektroforeza SDS PAGE), wykorzystując krzywą wzorcową wyznaczoną dla znanych stężeń BSA.

#### Wariant 2 (oczyszczanie prowadzone przez Autora w laboratorium prof. Pawła Golika)

Oczyszczanie prowadzono w taki sam sposób jak w Wariacie 1 jednakże lizat bakteryjny poddano oczyszczaniu na złożu niklowym (kartrydż chromatograficzny Bio-Scale Mini Nuvia IMAC, BioRad) używając FLPC (NGC Quest 10, BioRad) w systemie gradientowym opartym na buforze elucyjnym A. Wstępnie oczyszczone białko poddano chromatografii wykluczania w tym samym systemie FPLC używając kolumny półpreparatywnej (EnRich SEC 650, BioRad) w buforze Dcp1/2 w systemie izokratycznym.

### 3.3.1.2.4. SpDcp1

Posiadające znacznik heksahistydynowy białko SpDcp1, pochodzące z *S. pombe* poddano ekspresji w komórkach *E. coli* szczep BL21(DE3)pLysS. Z hodowanej przez noc kultury bakteryjnej pobrano 5 cm<sup>3</sup> i dodano do 1dm<sup>3</sup> płynnej pożywki LB. Tak inokulowane LB wytrząsano w 37 °C dopóki OD<sub>600</sub> nie osiągnęło wartości 0,5. Wtedy obniżono temperaturę do 20 °C i komórki zaindukowano przez dodanie 1 cm<sup>3</sup> 1M roztworu IPTG. Bakterie wytrząsano w 20 °C przez 18 godzin. Komórki zostały zwirowane (5000 rpm, 4 °C, 30 min) i zawieszono w buforze do lizy Dcp1. Następnie dodano lizozymu i poddano sonikacji (2 min w trybie pulsacyjnym, powtórzono 3-krotnie). Lizat po homogenizacji zwirowano (15000 rpm, 4 °C, 30 min) i dodano do złoża niklowego (1,2 cm<sup>3</sup> objętości złoża na 1 dm<sup>3</sup> hodowli bakteryjnej). Następnie przez 1 h mieszano złożo z lizatem bakteryjnym. Zložo zawieszono na kolumnie i przepłukano dwukrotnie buforem do płukania Dcp1. Białko wypłukano ze złoża buforze elucyjnym Dcp1 i zebrano eluat w dwóch frakcjach. Stężenie białka oszacowano spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, standardowy program do wyznaczania stężenia białka) i dodano DDT do końcowego stężenia 5 mM. Wstępnie oczyszczone białko poddano chromatografii HPLC używając kolumny półpreparatywnej (zložo typu Sephadex 300, GE Healthcare) w buforze Dcp1/2 w systemie izokratycznym. Stężenie całkowitego białka wyznaczono metodą Bradforda.

### 3.3.1.2.5. Domeny Dcp2 (ScDcp<sub>1-99</sub>, ScDcp<sub>100-245</sub>, SpDcp<sub>1-93</sub>, SpDcp<sub>94-243</sub>)

Posiadające znacznik heksahistydynowy białko poddano ekspresji w komórkach *E. coli* szczep BL21(DE3)pLysS. Podłoże LB (30 cm<sup>3</sup>) zostało inokulowane jedną kolonią bakteryjną i pozostawione na noc. Następnie pobrano 5 cm<sup>3</sup> tak przygotowanej hodowli i przeniesiono do 1 dm<sup>3</sup> pożywki LB. Gdy OD<sub>600</sub> osiągnęło wartość 0,5 (po ok 3-4 h) bakterie zaindukowano przez dodanie 1 cm<sup>3</sup> 1M IPTG i inkubowano w 20 °C przez 18 h. Komórki zostały zwirowane (4500 rpm, 4 °C, 20 min) i zawieszono w buforze PBS (30cm<sup>3</sup>/1dm<sup>3</sup> kultury bakteryjnej). Bakterie zwirowano ponownie (4000 rpm, 4 °C, 40 min) i zawieszono w buforze do lizy Dcp1. Następnie dodano lizozymu, poddano sonikacji (2 min w trybie pulsacyjnym, powtórzono 3-krotnie) i zwirowano (15000 rpm, 4 °C, 40 min). Supernatant dodano do złoża niklowego (1,33 cm<sup>3</sup> objętości złoża na 1 dm<sup>3</sup> hodowli bakteryjnej). Następnie przez 1 h mieszano złożo z lizatem bakteryjnym. Zložo zawieszono na kolumnie i przepłukano dwukrotnie buforem do płukania Dcp1. Białko zawieszono w buforze elucyjnym Dcp1 i zebrano eluat w dwóch frakcjach. Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). GB1 oraz znacznik histydynowy zostały usunięte poprzez trawienie proteazą TEV (stosunek molowy białko:proteaza 50:1), prowadzone przez 15 h w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór białka został zwirowany (4000 rpm, 4 °C, 10 min), zatężony na filtrze membranowym (Ultracel YM-10, Millipore) do objętości 2 cm<sup>3</sup> oraz poddany odsalaniu (kolumna odsalająca 10DG, Bio-Rad). Fragment odcięty przez proteazę TEV został związany przez ponowne przepuszczenie roztworu białka nad złożem niklowym używając buforu do lizy. Białko oczyszczono na FPLC (AKTA FPLC, GE Healthcare) używając kolumny do chromatografii wykluczania (Superdex Hiload600 75p, GE Healthcare) i buforu do krystalizacji w systemie izokratycznym. Roztwór białka zatężono do 4 cm<sup>3</sup> i wykorzystano do dalszych badań.

### 3.3.1.3. Przygotowanie białek znakowanych izotopowo do pomiarów NMR

Jeżeli nie zaznaczono inaczej wszystkie procedury odbywały się w temperaturze 4 °C. Wszystkie transformacje wykonano metodą chemiczną wykorzystując bakterie chemokompetentne. Jeżeli nie napisano inaczej wszystkie hodowle bakteryjne prowadzono na stałej lub płynnej pożywce LB przygotowanej w standardowy sposób.

#### 3.3.1.3.1. SpDcp2<sub>1-243</sub> (znakowanie <sup>2</sup>H oraz <sup>15</sup>N)

Posiadające znacznik heksahistydynowy białko SpDcp2, pochodzące z *S. pombe* poddano ekspresji w komórkach *E. coli* szczep BL21(DE3)pLysS. Podłoże LB (10 cm<sup>3</sup>) inokulowano jedną kolonią bakteryjną i pozostawiono na noc. Następnie pobrano 0,1 cm<sup>3</sup> tak przygotowanej hodowli i przeniesiono do nowej porcji (10 cm<sup>3</sup>) pożywki LB. Gdy OD<sub>600</sub> kultury osiągnęło wartość 0,5 pobrano 0,5 cm<sup>3</sup> kultury i przeniesiono do 50 cm<sup>3</sup> pożywki M9. Gdy OD<sub>600</sub> nowej kultury osiągnęło wartość 0,8 zawiesinę bakterii zwirowano (1200g, 10 min, 20 °C), zawieszono w 1 dm<sup>3</sup> pożywki M9 sporządzonej na bazie D<sub>2</sub>O a następnie inkubowano w 37 °C. Gdy OD<sub>600</sub> osiągnęło wartość 0,5 (po ok 15-18 h) bakterie zaindukowano przez dodanie 1 cm<sup>3</sup> 1M roztworu IPTG i inkubowano w 20 °C przez 18 h. Komórki zostały zwirowane (4500 rpm, 4 °C, 20 min) i zawieszono w buforze PBS (30cm<sup>3</sup>/1dm<sup>3</sup> kultury bakteryjnej). Bakterie zwirowano ponownie (4000 rpm, 4 °C, 40 min) i zawieszono w buforze do lizy Dcp1. Następnie dodano lizozymu, poddano sonikacji (2 min w trybie mieszanym, powtórzono 3-krotnie) i zwirowano (15000 rpm, 4 °C, 40 min). Supernatant dodano do złoża niklowego (1,5 cm<sup>3</sup> objętości złoża na 1 dm<sup>3</sup> hodowli bakteryjnej). Następnie przez 1 h mieszano złożo z lizatem bakteryjnym. Zložo zawieszono na kolumnie i przepłukano dwukrotnie w buforze do płukania Dcp1. Białko zawieszono w buforze elucyjnym Dcp1 i zebrano eluat w dwóch frakcjach. Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). Znacznik histydynowy oraz GB1 zostały usunięte poprzez trawienie proteazą TEV (stosunek białko: proteaza 50:1), prowadzone przez 15 h w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór białka został zwirowany (4000 rpm, 4 °C, 10 min), zatężony na filtrze membranowym (Ultracel YM-10, Millipore) do objętości 2 cm<sup>3</sup> oraz poddany odsalaniu (kolumna odsalająca 10DG, Bio-Rad). Białko oczyszczono na FPLC (AKTA FPLC, GE Healthcare) używając kolumny do chromatografii wykluczania (Superdex Hiload600 75p, GE Healthcare) i buforu NMR w systemie izokratycznym. Roztwór białka zatężono do 4 cm<sup>3</sup>, poddano wymianie buforu (kolumna odsalająca 10DG, Bio-Rad) na bufor NMR do miareczkowania nukleotydów i wykorzystano do pomiarów NMR

### 3.3.1.3.2. SpDcp2<sub>1-93</sub> (znakowanie <sup>15</sup>N)

Posiadające znacznik heksahistydynowy białko SpDcp2<sub>1-93</sub>, pochodzące z *S. pombe* poddano ekspresji w komórkach *E. coli* szczep BL21(DE3)pLysS. Podłoże LB (10 cm<sup>3</sup>) inokulowano jedną kolonią bakteryjną i pozostawiono na noc. Następnie pobrano 0,1 cm<sup>3</sup> tak przygotowanej hodowli i przeniesiono do nowej porcji (10 cm<sup>3</sup>) pożywki LB. Gdy OD<sub>600</sub> nowej kultury osiągnęło wartość 0,8 zawieszono bakterie zwirowano (1200g, 10 min, 20 °C), zawieszono w 1 dm<sup>3</sup> pożywki M9 sporządzonej na bazie H<sub>2</sub>O a następnie inkubowano w 37 °C. Gdy OD<sub>600</sub> osiągnęło wartość 0,5 (po ok 4-6 h) bakterie zaindukowano przez dodanie 1 cm<sup>3</sup> 1M IPTG i inkubowano w 20 °C przez 18 h. Komórki zostały zwirowane (4500 rpm, 4 °C, 20 min) i zawieszono w buforze PBS (30cm<sup>3</sup>/1dm<sup>3</sup> kultury bakteryjnej). Bakterie zwirowano ponownie (4000 rpm, 4 °C, 40 min) i zawieszono w buforze do lizy Dcp1. Następnie dodano lizozymu, poddano sonikacji (2 min w trybie mieszanym, powtórzono 3-krotnie) i zwirowano (15000 rpm, 4 °C, 40 min). Supernatant dodano do złoża niklowego (1,33 cm<sup>3</sup> objętości złoża na 1 dm<sup>3</sup> hodowli bakteryjnej). Następnie przez 1 h mieszano złożo z lizatem bakteryjnym. Zložo zawieszono na kolumnie i przepłukano dwukrotnie w buforze do płukania Dcp1. Białko zawieszono w buforze elucyjnym Dcp1 i zebrano eluat w dwóch frakcjach. Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). GB1 oraz znacznik histydynowy zostały usunięte poprzez trawienie proteazą TEV (stosunek białko:proteaza 50:1), prowadzone przez 15 h w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór białka został zwirowany (4000 rpm, 4 °C, 10 min), zatężony na filtrze membranowym (Ultracel YM-10, Millipore) do objętości 2 cm<sup>3</sup> oraz poddany odsalaniu (kolumna odsalająca 10DG, Bio-Rad). Fragment odcięty przez proteazę TEV został związany przez ponowne przepuszczenie roztworu białka nad złożem niklowym używając buforu do lizy. Białko oczyszczono na FPLC (AKTA FPLC, GE Healthcare) używając kolumny do chromatografii wykluczania (Superdex Hiload600 75p, GE Healthcare) i buforu NMR w systemie izokratycznym. Roztwór białka zatężono do 4 cm<sup>3</sup>, poddano wymianie buforu (kolumna odsalająca 10DG, Bio-Rad) na bufor NMR do miareczkowania nukleotydów i wykorzystano do pomiarów NMR.

### 3.3.1.3.3. SpDcp2<sub>94-243</sub> (znakowanie <sup>15</sup>N)

Przygotowano według tej samej procedury co SpDcp2<sub>1-93</sub>

### 3.3.1.4. Synteza krótkich transkryptów RNA znakowanych radioaktywnie *in vitro*

Kapowane transkrypty RNA otrzymano na drodze transkrypcji *in vitro* z plazmidu *pluc-A60* trawionego enzymem *NcoI*. Uzyskano w ten sposób kapowane RNA odpowiadające pierwszym 48 nt mRNA kodującego lucyferazę świetlika *Photinus pyralis*. Wszystkie oligonukleotydy otrzymano w obecności danego analogu kapu oraz (w przypadku transkryptów bezpośrednio znakowanych radioaktywnie) 10 μCi/μl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP (Perkin-Elmer) używając stosowanej wcześniej procedury. Typowa reakcja transkrypcji *in vitro* zawierała w 0,2 cm<sup>3</sup>, 40 mM Tris-HCl (pH 7,9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 2 mM spermidyny, 2 mg BSA, 0,2-1,0 mg matrycy DNA, 20 U Ribolock Ribonuclease Inhibitor (Thermo Scientific), 0,5 mM ATP/CTP/UTP, 0,1 mM GTP, 0,5 mM odpowiedniego analogu kapu (stosunek molowy analog kapu: GTP wynosił 5:1) oraz 20 U polimerazy T7. Po zakończeniu reakcji transkrypcji mieszaninę potraktowano 3U DNazy RQ1 (Promega) przez 30 min w temperaturze 37 °C. Następnie mieszaninę reakcyjną poddano ekstrakcji w układzie fenol/chloroform, a transkrypty RNA oczyszczono z małowzrostekowych zanieczyszczeń używając jednorazowych kolumn NucAway (Ambion) zgodnie ze standardową procedurą wirowania. Stężenie RNA wyznaczono spektrofotometrycznie (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific) a jego homogeniczność za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym z dodatkiem formaldehydu. Stężenie RNA radioaktywnego wyznaczono poprzez pomiar promieniowania Czerenkowa w liczniku scyntylicacji (Beckman).

### 3.3.2. Pomiary spektroskopowe białek

#### 3.3.2.1. Spektroskopia fluorescencyjna

Pomiary fluorescencji przeprowadzono na spektrofluorymetrze LS-50B (Perkin-Elmer) w kuwetach kwarcowych (Hellma) o drogach optycznych długości 4 mm dla absorpcji i 10 mm dla emisji.

Miareczkowania Mant-m<sup>7</sup>GpppG przeprowadzono w 50 mM buforze Hepes/KOH (pH 7,2), 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA i 1 mM DTT w temperaturze 20 °C przez dodawanie odpowiednich ilości roztworów eIF4E do 100 nM roztworów Mant-m<sup>7</sup>GpppG lub MantOMe.

Pomiary kinetyczne DcpS przeprowadzono w 50 mM buforze Tris/HCl, 200 mM KCl, 0,5 mM EDTA i 1 mM DTT (pH 7,2) w temperaturze 20 °C. Reakcje zostały zainicjowane przez dodanie 20 lub 200 nM DcpS. Próbkę wzbudzano przy 260 nm lub 361 nm a zmiany intensywności fluorescencji były mierzone odpowiednio przy 360 lub 446 nm, w zależności od tego czy substratem był m<sup>7</sup>GpppG lub Mant-m<sup>7</sup>GpppG.

##### 3.3.2.1.1. Wyznaczanie stałych dysocjacji do białek eIF4E i DcpS

*(pomiar wykonany przez dr Joannę Żuberek oraz mgr. Katarzynę Wnętek)*

Pomiary przeprowadzono na spektrofluorymetrze LS-50B (Perkin Elmer Co.) w kuwecie kwarcowej (Hellma) o długości drogi optycznej 4 mm dla absorpcji i 10 mm dla emisji w 50 mM buforze Hepes/KOH (pH 7,2), 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA i 1 mM DTT w temperaturze 20 °C. Do roztworu białka o stężeniu 0,1 μM dodawano określony analog kapu do uzyskania zadanego stężenia z zakresu 2 μM – 5000 μM. Zmiany natężenia fluorescencji rejestrowano dla fali o długości 337 nm (rozmiar szczeliny 2,5-4,0 nm) dla wzbudzenia przy 280 nm (rozmiar szczeliny 2,5 nm). Intensywność fluorescencji skorygowano na czynnik rozcieńczenia, efekt filtra wewnętrznego oraz zmianę absorpcji pochodzącą od dodawanego nukleotydu. Wartości  $K_{AS}$  otrzymano z dopasowania danych doświadczalnych do teoretycznych krzywych natężenia fluorescencji, w funkcji całkowitego stężenia ligandu. Dopasowania przeprowadzono przy użyciu programu Origin 8 (Origin Lab) przy użyciu algorytmu Levenberga-Marquardta.

#### 3.3.2.2. Spektroskopia dichroizmu kołowego kompleksu SpDcp1/2

Wszystkie pomiary wykonano przy użyciu spektrometru dichroizmu kołowego Chirascan CD (Applied Photophysics) w temperaturze 25 °C. Widma w bliskim ultrafiolecie (250-350 nm) rejestrowano w kuwecie o długości drogi optycznej 10 mm natomiast widma w dalekim ultrafiolecie (200-250 nm) rejestrowano w kuwecie o długości drogi optycznej 1 mm. Do roztworu SpDcp1/2 o stężeniu 5 μM w odgazowanym buforze do elucji Dcp1/2 dodawano odpowiedni analog kapu do zadanego stężenia. Widma wolnych analogów kapu rejestrowano w tym samym buforze. Otrzymane widma były dalej analizowane i obrabiane przy wykorzystaniu oprogramowania dostarczonego przez producenta.

#### 3.3.2.3. Spektroskopia NMR kompleksu SpDcp1/2

Odpowiednie białko (250-400 μM) rozpuszczone w buforze NMR do miareczkowań przeniesiono do próbki NMR (Shigemi Inc.). Wszystkie pomiary prowadzono w temperaturze 25 °C w objętości 0,5 cm<sup>3</sup>. Miareczkowania prowadzono przez jednoczesne dodanie zadanej ilości nukleotydu i 2 equiv. MgCl<sub>2</sub>. Nukleotyd został wcześniej rozpuszczony w wodzie MQ by końcowe stężenie wyniosło 50 mM, tak powstały roztwór przefiltowano i użyto do pomiarów. Widma zostały zarejestrowane na spektrometrze Bruker Avance 800 MHz wyposażonym w sondę kriogeniczną. Pomiary dla domeny regulatorowej wykonano przy stężeniu białko 250 μM natomiast pomiary dla domeny katalitycznej wykonano przy stężeniu 360 μM. Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone używając tej samej sekwencji pulsów (standardowa sekwencja stosowana w rejestracji widm 2D <sup>15</sup>N HSQC dostarczona przez producenta). W każdym przypadku wykonywano 512 skanów dla częstości <sup>1</sup>H oraz <sup>15</sup>N. Otrzymane dane zostały obrobione w pakiecie obliczeniowym NMRPipe. Uzyskane widma były analizowane i wizualizowane w programie



Sparky (wersja 3.114). Zbiornicze zmiany przesunięcia chemicznego obliczono na podstawie następującego wzoru:

$$\delta_{obs} = \sqrt{(\delta H_{apo} - \delta H_{bound})^2 + \left(\frac{\delta N_{apo} - \delta N_{bound}}{5}\right)^2} \quad \text{Rów. 3.4}$$

Wyznaczone przesunięcia chemiczne wykorzystano do wyznaczenia stałych dysocjacji  $K_D$  na podstawie poniższego równania:

$$\delta_{obs} = \delta_{max} \frac{(K_D + [L]_0 + [P]_0) - \sqrt{(K_D + [L]_0 + [P]_0)^2 - 4[P]_0[L]_0}}{2[P]_0} \quad \text{Rów. 3.5}$$

gdzie  $[L]_0$  to stężenie liganda,  $[P]_0$  to stężenie białka a  $\Delta_{max}$  oznacza maksymalną zmianę przesunięcia chemicznego. Dopasowania przeprowadzono w programie SigmaPlot (wersja 11.0, Systat Software. Inc).

### 3.3.3. Badania enzymatyczne

#### 3.3.3.1. Pomiary odporności na degradację enzymatyczną

##### 3.3.3.1.1. Degradacja analogów kapu przez DcpS

Reakcję prowadzono w buforze DcpS w temperaturze 30 °C przy stężeniu badanych związków 40 μM a enzymu 0,2 μM. W odpowiednich punktach czasowych (0, 10, 60, 180 min) pobierano próbkę 100 μl a reakcję zatrzymywano albo przez inaktywację termiczną (95 °C, 2 min) albo (w przypadku związków wrażliwych na ogrzewanie) przez zamrożenie w ciekłym azocie. Inaktywowane próbki wirowano (14000 rpm, 20 min) a następnie badano za pomocą analitycznego RP HPLC używając liniowego gradientu 0-50% metanolu w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,0) i detekcją UV.

##### 3.3.3.1.2. Degradacja analogów kapu przez Dcp1/2

Reakcję prowadzono w buforze do badań degradacji analogów kapu Dcp1/2 w temperaturze 37 °C przy stężeniu badanych związków 10 μM a enzymu 0,5 μM. W odpowiednich punktach czasowych pobierano próbkę a reakcję zatrzymywano przez dezaktywację termiczną (95 °C, 2 min) albo (w przypadku związków wrażliwych na ogrzewanie) przez zamrożenie w ciekłym azocie. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP HPLC używając liniowego gradientu 0-50% metanolu w 0.1 M buforze fosforanowym (pH 7,0) i detekcją UV.

##### 3.3.3.1.3. Stabilności analogów kapu w roztworze FBS

Przygotowano roztwory wyjściowe badanych związków o stężeniu 1 mM w wodzie dejonizowanej. Mieszaninę reakcyjną sporządzono przez wymieszanie 50 μl odpowiedniego roztworu wyjściowego, 750 μl buforu PBS i 100 μl FBS w próbce, tak aby końcowe stężenie FBS wyniosło 10%. Reakcja była inkubowana w 37 °C i w odpowiednich punktach czasowych pobierano 100 μl próbki i dezaktywowano termicznie (95 °C, 4 min). Próbki badano na analitycznym RP HPLC używając liniowego gradientu używając liniowego gradientu 0-50% metanolu w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,0) i detekcją UV. Konwersja substratu została obliczona za pomocą następującego równania:

$$S_{conv} = \frac{A_p}{A_p + A_s} \quad \text{Rów. 3.6}$$

gdzie  $A_p$  i  $A_s$  to powierzchnie pod pikami odpowiednio produktu oraz substratu na chromatogramie HPLC. Do zmian konwersji substratu w funkcji czasu dopasowano funkcje monowykładniczą na podstawie której wyznaczono czasy półtrwania związków. Dopasowania przeprowadzono w programie SigmaPlot (wersja 11.0, Systat Software. Inc).

### 3.3.3.1.4. Reakcji dekapingu prowadzona przez SpDcp2

Kapowane transkrypty znakowane izotopem  $^{32}\text{P}$  poddano trawieniu przy użyciu SpDcp1/2 w temperaturze  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 30 min w buforze kinetycznym Dcp2. Reakcje zakończono przez dodanie dwóch objętości Precipitation/Inactivation Buffer 3 (Life Technologies). Transkrypty poddano całkowitej precypitacji w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i strącono przez wirowanie ( $13000\text{ g}$ , 20 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), oczyszczono przez płukanie 70% etanolem i strącono ponownie przez wirowanie ( $9000\text{ g}$ , 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ilość uzyskanego RNA wyznaczono przez pomiar promieniowania Czerenkowa w liczniku scyntytacji (Beckman). Próbki zostały rozpuszczone w Sequencing Gel Loading Buffer (Life Technologies) i zdenaturowane w temperaturze  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 5 min. Elektroforezę SDS PAGE prowadzono na żelu sekwencyjnym RNA (10% poliakrylamid) w warunkach denaturujących (6 M mocznik) przez 3,5h przy mocy 45-70W używając aparatu Base Runner Nucleic Acid Sequencer (International Biotechnologies). Żele utrwalano w 5% kwasie octowym, 5% metanolu przez 10-15 min, wysuszono na papierze filtracyjnym Whatman 3MM (Fischer Scientific) i wystawiono na ekspozycję stosując film fotograficzny Blue X-ray (Kodak). Intensywność poszczególnych prążków została wyznaczona poprzez analizę zeskanowanych filmów używając programu QuantityOne (BioRad).

### 3.3.3.2. Poszukiwanie inhibitorów SpDcp1/2

Kapowane transkrypty zawierające  $m_2^{7,3\text{'-}O}\text{GpppG}$  zostały poddane trawieniu przy użyciu SpDcp1/2 według analogicznej procedury jak w paragrafie *Pomiary dekapingu*, używając buforu kinetycznego Dcp2 z dodatkiem 0,2 mM odpowiedniego inhibitora. Po upływie zadanego czasu pobierano próbki z mieszaniny reakcyjnej i postępowano z nimi analogicznie jak w wymienionym paragrafie. Dane densytometryczne zostały wykorzystane do wyznaczenia stopnia przereagowania substratu w funkcji czasu a na potrzeby opisu wydajności inhibicji wprowadzono parametr procentu inhibicji,  $\%_{inhibition}$ , który został zdefiniowany w następujący sposób:

$$\%_{inhibition} = \frac{RNA_{deg} - RNA_{deg+Inh}}{RNA_{deg}} * 100\% \quad \text{Rów. 3.7}$$

gdzie  $RNA_{deg}$  oznacza frakcję transkryptów ze zdegradowanym kapem pod nieobecność inhibitora natomiast  $RNA_{deg+inh}$  oznacza frakcję transkryptów ze zdegradowanym kapem po dodaniu inhibitora. Wartości P w teście t-Studenta przeprowadzono w programie SigmaPlot (wersja 11.0, Systat Software. Inc).

### 3.3.3.3. Kinetyka inhibicji SpDcp1/2 w przybliżeniu Michaelisa-Menten

Kapowane transkrypty zawierające  $m_2^{7,3\text{'-}O}\text{GpppG}$  zostały poddane trawieniu przy użyciu SpDcp1/2 według analogicznej procedury jak w paragrafie *Pomiary dekapingu*, używając buforu kinetycznego Dcp2. Próbki pobierane były w następujących punktach czasowych: 0, 90, 180, 270, 360, 450, 540 s. Próbki przenoszono natychmiast do Sequencing Gel Loading Buffer (Life Technologies) by zatrzymać reakcję. Następnie były denaturowane w  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 5 min. Radioaktywność RNA wyznaczono przez pomiar promieniowania Czerenkowa w liczniku scyntytacji (Beckman). Elektroforezę SDS PAGE prowadzono na żelu sekwencyjnym RNA (16% poliakrylamid) w warunkach denaturujących (6 M mocznik) przez 8-10 h przy mocy 45-70W używając aparatu Base Runner Nucleic Acid Sequencer (International Biotechnologies). Żele od razu wysuszono na papierze filtracyjnym Whatman 3MM (Fischer Scientific). Radioaktywność została oznaczona ilościowo poprzez ekran fosforanowy odczytywany na skanerze laserowym (GE Healthcare) wykorzystując program ImageQuant (wersja 7.0, GE Healthcare). Uzyskane dane o postępie reakcji dopasowano do funkcji monowykładniczej:

$$A = A_0 \exp[-kt] \quad \text{Rów. 3.8}$$

Uzyskane w ten sposób stałe kinetyczne  $k$  wykorzystano do wyznaczenia szybkości początkowych, które zostały dopasowane do równania Michaelis-Menten:

$$V = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Rów. 3.9

Na tej podstawie wyznaczono stałą Michealisa  $K_m$  oraz szybkość maksymalną  $V_{max}$  dla reakcji prowadzonych pod nieobecność inhibitora. Dopasowania przeprowadzono w programie KaleidaGraph (wersja 3.5, Synergy Software. Inc).

#### 3.3.3.4. Kinetyka inhibicji SpDcp1/2 w przybliżeniu pojedynczego obrotu

(pomiaru przeprowadzone przez Jeffreya Mudbridge, University of California, San Francisco)

##### Podstawowe procedury:

RNA posiadające znakowany radioaktywnie kap uzyskano z oczyszczonych transkryptów 29 nt RNA otrzymanych w reakcji transkrypcji *in vitro* prowadzonej przy użyciu polimerazy T7. Kapowanie przeprowadzono wykorzystując [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP (Perkin-Elmer), rekombinowaną transferazę guanylową z wirusa *Vaccinia* sp. w obecności S-adenozyl metioniny. Otrzymane w ten sposób transkrypty oczyszczono poprzez elektroforezę SDS PAGE w warunkach denaturujących i wykorzystano w pomiarach kinetycznych.

SpDcp1/2<sub>1-243</sub> lub SpDcp2<sub>1-243</sub> oraz inhibitor zmieszano w 3-krotnym zateżeniu w 60  $\mu$ l buforu kinetycznego. Reakcja dekapingu była inicjowana przez dodanie 30  $\mu$ l przygotowanego wcześniej znakowanego radioaktywnie izotopem  $^{32}$ P substratu w 1,5-krotnym zateżeniu w buforze kinetycznym tak aby końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wyniosła 90  $\mu$ l. Końcowe stężenie enzymu było w zakresie 0,8-25,0  $\mu$ M, stężenia inhibitora były zawarte w zakresie 0,03-1,00 mM natomiast stężenie substratu nie przekraczało 100 pM. W odpowiednich punktach czasowych reakcja była hamowana przez dodanie nadmiaru EDTA a RNA było oddzielane od produktu reakcji ( $m^7$ GDP) na płycie chromatograficznej. Frakcje transkryptów posiadających lub pozbawionych struktury kapu były wyznaczane z użyciem skanera (Typhoon scanner, GE) oraz programu ImageQuant (GE Healthcare). Stosunek produktu do substratu w funkcji czasu był dopasowany do funkcji monowkładniczej by wyznaczyć obserwowalne stałe szybkości  $k_{obs}$ . Zmiany  $k_{obs}$  w funkcji stężenia enzymu były dopasowane do równania Michaelisa-Menten  $k_{obs} = k_{max}[E] / K_M + [E]$  w celu wyznaczenia parametrów  $k_{max}$  oraz  $K_M$

##### Wyznaczenie parametrów kinetycznych inhibicji z udziałem $m^7$ Gp<sub>s</sub>ppp<sub>s</sub> $m^7$ G D3:

Parametry  $K_M^{app}$  oraz  $k_{max}$  wyznaczono pierwotnie dla SpDcp1/2 oraz Dcp2 w obecności różnych stężeń badanego inhibitora co pozwoliło na ustalenie typu inhibicji. Badając kinetykę reakcji z użyciem opisanego wcześniej znakowanego radioaktywnie substratu wyznaczono stałą  $K_1$  oraz określono typ inhibicji jako mieszany. Wszystkie dopasowania przeprowadzono w programie SigmaPlot (wersja 11.0, Systat Software. Inc).

### 3.3.4. Badania wydajności translacji

#### 3.3.4.1. Wydajność translacji kapowanego mRNA lucyferazy w RRL w układzie *in vitro*

(pomiaru wykonane przez dr Macieja Łukaszewicza)

Kapowane i poliadenylowane transkrypty mRNA lucyferazy otrzymano na drodze transkrypcji *in vitro* matrycy dsDNA zawierającego sekwencję promotorową dla polimerazy RNA SP6, sekwencję 5' UTR króliczej  $\beta$ -globiny, kompletną ORF lucyferazy świetlika oraz sekwencję 31 adenozyń. Każda mieszanina do transkrypcji *in vitro* zawierała SP6 transcription buffer (Thermo Scientific), 0,7  $\mu$ g matrycy DNA, 1 U ml<sup>-1</sup> Ribolock Ribonuclease Inhibitor (Thermo Scientific), 0,5 mM ATP/CTP/UTP, 0,1 mM GTP oraz 0,5 mM odpowiedniego analogu kapu (stosunek molowy analog kapu: GTP wynosił 5:1). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37 °C przez 5 minut, następnie dodano polimerazę SP6, a mieszaninę pozostawiono na 45 min w temperaturze 37 °C. Następnie mieszaniny reakcyjne traktowano DNazą RQ1 (Promega) w stężeniu 1 U · 1  $\mu$ g<sup>-1</sup> matrycy DNA. Reakcję prowadzono w tym samym buforze transkrypcyjnym przez 20 min w temperaturze 37 °C. następnie transkrypty RNA oczyszczono z małowcząsteczkowych zanieczyszczeń używając jednorazowych kolumn NucAway (Ambion) zgodnie ze standardową procedurą wirowania. Jakość transkryptów oceniono w 1% żelu agarozowym, a stężenie wyznaczono poprzez pomiar absorbancji. Reakcje translacji w RRL przeprowadzono w objętości 10 ml przez 1h

w warunkach optymalnych dla zależnej od kapu translacji. Mieszanina reakcyjna zawierała 40% RRL, mieszaninę aminokwasów (0,01 M), MgCl<sub>2</sub> (1,2 mM), octan potasu (0,17 mM) oraz kapowane transkrypty RNA. Dla każdego badanego związku zbadano cztery różne stężenia transkryptów. Aktywność otrzymanej lucyferazy zmierzono w luminimetrze (Glomax, Promega) a otrzymane dane analizowano w programie Origin 8 (Origin Lab).

### 3.3.4.2. Inhibicja translacji kapowanego mRNA lucyferazy w RRL w układzie *in vitro* (pomiar wykonany przez dr Macieja Łukaszewicza)

Wykorzystano procedurę opisaną w paragrafie *Wydajność translacji kapowanego mRNA lucyferazy w RRL w układzie in vitro* z niewielkimi modyfikacjami.

#### **Eksperyment A.**

Do mieszaniny reakcyjnej dodano m<sub>2</sub><sup>7,3<sup>3</sup>-O</sup>GpppG-5'UTRβglob-LUC mRNA w stężeniu 5 ug · cm<sup>-3</sup> wraz z badanym analogiem kapu w zadanym stężeniu. Mieszaninę reakcyjną preinkubowano w 30 °C przez 1 h przed dodaniem mRNA i inhibitora. Reakcję zatrzymano po 1 h przez ochłodzenie do 0 °C i zmierzono aktywność lucyferazy.

#### **Eksperyment B**

Przeprowadzono analogicznie jak Eksperyment A jednakże analog kapu został dodany na początku eksperymentu (1 h przed dodaniem mRNA).

### 3.3.5. Inne badania biochemiczne

#### 3.3.5.1. Pomiar DLS

SpDcp1/2 rozcieńczono do stężenia 1,9 μM w buforze do elucji Dcp1/2. Do tak przygotowanego roztworu białka dodawano odpowiednią ilość analogu kapu rozpuszczonego w wodzie mQ. Roztwory analogu kapu zostały zwirowane (15000 rpm, 2 min, 4 °C) przed użyciem. Po dodaniu analogu kapu do próbki była ono wirowana powtórnie (15000 rpm, 2 min, 4 °C) a supernatant został przeniesiony do kuwety pomiarowej. Dane zostały zebrane przy użyciu DynaPro® NanoStar™ (Wyatt Technologies) wyposażonego w laser działający przy długości fali 655 nm ze stabilizowaną termicznie komorą, pomiary wykonano w temperaturze 25 °C. Czas zbierania danych dla każdego pomiaru ustawiono na 10 s a każdy eksperyment składał się z 40-80 pomiarów. Funkcja autokorelacji sygnału mierzono przez wielokanałowy cyfrowy korelator. Następnie funkcja autokorelacji o znormalizowanej intensywności poddano obróbce używając metody regularyzacji korzystając z oprogramowania dostarczonego przez producenta (Dynamics V7.17.16, Wyatt Technologies). Uzyskano w ten sposób informacje o rozkładzie funkcji zaniku wykładniczego z czasem zaniku  $\Gamma$ . Wartości translacyjnego współczynnika dyfuzji ( $D_t$ ) wyznaczono używając relacji  $\Gamma = D_t q^2$  gdzie  $q$  jest wektorem rozpraszania. Promień hydrodynamiczny  $R_h$  wyznaczono na podstawie  $D_t$  posługując się równaniem Stokesa-Einsteina:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_t} \quad \text{Rów. 3.10}$$

gdzie  $k_B$  jest stałą Boltzmanna a  $\eta$  lepkością rozpuszczalnika w temperaturze  $T$ . Rozkład wartości  $R_h$  wyznaczono na podstawie rozkładu intensywności rozpraszania wykorzystując uproszczoną postać równania Rayleigha.

#### 3.3.5.2. Krystalizacja kompleksów Dcp2 z nukleotydami

Oczyszczone białka rozpuszczone w buforze do krystalizacji Dcp2 zatężono do 850 μM i użyto do badań przesiewowych nad warunkami krystalizacji. Wykorzystano następujące komercyjnie dostępne zestawy: Cation Screen, PEG suite 1, PEG suite 2, JCSG<sup>+</sup> (Qiagen) oraz Crystal Screen, Index solution, INDEX (Hampton Research). Badania przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych wykorzystując robota krystalograficznego Mosquito LCP (TTP Labtech). Płytki inkubowano w 18 °C przez noc lub dłużej a kryształy wyszukiwano używając

mikroskopu świetlnego. W niektórych przypadkach kryształy obserwowano dodatkowo pod mikroskopem fluorescencyjnym. Po znalezieniu warunków, w których obserwowano wzrost kryształów przeprowadzono dokładniejszą optymalizację na większych płytkach 24-dołkowych ze smarem silikonowym. Do przygotowania roztworów do krystalizacji wykorzystano komercyjnie dostępne składniki pochodzące z zestawów do krystalizacji (Qiagen, Hampton Research) lub zostały one przyrządzone z komercyjnie dostępnych odczynników (Sigma Aldrich, Fischer Scientific).

### **3.3.5.3. Wizualizacja i analiza struktur makrocząsteczek**

Pliki zawierające informacje strukturalne pobrano z bazy RSCB PDB. Ilustracje oraz analizy struktur białkowych wykonano używając programu UCSF Chimera (wersja 1.9) lub Pymol (wersja edukacyjna).

# Wykaz publikacji powstałych w czasie realizacji projektu doktorskiego:

## 7.1. Publikacje w międzynarodowych czasopismach z Listy Filadelfijskiej:

1. Ziemiak M, J.S. Mudridge, J. Kowalska, R.E. Rhoads, J. D. Gross, J. Jemielity. 2015. **Twoheaded tetraphosphate cap analogs are inhibitors of the Dcp1/2 RNA decapping complex.** *RNA* (zaakceptowane do publikacji)
2. Ziemiak M, J. Kowalska, J. Zuberek, M. Lukaszewicz, K. Wnek, J. Jemielity. 2015. **Phosphate modified analogues of m7GTP and m7Gppppm7G – synthesis and biochemical properties.** *Bioorg Med Chem* 23(17): 5369–5381
3. J. Kowalska, A. Wypijewska del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Strenkowska, M. Ziemiak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin, J. Jemielity. 2014. **Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes.** *Nucleic Acids Res.* 42: 10245-10264
4. Ziemiak, M., M. Szabelski, M. Lukaszewicz, A. Nowicka, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, Z. Wieczorek, J. Jemielity. 2013. **Synthesis and evaluation of fluorescent cap analogues for mRNA labelling.** *RSC Advances* 3: 20943-20958
5. Ziemiak, M., S. Malwina, J. Kowalska, J. Jemielity. 2013. **Potential therapeutic applications of RNA cap analogs.** *Future Med Chem* 5(10): 1141-72
6. Su, W., S. V. Slepnev, M. K. Slevin, S. M. Lyons, M. Ziemiak, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, W. F. Marzluff, R. E. Rhoads. 2013. **mRNAs containing the histone 3' stem-loop are degraded primarily by decapping mediated by oligouridylation of the 3' end.** *RNA* 19 (1):1-16.
7. Strenkowska, M., P. Wanat, M. Ziemiak, J. Jemielity, J. Kowalska. 2012. **Preparation of synthetically challenging nucleotides using cyanoethyl P-imidazolides and microwaves.** *Org Lett* 14 (18):4782-4785.

## 7.2. Publikacje konferencyjne:

1. M. Ziemiak, J. Mudridge, J. Kowalska, R.E Rhoads, J. D. Gross, J. Jemielity. 2015. **Tetraphosphate cap analogues modified in polyphosphate bridge are inhibitors of Dcp1/2 decapping complex.** *FEBS J.* 282: 129-129
2. M. Ziemiak, J. Mudridge, J. Kowalska, A. Stelmachowska, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. D. Gross, R.E Rhoads, J. Jemielity. 2014. **Utility of chemically modified cap analogues in studying Dcp1/2 decapping complex mechanism of action.** edited by M. Hocek. Vol. 12. Prague: Acad Sci Czech Republic, Inst Organic Chem & Biochemistry
3. M Ziemiak, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity. 2011 **Dinucleotide cap analogs bearing bridging and non-bridging modifications within tetraphosphate chain.** edited by M. Hocek. Vol. 11. Prague: Acad Sci Czech Republic, Inst Organic Chem & Biochemistry.

## 7.3. Wystąpienia ustne na konferencjach:

1. M. Ziemiak, J.S. Mudridge, J. Kowalska, R.E Rhoads, J. D. Gross, J. Jemielity **Tetraphosphate cap analogues modified in polyphosphate bridge are inhibitors of Dcp1/2 decapping complex**, 40th FEBS Congress, Berlin, Niemcy (2015)
2. M. Ziemiak, J. Mudridge, J. Kowalska, A. Stelmachowska, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. D. Gross, R.E Rhoads, J. Jemielity. **Utility of chemically modified cap analogues in studying Dcp1/2 decapping complex mechanism of action**, XVIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Cesky Krumlov, Czechy (2014)
3. M. Ziemiak, M. Szabelski, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, Z. Wieczorek, J. Jemielity **Interactions of chemically modified cap analogues with yeast decapping complex Dcp1/2**, Chemistry for Life Sciences 5th European Conference, Barcelona, Hiszpania (2013)
4. M. Ziemiak, M. Szabelski, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, Z. Wieczorek, J. Jemielity **Wykorzystanie modyfikowanych chemicznie nukleotydów do badań białek oddziałujących z mRNA kapem**, 2nd Student Biotechnology Symposium SYMBIOSIS, Warszawa, Polska (2013)

5. M. Ziemniak, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity **Modyfikowane chemicznie trifosforany 7-metyloguanozyny jako inhibitory biosyntezy białka**, 53th Meeting of Polish Chemical Society, Gliwice, Polska (2010)

#### 7.4. Plakaty prezentowane na konferencjach:

1. M. Ziemniak, J.S. Mugridge, J Kowalska, J. D. Gross, R. E. Rhoads , J. Jemielity. **5' mRNA cap analogues – tools for studies on mRNA degradation**, International Symposium on Therapeutic Nucleic Acids, Łódź, Polska (2015)
2. M. Ziemniak, J.S. Mugridge, J Kowalska, J. D. Gross, R. E. Rhoads , J. Jemielity. **Tetrafosforanowe analogi kapu modyfikowane w mostku fosforanowym są inhibitorami kompleksu enzymatycznego Dcp1/2**, 58th Meeting of Polish Chemical Society, Gdansk, Polska (2015)
3. **M. Ziemniak, J.S. Mugridge, J Kowalska, J. D. Gross, R. E. Rhoads , J. Jemielity. Tetraphosphate cap analogues modified in polyphosphate bridge are inhibitors of Dcp1/2 complex**, EMBO Young Scientist Forum, Warszawa, Polska (2015)
4. M. Ziemniak, J. Mugridge, J Kowalska, J. D. Gross, R. E. Rhoads , J. Jemielity. **Modyfikowane analogi kapu w badaniach strukturalnych nad kompleksem enzymatycznym Dcp1/2**, 57th Meeting of Polish Chemical Society, Częstochowa, Polska (2014)
5. M. Ziemniak, J. Mugridge, J Kowalska, J. D. Gross, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads , J. Jemielity. **Modified cap analogues as tools in biochemical studies on Dcp1/2 decapping complex**, XXI Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Poznań, Poland (2014)
6. M. Ziemniak, J. Zuberek, A. Stelmachowska, A. Antosiewicz, J Kowalska, R.E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, **Synthesis of thiophosphate analogues of 5' mRNA cap analogues and their applicability to biophysical research on Dcp1/2 protein complex**, 56th Meeting of Polish Chemical Society, Siedlce, Polska (2013)
7. M. Ziemniak, M. Szabelski, M. Lukaszewicz, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, Z. Wieczorek, J. Jemielity, **Fluorescent Cap Analogues for mRNA labelling**, XX International Roundtable on Nucleosides and Nucleic Acids, Montreal, Kanada (2012)
8. M. Ziemniak, J. Kowalska, P. Wanat, J. Zuberek, M. Lukaszewicz, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, **Chemically modified cap analogues as versatile tools in investigation of Dcp1/2 catalytic mechanism**, Multi-Pole Approach to Structural Biology, Warszawa, Polska (2011)
9. M. Ziemniak, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity **Dinucleotide cap analogues bearing bridging and nonbridging modifications within tetraphosphate chain**, XVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Cesky Krumlov, Czech y (2011)
10. M. Ziemniak, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, **7-methylguanosine 5'-triphosphate analogues modified in the triphosphate chain as new inhibitors of cap-dependent translation**, International Symposium on Therapeutic Nucleic Acids, Łódź, Polska (2010)

# BIBLIOGRAFIA:

1. D. L. Nelson, A. L. Lehninger and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Macmillan, 2008.
2. E. Lescrinier, M. Froeyen and P. Herdewijn, *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 2975-2989.
3. B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 5th edn., 2008.
4. T. Abramova, *Molecules*, 2013, 18, 1063-1075.
5. P. Merino, *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*, John Wiley & Sons, 2013.
6. D. C. Johnson, 2nd and T. S. Widlanski, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2004, Chapter 13, Unit 13.11.
7. M. Yoshikawa, T. Kato and T. Takenishi, *Tetrahedron Letters*, 1967, 8, 5065-5068.
8. J. Ludwig and F. Eckstein, *The Journal of Organic Chemistry*, 1989, 54, 631-635.
9. S. Warnecke and C. Meier, *The Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74, 3024-3030.
10. H. Gold, P. van Delft, N. Meeuwenoord, J. D. Codée, D. V. Filippov, G. Eggink, H. S. Overkleeft and G. A. van der Marel, *The Journal of Organic Chemistry*, 2008, 73, 9458-9460.
11. S. Mohamady and S. D. Taylor, *Organic Letters*, 2013, 15, 2612-2615.
12. S. Mohamady and S. D. Taylor, *The Journal of Organic Chemistry*, 2014, 79, 2308-2313.
13. A. C. Hengge and I. Onyido, *Current Organic Chemistry*, 2005, 9, 61-74.
14. G. R. Thatcher and R. Kluger, *Advances in Physical Organic Chemistry*, 1989, 25, 99-265.
15. G. R. Thatcher and A. S. Campbell, *The Journal of Organic Chemistry*, 1993, 58, 2272-2281.
16. F. Eckstein, *Annual Review of Biochemistry*, 1985, 54, 367-402.
17. A. Kirby and A. Varvoglis, *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 1968, 135-141.
18. D. Herschlag, J. A. Piccirilli and T. R. Cech, *Biochemistry*, 1991, 30, 4844-4854.
19. P. Li, Z. A. Sergueeva, M. Dobrikov and B. R. Shaw, *Chemical Reviews*, 2007, 107, 4746-4796.
20. P. Sennikov, *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, 98, 4973-4981.
21. P. Guga and M. Koziolkiewicz, *Chemistry & Biodiversity*, 2011, 8, 1642-1681.
22. J. Baraniak and P. A. Frey, *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110, 4059-4060.
23. C. Liang and L. C. Allen, *Journal of the American Chemical Society*, 1987, 109, 6449-6453.
24. P. A. Frey and R. D. Sammons, *Science*, 1985, 228, 541-545.
25. J. T. Stivers and R. Nagarajan, *Chemical Reviews*, 2006, 106, 3443-3467.
26. J. Florián, M. Štrajbl and A. Warshel, *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120, 7959-7966.
27. V. L. Pecoraro, J. D. Hermes and W. Cleland, *Biochemistry*, 1984, 23, 5262-5271.
28. V. Thiviyathanan, K. V. Vyazovkina, E. K. Gozansky, E. Bichenchova, T. V. Abramova, B. A. Luxon, A. V. Lebedev and D. G. Gorenstein, *Biochemistry*, 2002, 41, 827-838.
29. J. S. Smith and E. P. Nikonowicz, *Biochemistry*, 2000, 39, 5642-5652.
30. J. S. Summers, D. Roe, P. D. Boyle, M. Colvin and B. R. Shaw, *Inorganic Chemistry*, 1998, 37, 4158-4159.
31. T. Imamoto, E. Nagato, Y. Wada, H. Masuda, K. Yamaguchi and T. Uchimaru, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 9925-9926.
32. V. Nahum and B. Fischer, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2004, 2004, 4124-4131.
33. H. Li, C. Hardin and B. R. Shaw, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118, 6606-6614.
34. P. M. Burgers, F. Eckstein and D. H. Hunneman, *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 7476-7478.
35. P. M. Burgers, F. Eckstein, D. H. Hunneman, J. Baraniak, R. W. Kinas, K. Lesiak and W. J. Stec, *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254, 9959-9961.
36. J. Deval, K. Alvarez, B. Selmi, M. Bermond, J. Boretto, C. Guerreiro, L. Mulard and B. Canard, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 3838-3846.
37. C. N. Johnson, A. M. Spring, D. Sergueev, B. R. Shaw and M. W. Germann, *Biochemistry*, 2011, 50, 3903-3912.
38. P. Meyer, B. Schneider, S. Sarfati, D. Deville-Bonne, C. Guerreiro, J. Boretto, J. Janin, M. Veron and B. Canard, *The EMBO Journal*, 2000, 19, 3520-3529.
39. P. Li, Z. Xu, H. Liu, C. K. Wenefors, M. I. Dobrikov, J. Ludwig and B. R. Shaw, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 16782-16783.
40. S. Vincent, S. Grenier, A. Valleix, C. Salesse, L. Lebeau and C. Mioskowski, *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, 63, 7244-7257.
41. R. Engel, *Chemical reviews*, 1977, 77, 349-367.
42. G. M. Blackburn, D. E. Kent and F. Kolkman, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, 1984, 1119-1125.
43. R. H. Crabtree, *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, John Wiley & Sons, 2009.
44. M. L. Nielsen, R. R. Ferguson and W. S. Coakley, *Journal of the American Chemical Society*, 1961, 83, 99-102.
45. J. Tomasz, M. M. Vaghefi, P. C. Ratsep, R. C. Willis and R. K. Robins, *Nucleic Acids Research*, 1988, 16, 8645-8664.
46. T. C. Myers, K. Nakamura and A. B. Danielzadeh, *The Journal of Organic Chemistry*, 1965, 30, 1517-1520.
47. K. W. Pankiewicz, K. Lesiak and K. A. Watanabe, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 3691-3695.
48. K. Lesiak, K. A. Watanabe, J. George and K. W. Pankiewicz, *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, 63, 1906-1909.
49. V. M. Dixit and C. D. Poulter, *Tetrahedron Letters*, 1984, 25, 4055-4058.
50. V. J. Davisson, D. R. Davis, V. M. Dixit and C. D. Poulter, *The Journal of Organic Chemistry*, 1987, 52, 1794-1801.
51. M. Kalk, J. Jemielity, J. Stepinski, R. Stolarski and E. Darzynkiewicz, *Tetrahedron Letters*, 2005, 46, 2417-2421.
52. S. E. Eliahu, J. Camden, J. Lecka, G. A. Weisman, J. Sevigny, S. Gelinis and B. Fischer, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 44, 1525-1536.
53. M. Haas, I. Ben-Moshe, B. Fischer and G. Reiser, *Biochemical Pharmacology*, 2013, 86, 645-655.
54. S. Eliahu, A. Martín-Gil, M. J. Perez de Lara, J. Pintor, J. Camden, G. A. Weisman, J. Lecka, J. Sévigny and B. Fischer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53, 3305-3319.
55. N. A. Boyle, V. K. Rajwanshi, M. Prhac, G. Wang, P. Fagan, F. Chen, G. J. Ewing, J. L. Brooks, T. Hurd, J. M. Leeds, T. W. Bruice and P. D. Cook, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 48, 2695-2700.
56. F. Eckstein, *Journal of the American Chemical Society*, 1966, 88, 4292-4294.
57. A. W. Murray and M. R. Atkinson, *Biochemistry*, 1968, 7, 4023-4029.
58. J. P. Guthrie, *Canadian Journal of Chemistry*, 1979, 57, 236-239.
59. J. Stawinski and A. Kraszewski, *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35, 952-960.
60. A. Kume, M. Fujii, M. Sekine and T. Hata, *The Journal of Organic Chemistry*, 1984, 49, 2139-2143.
61. J.-T. Chen and S. J. Benkovic, *Nucleic acids research*, 1983, 11, 3737-3751.
62. B. L. Hevroni, A. H. Sayer, E. Blum and B. Fischer, *Inorganic Chemistry*, 2014, 53, 1594-1605.
63. F. Eckstein and H. Gindl, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1967, 149, 35-40.
64. R. S. Goody and F. Eckstein, *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93, 6252-6257.
65. J. P. Richard, H.-T. Ho and P. A. Frey, *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100, 7756-7757.
66. B. A. Connolly, P. J. Romaniuk and F. Eckstein, *Biochemistry*, 1982, 21, 1983-1989.
67. J. Kowalska, M. Lewdorowicz, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *Tetrahedron Letters*, 2007, 48, 5475-5479.
68. Y. Nadel, J. Lecka, Y. Gilad, G. Ben-David, D. Forster, G. Reiser, S. Kenigsberg, J. Camden, G. A. Weisman, H. Senderowitz, J. Sevigny and B. Fischer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57, 4677-4691.
69. J. Marugg, M. Tromp, E. Kuył-Yeheskiely, G. Van der Marel and J. Van Boom, *Tetrahedron Letters*, 1986, 27, 2661-2664.
70. J. Ludwig and F. Eckstein, *The Journal of Organic Chemistry*, 1991, 56, 1777-1783.
71. J. Ludwig and F. Eckstein, *The Journal of Organic Chemistry*, 1991, 56, 5860-5865.
72. P. Guga, A. Okruszek and W. J. Stec, in *New Aspects in Phosphorus Chemistry I*, Springer, 2002, pp. 169-200.
73. P. Furrer, T. M. Billeci, A. Donati, C. Kojima, B. Karwowski, A. Sierzchala, W. Stec and T. L. James, *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285, 1609-1622.
74. W. J. Stec and A. Wilk, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1994, 33, 709-722.
75. W. J. Stec, A. Grajkowski, M. Koziolkiewicz and B. Uznanski, *Nucleic Acids Research*, 1991, 19, 5883-5888.



76. K. Misiura, D. Szymanowicz and W. J. Stec, *Organic Letters*, 2005, 7, 2217-2220.
77. S. Kosuri and G. M. Church, *Nature methods*, 2014, 11, 499-507.
78. J. Tomasz, B. R. Shaw, K. Porter, B. F. Spielvogel and A. Sood, *Angewandte Chemie International Edition*, 1992, 31, 1373-1375.
79. S. I. Khan, M. I. Dobrikov and B. R. Shaw, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2005, 24, 1047-1049.
80. M. Sobkowski, A. Kraszewski and J. Stawinski, *Recent Advances in H-Phosphonate Chemistry. Part 1. H-Phosphonate Esters: Synthesis and Basic Reactions*, 2014.
81. J. Lin, K. He and B. Ramsay Shaw, *Helvetica Chimica Acta*, 2000, 83, 1392-1397.
82. P. Li and B. R. Shaw, *The Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69, 7051-7057.
83. J. Lin and B. Ramsay Shaw, *Chemical Communication (Camb)*, 2000, 2115-2116.
84. V. Nahum, G. Zündorf, S. A. Lévesque, A. R. Beaudoin, G. Reiser and B. Fischer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, 45, 5384-5396.
85. P. Li, M. Dobrikov, H. Liu and B. R. Shaw, *Organic Letters*, 2003, 5, 2401-2403.
86. S. Azran, D. Forster, O. Danino, Y. Nadel, G. Reiser and B. Fischer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 4938-4952.
87. M. I. Dobrikov, Z. A. Sergueeva and B. R. Shaw, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2003, 22, 1651-1655.
88. P. J. Romaniuk and F. Eckstein, *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257, 7684-7688.
89. P. M. Burgers and F. Eckstein, *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254, 6889-6893.
90. F. Eckstein, H. H. Schulz, H. Rueterjans, W. Haar and W. Maurer, *Biochemistry*, 1981, 11, 3507-3512.
91. P. M. Burgers and F. Eckstein, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978, 75, 4798-4800.
92. W. Hinrichs, M. Steifa, W. Saenger and F. Eckstein, *Nucleic Acids Research*, 1987, 15, 4945-4955.
93. F. R. Bryant and S. J. Benkovic, *Biochemistry*, 1979, 18, 2825-2828.
94. Z. Yang, A. M. Sismour and S. A. Benner, *Nucleic Acids Research*, 2007, 35, 3118-3127.
95. S. A. Benner, A. Glasfeld and J. A. Piccirilli, *Topics in Stereochemistry*, 1989, 19, C207.
96. V. Jankowski, M. Van Der Giet, H. Mischak, M. Morgan, W. Zidek and J. Jankowski, *British Journal of Pharmacology*, 2009, 157, 1142-1153.
97. M. Tolle, V. Jankowski, M. Schuchardt, A. Wiedon, T. Huang, F. Hub, J. Kowalska, J. Jemielity, A. Guranowski, C. Lodenkemper, W. Zidek, J. Jankowski and M. van der Giet, *Circulation Research*, 2008, 103, 1100-U1193.
98. S. Yelovitch, J. Camden, G. A. Weisman and B. Fischer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55, 437-448.
99. V. Nahum, M. Tulapurkar, S. A. Levesque, J. Sevigny, G. Reiser and B. Fischer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49, 1980-1990.
100. C. Stefan, S. Jansen and M. Bollen, *Purinergic Signalling*, 2006, 2, 361-370.
101. G. A. Karpouzias and R. A. Terkeltaub, *Current Rheumatology Reports*, 1999, 1, 121-127.
102. I. Aerts, J.-J. Martin, P. P. De Deyn, C. Van Ginneken, X. Van Ostade, M. Kockx, G. Dua and H. Slegers, *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2011, 113, 224-229.
103. B. A. Maddux, P. Sbraccia, S. Kumakura, S. Sasson, J. Youngren, A. Fisher, S. Spencer, A. Grupe, W. Henzel and T. A. Stewart, *Nature*, 1995, 373, 448-451.
104. O. Danino, N. Giladi, S. Grossman and B. Fischer, *Biochemical Pharmacology*, 2014, 88, 384-392.
105. P. Li and B. R. Shaw, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2003, 22, 699-701.
106. S. Uehara, S. Hiura, R. Higashida, N. Oka and T. Wada, *The Journal of Organic Chemistry*, 2014, 79, 3465-3472.
107. S. Roy and M. Caruthers, *Molecules*, 2013, 18, 14268-14284.
108. P. Järver, L. O'Donovan and M. J. Gait, *Nucleic Acids Therapeutics*, 2014, 24, 37-47.
109. R. Kole, A. R. Kraimer and S. Altman, *Nature Review Drug Discovery*, 2012, 11, 125-140.
110. K. A. Lennox and M. A. Behlke, *Pharmaceutical Research*, 2010, 27, 1788-1799.
111. S. Roy, M. Olesiak, S. Shang and M. H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135, 6234-6241.
112. S. Roy, M. Olesiak, P. Padar, H. McCuen and M. H. Caruthers, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2012, 10, 9130-9133.
113. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2007.
114. D. L. Andrews and D. S. Bradshaw, *European Journal of Physics*, 2004, 25, 845.
115. D. L. Andrews, *Chemical Physics*, 1989, 135, 195-201.
116. S. Diekmann and C. Hoischen, *Physics of Life Reviews*, 2014, 11, 1-30.
117. E. Shaw, P. St-Pierre, K. McCluskey, D. A. Lafontaine and J. C. Penedo, *Methods in Enzymology*, 2014, 549, 313-341.
118. W. B. Frommer, M. W. Davidson and R. E. Campbell, *Chemical Society Review*, 2009, 38, 2833-2841.
119. T. Krusinski, A. Ozyhar and P. Dobrynszycki, *Nucleic Acids Research*, 2010, 38, e108.
120. P. S. David Gerecht, M. A. Taylor and J. D. Port, *BMC Cell Biology*, 2010, 11, 69.
121. K. Truong and M. Ikura, *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11, 573-578.
122. T. Y. Yoo, S. P. Meisburger, J. Hinshaw, L. Pollack, G. Haran, T. R. Sosnick and K. Plaxco, *Journal of Molecular Biology*, 2012, 418, 226-236.
123. L. E. Morrison and L. M. Stols, *Biochemistry*, 1993, 32, 3095-3104.
124. A. S. Boutorine, D. S. Novopashina, O. A. Krasheninina, K. Nozeret and A. G. Venyaminova, *Molecules*, 2013, 18, 15357-15397.
125. M. Vendrell, D. Zhai, J. C. Er and Y. T. Chang, *Chemical Reviews*, 2012, 112, 4391-4420.
126. J. O. Escobedo, O. Rusin, S. Lim and R. M. Strongin, *Current Opinion Chemical Biology*, 2010, 14, 64-70.
127. R. W. Sinkeldam, N. J. Greco and Y. Tor, *Chemical Reviews*, 2010, 110, 2579-2619.
128. R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes, 2002.
129. G. Weber, *Biochemical Journal*, 1952, 51, 155.
130. J. E. Moses and A. D. Moorhouse, *Chemical Society Reviews*, 2007, 36, 1249-1262.
131. A. Waggoner, *Methods in Enzymology*, 1995, 246, 362-373.
132. D. Suh and J. B. Chaires, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1995, 3, 723-728.
133. S. Eriksson, S. K. Kim, M. Kubista and B. Norden, *Biochemistry*, 1993, 32, 2987-2998.
134. I. Haq, J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, T. C. Jenkins and J. B. Chaires, *Journal of Molecular Biology*, 1997, 271, 244-257.
135. A. N. Glazer, K. Peck and R. A. Mathies, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87, 3851-3855.
136. H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies and A. N. Glazer, *Nucleic Acids Research*, 1992, 20, 2803-2812.
137. J. N. Wilson and E. T. Kool, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, 4, 4265-4274.
138. N. A. Grigorenko and C. J. Leumann, *Chemical Communications (Camb)*, 2008, 5417-5419.
139. M. E. Hawkins, *Methods in Enzymology*, 2008, 450, 201-231.
140. J. A. Secrist, J. R. Barrio and N. J. Leonard, *Science*, 1972, 175, 646-647.
141. V. Korshun, I. Prokhorenko, S. Gontarev, M. Skorobogatyi, K. Balakin, E. Manasova, A. Malakhov and Y. A. Berlin, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 1997, 16, 1461-1464.
142. H.-A. Wagenknecht, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1130, 122-130.
143. M. Vrabel, R. Pohl, B. Klepetářová, I. Votruba and M. Hocek, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007, 5, 2849-2857.
144. R. Kawai, M. Kimoto, S. Ikeda, T. Mitsui, M. Endo, S. Yokoyama and I. Hirao, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 17286-17295.
145. R. Seifert and S. Dove, *Pharmacology & Therapeutics*, 2013, 140, 200-212.
146. T. Hiratsuka, *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270, 3479-3485.
147. T. Brown, *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, John Wiley & Sons, 2010.
148. C. P. Ramil and Q. Lin, *Chemical Communications (Camb)*, 2013, 49, 11007-11022.
149. M. King and A. Wagner, *Bioconjugate Chemistry*, 2014, 25, 825-839.
150. R. J. Weatheritt, T. J. Gibson and M. M. Babu, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21, 833-839.
151. A. R. Buxbaum, G. Haimovich and R. H. Singer, *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology*, 2014.
152. R. M. Long, R. H. Singer, X. Meng, I. Gonzalez, K. Nasmyth and R.-P. Jansen, *Science*, 1997, 277, 383-387.
153. C. C. Garner, R. P. Tucker and A. Matus, *Nature*, 1988, 336, 674-677.
154. A. Raj, P. Van Den Bogaard, S. A. Rifkin, A. Van Oudenaarden and S. Tyagi, *Nature Methods*, 2008, 5, 877-879.
155. A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty and R. H. Singer, *Science*, 1998, 280, 585-590.
156. K. H. Chen, A. N. Boettiger, J. R. Moffitt, S. Wang and X. Zhuang, *Science*, 2015, 348.

157. E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer and R. M. Long, *Molecular Cell*, 1998, 2, 437-445.
158. T. J. Carrocci and A. A. Hoskins, *The Analyst*, 2014, 139, 44-47.
159. E. V. Dolgoshina, S. C. Jeng, S. S. S. Panchapakesan, R. Cojocar, P. S. Chen, P. D. Wilson, N. Hawkins, P. A. Wiggins and P. J. Unrau, *ACS Chemical Biology*, 2014, 9, 2412-2420.
160. B. Wu, J. A. Chao and R. H. Singer, *Biophysical Journal*, 2012, 102, 2936-2944.
161. V. L. Zimyanin, K. Belaya, J. Pecreaux, M. J. Gilchrist, A. Clark, I. Davis and D. St Johnston, *Cell*, 2008, 134, 843-853.
162. K. M. Forrest and E. R. Gavis, *Current Biology*, 2003, 13, 1159-1168.
163. H. Y. Park, H. Lim, Y. J. Yoon, A. Follenzi, C. Nwokafor, M. Lopez-Jones, X. Meng and R. H. Singer, *Science*, 2014, 343, 422-424.
164. P. Mali, K. M. Esvelt and G. M. Church, *Nature Methods*, 2013, 10, 957-963.
165. T. Hiratsuka, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1983, 742, 496-508.
166. T. Hiratsuka, *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257, 13354-13358.
167. B. Nawrot, W. Milius, A. Ejchart, S. Limmer and M. Sprinzl, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 948-954.
168. M. Taiji, S. Yokoyama and T. Miyazawa, *Biochemistry*, 1983, 22, 3220-3225.
169. B. Nawrot and M. Sprinzl, *Nucleoside, Nucleotides & Nucleic Acids*, 1998, 17, 815-829.
170. R. S. Sarfati, V. K. Kansal, H. Munier, P. Glaser, A. M. Gilles, E. Labruyere, M. Mock, A. Danchin and O. Barzu, *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265, 18902-18906.
171. S. K. Woodward, J. F. Eccleston and M. A. Geeves, *Biochemistry*, 1991, 30, 422-430.
172. P. B. Conibear, D. S. Jeffreys, C. K. Seehra, R. J. Eaton and C. R. Bagshaw, *Biochemistry*, 1996, 35, 2299-2308.
173. C. B. Bauer, P. A. Kuhlman, C. R. Bagshaw and I. Rayment, *Journal of Molecular Biology*, 1997, 274, 394-407.
174. I. M. L. de la Sierra, J. Gallay, M. Vincent, T. Bertrand, P. Briozzo, O. Barzu and A. M. Gilles, *Biochemistry*, 2000, 39, 15870-15878.
175. Y. Niranjani, D. Ungureanu, H. Hammaren, A. Sanz-Sanz, A. H. Westphal, J. W. Borst, O. Silvennoinen and R. Hilhorst, *Analytical Biochemistry*, 2013, 442, 213-222.
176. S. E. Sinnett, J. Z. Sexton and J. E. Brenman, *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, 2013, 7, 30-38.
177. D. Reinecke, F. Schwede, H. G. Genieser and R. Seifert, *PLoS One*, 2013, 8, e54158.
178. N. A. Hartell, S. Furuya, S. Jacoby and D. Okada, *Neuroreport*, 2001, 12, 25-28.
179. D. Okada and S. Asakawa, *Biochemistry*, 2002, 41, 9672-9679.
180. Y. Shen, Y. S. Lee, S. Soelaiman, P. Bergson, D. Lu, A. Chen, K. Beckingham, Z. Grabarek, M. Mrksich and W. J. Tang, *The EMBO Journal*, 2002, 21, 6721-6732.
181. A. Gille and R. Seifert, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 12672-12679.
182. A. Gille, G. H. Lushington, T.-C. Mou, M. B. Doughty, R. A. Johnson and R. Seifert, *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279, 19955-19969.
183. T. C. Mou, A. Gille, D. A. Fancy, R. Seifert and S. R. Sprang, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 7253-7261.
184. T.-C. Mou, A. Gille, S. Suryanarayana, M. Richter, R. Seifert and S. R. Sprang, *Molecular Pharmacology*, 2006, 70, 878-886.
185. C. Pinto, G. H. Lushington, M. Richter, A. Gille, J. Geduhn, B. König, T. C. Mou, S. R. Sprang and R. Seifert, *Biochemical Pharmacology*, 2011, 82, 358-370.
186. S. Dove, K. Y. Danker, J. P. Stasch, V. Kaever and R. Seifert, *Molecular Pharmacology*, 2014, 85, 598-607.
187. M. Goettle, S. Dove, P. Steindel, Y. Shen, W. J. Tang, J. Geduhn, B. König and R. Seifert, *Molecular Pharmacology*, 2007, 72, 526-535.
188. J. Geduhn, S. Dove, Y. Q. Shen, W. J. Tang, B. König and R. Seifert, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011, 336, 104-115.
189. H. Taha, J. Geduhn and R. Seifert, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2009, 379, 27-27.
190. H. Taha, S. Dove, J. Geduhn, B. König, Y. Shen, W.-J. Tang and R. Seifert, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012, 385, 57-68.
191. C. Gagyi, N. Bucurenci, O. Sirbu, G. Labesse, M. Ionescu, A. Ofiteru, L. Assairi, S. Landais, A. Danchin and O. Bärzu, *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270, 3196-3204.
192. T. Schirmer and U. Jenal, *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7, 724-735.
193. I. M. Sharma, T. Dhanaraman, R. Mathew and D. Chatterji, *Biochemistry*, 2012, 51, 5443-5453.
194. J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff and D. C. Phillips, *Nature*, 1958, 181, 662-666.
195. M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will and A. C. T. North, *Nature*, 1960, 185, 416-422.
196. J. J. Ward, J. S. Sodhi, L. J. McGuffin, B. F. Buxton and D. T. Jones, *Journal of Molecular Biology*, 2004, 337, 635-645.
197. R. Zwanzig, A. Szabo and B. Bagchi, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89, 20-22.
198. L. Pauling, R. B. Corey and H. R. Branson, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1951, 37, 205-211.
199. D. Chandler, *Nature*, 2005, 437, 640-647.
200. H. X. Zhou and M. K. Gilson, *Chemical Reviews*, 2009, 109, 4092-4107.
201. J. N. Onuchic, H. Nymeyer, A. E. Garcia, J. Chahine and N. D. Socci, *Advances in Protein Chemistry*, 2000, 53, 87-152.
202. K. A. Dill and J. L. MacCallum, *Science*, 2012, 338, 1042-1046.
203. J. N. Onuchic and P. G. Wolynes, *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, 14, 70-75.
204. K. A. Dill, *Biochemistry*, 1985, 24, 1501-1509.
205. P. E. Leopold, M. Montal and J. N. Onuchic, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89, 8721-8725.
206. K. A. Dill and H. S. Chan, *Nature Structural Biology*, 1997, 4, 10-19.
207. J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten and P. G. Wolynes, *Annual Reviews in Physical Chemistry*, 1997, 48, 545-600.
208. J. Karanicolas and C. L. Brooks, 3rd, *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 2002, 11, 2351-2361.
209. D. H. Williams, J. P. Cox, A. J. Doig, M. Gardner, U. Gerhard, P. T. Kaye, A. R. Lal, I. A. Nicholls, C. J. Salter and R. C. Mitchell, *Journal of the American Chemical Society*, 1991, 113, 7020-7030.
210. V. A. Jarymowycz and M. J. Stone, *Chemical Reviews*, 2006, 106, 1624-1671.
211. M. J. Stone, *Accounts of Chemical Research*, 2001, 34, 379-388.
212. E. Shakhnovich, *Chemical Reviews*, 2006, 106, 1559-1588.
213. Z. Shi, K. Chen, Z. Liu and N. R. Kallenbach, *Chemical Reviews*, 2006, 106, 1877-1897.
214. D. Shortle and M. S. Ackerman, *Science*, 2001, 293, 487-489.
215. H. Frauenfelder, S. G. Sligar and P. G. Wolynes, *Science*, 1991, 254, 1598-1603.
216. G. Weber, *Advances in Protein Chemistry*, 1975, 29, 68.
217. K. Binder and A. P. Young, *Reviews of Modern Physics*, 1986, 58, 801-976.
218. A. Ansari, J. Berendzen, S. F. Bowne, H. Frauenfelder, I. E. Iben, T. B. Sauke, E. Shyamsunder and R. D. Young, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985, 82, 5000-5004.
219. H. Frauenfelder, G. A. Petsko and D. Tsernoglou, *Nature*, 280, 558 - 563, 1979.
220. H. Scher, M. F. Shlesinger and J. T. Bandler, *Physic Today*, 1991, 44, 26-34.
221. K. Gunasekaran, B. Ma and R. Nussinov, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2004, 57, 433-443.
222. G. Jiménez-Osés, S. Osuna, X. Gao, M. R. Sawaya, L. Gilson, S. J. Collier, G. W. Huisman, T. O. Yeates, Y. Tang and K. Houk, *Nature Chemical Biology*, 2014, 10, 431-436.
223. R. Nussinov, C. J. Tsai and J. Liu, *Journal of American Chemical Society*, 2014, 136, 17692-17701.
224. S. R. Tzeng and C. G. Kalodimos, *Nature*, 2012, 488, 236-240.
225. S.-R. Tzeng and C. G. Kalodimos, *Nature*, 2009, 462, 368-372.
226. C. M. Petit, J. Zhang, P. J. Sapienza, E. J. Fuentes and A. L. Lee, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106, 18249-18254.
227. S. R. Tzeng and C. G. Kalodimos, *Nature Chemical Biology*, 2013, 9, 462-465.
228. S. Michielssens, J. H. Peters, D. Ban, S. Pratihari, D. Seeliger, M. Sharma, K. Giller, T. M. Sabo, S. Becker, D. Lee, C. Griesinger and B. L. de Groot, *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53, 10367-10371.
229. Z. X. Liang, T. Lee, K. A. Resing, N. G. Ahn and J. P. Klinman, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101, 9556-9561.
230. H. Frauenfelder, F. Parak and R. D. Young, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 1988, 17, 451-479.
231. P. Zavodszky, J. Kardos, Svingor and G. A. Petsko, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95, 7406-7411.

232. W. T. Heller, *Acta Crystallographica D: Biological Crystallography*, 2005, 61, 33-44.
233. A. J. Wand, *Nature Structural Biology*, 2001, 8, 926-931.
234. E. Z. Eisenmesser, D. A. Bosco, M. Akke and D. Kern, *Science*, 2002, 295, 1520-1523.
235. P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. McMahon and R. Young, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101, 14408-14413.
236. S. D. Rader and D. A. Agard, *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1997, 6, 1375-1386.
237. N. Tjandra, A. Szabo and A. Bax, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118, 6986-6991.
238. J. G. de la Torre, M. Huertas and B. Carrasco, *Journal of Magnetic Resonance*, 2000, 147, 138-146.
239. M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. M. Ono and P. Güntert, *Nature*, 2006, 440, 52-57.
240. P. Schanda and B. Brutscher, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 8014-8015.
241. G. Bouvignies, P. Vallurupalli, D. F. Hansen, B. E. Correia, O. Lange, A. Bah, R. M. Vernon, F. W. Dahlquist, D. Baker and L. E. Kay, *Nature*, 2011, 477, 111-114.
242. A. J. Wand, *Current Opinions in Structural Biology*, 2013, 23, 75-81.
243. A. Mittermaier and L. E. Kay, *Science*, 2006, 312, 224-228.
244. M. Karplus, T. Ichiye and B. Pettitt, *Biophysical Journal*, 1987, 52, 1083-1085.
245. C. Diehl, O. Engström, T. Delaine, M. Håkansson, S. Genheden, K. Modig, H. Leffler, U. Ryde, U. J. Nilsson and M. Akke, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132, 14577-14589.
246. M. S. Marlow, J. Dogan, K. K. Frederick, K. G. Valentine and A. J. Wand, *Nature Chemical Biology*, 2010, 6, 352-358.
247. V. J. Hilser and E. B. Thompson, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104, 8311-8315.
248. K. K. Frederick, M. S. Marlow, K. G. Valentine and A. J. Wand, *Nature*, 2007, 448, 325-329.
249. R. Wolfenden, C. Ridgway and G. Young, *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120, 833-834.
250. G. G. Hammes, *Biochemistry*, 2002, 41, 8221-8228.
251. L. Michaelis and M. Menten, *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333-369, 1913.
252. G. E. Briggs and J. B. Haldane, *Biochemistry Journal*, 1925, 19, 338-339.
253. S. Reuveni, M. Urbakh and J. Klafter, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111, 4391-4396.
254. J. Kraut, *Science*, 1988, 242, 533-540.
255. J. R. Knowles, *Nature*, 1991, 350, 121-124.
256. L. Pauling, *Chemical & Engineering News Archive*, 1946, 24, 1375-1377.
257. P. J. Artymiuk, C. C. F. Blake, D. E. P. Grace, S. J. Oatley, D. C. Phillips and M. J. E. Sternberg, *Nature*, 1979, 280, 563-568.
258. C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips and V. R. Sarma, *Nature*, 1965, 206, 757-761.
259. S. J. Benkovic and S. Hammes-Schiffer, *Science*, 2003, 301, 1196-1202.
260. P. Cook and W. W. Cleland, *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Garland Science, 2007.
261. D. G. Truhlar, W. L. Hase and J. T. Hynes, *The Journal of Physical Chemistry*, 1983, 87, 2664-2682.
262. J. Gao and D. G. Truhlar, *Annual Review of Physical Chemistry*, 2002, 53, 467-505.
263. M. Garcia-Viloca, J. Gao, M. Karplus and D. G. Truhlar, *Science*, 2004, 303, 186-195.
264. P. K. Agarwal, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 15248-15256.
265. W. R. Cannon, S. F. Singleton and S. J. Benkovic, *Nature Structural Biology*, 1996, 3, 821-833.
266. P. Carter and J. A. Wells, *Nature*, 1988, 332, 564-568.
267. S. R. Billeter, S. P. Webb, T. Jordanov, P. K. Agarwal and S. Hammes-Schiffer, *The Journal of Chemical Physics*, 2001, 114, 6925-6936.
268. J. P. Klinman and A. Kohen, *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82, 471.
269. L. Wang, S. D. Fried, S. G. Boxer and T. E. Markland, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111, 18454-18459.
270. P. A. Sigala, A. T. Fafarman, J. P. Schwans, S. D. Fried, T. D. Fenn, J. M. Caaveiro, B. Pybus, D. Ringe, G. A. Petsko and S. G. Boxer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110, E2552-E2561.
271. T. C. Bruice, *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35, 139-148.
272. N. Greives and H.-X. Zhou, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111, 10197-10202.
273. S. Göthel and M. Marahiel, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1999, 55, 423-436.
274. S. M. Sullivan and T. Holyoak, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105, 13829-13834.
275. A. D. Vogt and E. Di Cera, *Biochemistry*, 2013, 52, 5723-5729.
276. T. Kiefhaber, A. Bachmann and K. S. Jensen, *Current Opinion in Structural Biology*, 2012, 22, 21-29.
277. K. G. Daniels, N. K. Tonhat, D. R. McClure, Y.-C. Chang, X. Liu, M. A. Schumacher, C. A. Fierke, S. C. Schmidler and T. G. Oas, *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136, 822-825.
278. G. G. Hammes, Y.-C. Chang and T. G. Oas, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106, 13737-13741.
279. R. Walsh, E. Martin and S. Darvesh, *Integrative Biology*, 2011, 3, 1197-1201.
280. J. Marvizon, J. Vazquez, M. G. Calvo, F. Mayor, A. R. Gomez, F. Valdivieso and J. Benavides, *Molecular Pharmacology*, 1986, 30, 590-597.
281. B. Ring, S. Wrighton and M. Mohutsky, in *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism*, eds. S. Nagar, U. A. Argikar and D. J. Tweedie, Humana Press, 2014, vol. 1113, ch. 4, pp. 37-56.
282. J. W. Bunting and C. D. Myers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1974, 341, 222-231.
283. M. Mösche and H.-J. Jördening, *Water Research*, 1999, 33, 2545-2554.
284. C.-F. Chang, C.-W. Ho, C.-Y. Wu, T.-A. Chao, C.-H. Wong and C.-H. Lin, *Chemical Biology*, 2004, 11, 1301-1306.
285. M. Mohutsky and S. D. Hall, in *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism*, Springer, 2014, pp. 57-91.
286. S. R. Stone and J. F. Morrison, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 869, 275-285.
287. D. F. Ceccarelli, X. Tang, B. Pelletier, S. Orlicky, W. Xie, V. Plantevin, D. Neculai, Y.-C. Chou, A. Ogunjimi and A. Al-Hakim, *Cell*, 2011, 145, 1075-1087.
288. T. Lundqvist, S. L. Fisher, G. Kern, R. H. Folmer, Y. Xue, D. T. Newton, T. A. Keating, R. A. Alm and B. L. de Jonge, *Nature*, 2007, 447, 817-822.
289. W. P. Janzen, *Chemical Biology*, 2014, 21, 1162-1170.
290. D. Reker and G. Schneider, *Drug Discovery Today*, 2015, 20, 458-465.
291. M. R. Arkin, M. Randal, W. L. DeLano, J. Hyde, T. N. Luong, J. D. Oslob, D. R. Raphael, L. Taylor, J. Wang and R. S. McDowell, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100, 1603-1608.
292. G. Manley and J. P. Loria, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 519, 223-231.
293. V. A. Feher, J. D. Durrant, A. T. Van Wart and R. E. Amaro, *Current Opinions in Structural Biology*, 2014, 25, 98-103.
294. D. K. Johnson and J. Karanicolas, *PLoS Computational Biology*, 2013, 9, e1002951.
295. G. R. Bowman and P. L. Geissler, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109, 11681-11686.
296. J. A. Hardy and J. A. Wells, *Current Opinions in Structural Biology*, 2004, 14, 706-715.
297. G. R. Bowman, E. R. Bolin, K. M. Hart, B. C. Maguire and S. Marqusee, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112, 2734-2739.
298. H. Cahova, M. L. Winz, K. Hofer, G. Nubel and A. Jaschke, *Nature*, 2015, 519, 374-377.
299. Y. Nishimura, S.-i. Takahashi, T. Yamamoto, M. Tsuboi, M. Hattori, K.-i. Miura, K. Yamaguchi, S. Ohtani and T. Hata, *Nucleic Acids Research*, 1980, 8, 1107-1119.
300. E. Kulikowska, A. Bzowska, J. Wierzchowski and D. Shugar, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 874, 355-363.
301. Z. Wiczorek, J. Stepinski, M. Jankowska and H. Lonnberg, *Journal of Photochemistry & Photobiology B*, 1995, 28, 57-63.
302. Z. Wiczorek, K. Zdanowski, L. Chlebicka, J. St piński, M. Jankowska, B. Kierdaszuk, A. Temeriusz, E. Darzynkiewicz and R. Stolarski, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1997, 1354, 145-152.
303. P. Fechter and G. G. Brownlee, *Journal of General Virology*, 2005, 86, 1239-1249.
304. C. Mazza, A. Segref, I. W. Mattaj and S. Cusack, *The EMBO Journal*, 2002, 21, 5548-5557.
305. N. Sonenberg, *Biochem Cell Biol*, 2008, 86, 178-183.
306. A. L. Milac, E. Bojarska and A. Wypijewska del Nogal, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1839, 452-462.
307. G. L. Smith, A. Vanderplasschen and M. Law, *Journal of General Virology*, 2002, 83, 2915-2931.
308. A. E. Hodel, P. D. Gershon, X. Shi, S.-M. Wang and F. A. Quiocho, *Nature Structural Biology*, 1997, 4, 350-354.

309. H. Matsuo, H. J. Li, A. M. McGuire, C. M. Fletcher, A. C. Gingras, N. Sonenberg and G. Wagner, *Nature Structural Biology*, 1997, 4, 717-724.
310. J. Marcotrigiano, A. C. Gingras, N. Sonenberg and S. K. Burley, *Cell*, 1997, 89, 951-961.
311. A. Niedzwiecka, J. Marcotrigiano, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, A. Wyslouch-Cieszynska, M. Dadlez, A. C. Gingras, P. Mak, E. Darzynkiewicz, N. Sonenberg, S. K. Burley and R. Stolarski, *Journal of Molecular Biology*, 2002, 319, 615-635.
312. R. Worch, M. Jankowska-Anyszka, A. Niedzwiecka, J. Stepinski, C. Mazza, E. Darzynkiewicz, S. Cusack and R. Stolarski, *Journal of Molecular Biology*, 2009, 385, 618-627.
313. R. Worch, A. Niedzwiecka, J. Stepinski, C. Mazza, M. Jankowska-Anyszka, E. Darzynkiewicz, S. Cusack and R. Stolarski, *RNA*, 2005, 11, 1355-1363.
314. A. Niedzwiecka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz, N. Sonenberg and R. Stolarski, *Biochemistry*, 2002, 41, 12140-12148.
315. H. Kuge and J. Richter, *The EMBO Journal*, 1995, 14, 6301-6311.
316. G. Donmez, K. Hartmuth and R. Luhrmann, *RNA*, 2004, 10, 1925-1933.
317. J. L. Hyde and M. S. Diamond, *Virology*, 2015, 479-480, 66-74.
318. R. Zust, L. Cervantes-Barragan, M. Habjan, R. Maier, B. W. Neuman, J. Ziebuhr, K. J. Szretter, S. C. Baker, W. Barchet, M. S. Diamond, S. G. Siddell, B. Ludewig and V. Thiel, *Nature Immunology*, 2011, 12, 137-143.
319. U. Narayanan, J. K. Ospina, M. R. Frey, M. D. Hebert and A. G. Matera, *Human Molecular Genetics*, 2002, 11, 1785-1795.
320. J. Mouaikel, C. Verheggen, E. Berstrand, J. Tazi and R. Bordonné, *Molecular Cell*, 2002, 9, 891-901.
321. T. Gonatopoulos-Pourmatzis and V. H. Cowling, *Biochemistry Journal*, 2014, 457, 231-242.
322. N. Sonenberg and A. G. Hinnebusch, *Cell*, 2009, 136, 731-745.
323. M. Bhat, N. Robichaud, L. Hulea, N. Sonenberg, J. Pelletier and I. Topisirovic, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2015, 14, 261-278.
324. W. C. Merrick, *Gene*, 2004, 332, 1-11.
325. L. O. Penalva and L. Sánchez, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67, 343-359.
326. J. Somers, T. Pöyry and A. E. Willis, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45, 1690-1700.
327. P. S. Spencer and J. M. Barral, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2012, 1, 1-8.
328. N. T. Ingolia, S. Ghaemmaghmi, J. R. Newman and J. S. Weissman, *Science*, 2009, 324, 218-223.
329. N. T. Ingolia, *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15, 205-213.
330. J. Heskeith, in *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, 2001
331. E. Matoukova, E. Michalova, B. Vojtesek and R. Hrstka, *RNA Biology*, 2012, 9, 563-576.
332. C. Y. Chen and A. B. Shyu, *Wiley Interdisciplinary Reviews in RNA*, 2011, 2, 167-183.
333. S. Bienroth, W. Keller and E. Wahle, *The EMBO Journal*, 1993, 12, 585-595.
334. L. Aravind and E. V. Koonin, *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 1609-1618.
335. A. Nag, K. Narsinh and H. G. Martinson, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14, 662-669.
336. A. O. Subtelny, S. W. Eichhorn, G. R. Chen, H. Sive and D. P. Bartel, *Nature*, 2014.
337. C. J. Norbury, *Biochemistry Society Transactions*, 2010, 38, 1150-1153.
338. R. Parker and H. Song, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, 11, 121-127.
339. D. R. Schoenberg and L. E. Maquat, *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13, 246-259.
340. C. J. Decker and R. Parker, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012, 4, a012286.
341. W. Hu, C. Petzold, J. Collier and K. E. Baker, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17, 244-247.
342. U. Sheth and R. Parker, *Science*, 2003, 300, 805-808.
343. M. Fenger-Gron, C. Fillman, B. Norrild and J. Lykke-Andersen, *Molecular Cell*, 2005, 20, 905-915.
344. A. Eulalio, J. Rehwinkel, M. Stricker, E. Huntzinger, S. F. Yang, T. Doerks, S. Dorner, P. Bork, M. Boutros and E. Izaurralde, *Genes & Development*, 2007, 21, 2558-2570.
345. Z. Wang, X. Jiao, A. Carr-Schmid and M. Kiledjian, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99, 12663-12668.
346. T. M. Franks and J. Lykke-Andersen, *Molecular Cell*, 2008, 32, 605-615.
347. D. Schaeffer, B. Tzanova, A. Barbas, F. P. Reis, E. G. Dastidar, M. Sanchez-Rotunno, C. M. Arraiano and A. van Hoof, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16, 56-62.
348. A. Dziembowski, E. Lorentzen, E. Conti and B. Séraphin, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14, 15-22.
349. Z. Wang and M. Kiledjian, *Cell*, 2001, 107, 751-762.
350. H. Liu, N. D. Rodgers, X. Jiao and M. Kiledjian, *The EMBO Journal*, 2002, 21, 4699-4708.
351. N. D. Rodgers, Z. Wang and M. Kiledjian, *RNA*, 2002, 8, 1526-1537.
352. M. Arribas-Layton, D. Wu, J. Lykke-Andersen and H. Song, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1829, 580-589.
353. S. H. Ling, R. Qamra and H. Song, *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 2011, 2, 193-208.
354. D. C. Schwartz and R. Parker, *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20, 7933-7942.
355. D. C. Schwartz and R. Parker, *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19, 5247-5256.
356. W. Hu, T. J. Sweet, S. Chamnongpol, K. E. Baker and J. Collier, *Nature*, 2009, 461, 225-229.
357. V. Ramachandran, K. H. Shah and P. K. Herman, *Molecular Cell*, 2011, 43, 973-981.
358. D. Teixeira, U. Sheth, M. A. Valencia-Sanchez, M. Brengues and R. Parker, *RNA*, 2005, 11, 371-382.
359. M. A. Andrei, D. Ingelfinger, R. Heintzmann, T. Achsel, R. Rivera-Pomar and R. Luhrmann, *RNA*, 2005, 11, 717-727.
360. A. Wilczynska, C. Aigueperse, M. Kress, F. Dautry and D. Weil, *Journal of Cell Science*, 2005, 118, 981-992.
361. S. N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs and W. Filipowicz, *Cell*, 2006, 125, 1111-1124.
362. M. Tucker, M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis and R. Parker, *Cell*, 2001, 104, 377-386.
363. O. S. Rissland and C. J. Norbury, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16, 616-623.
364. R. Boeck, M. Rieger, J. A. Deardorff, S. Müller-Auer and A. B. Sachs, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 432-438.
365. F. Lejeune, X. Li and L. E. Maquat, *Molecular Cell*, 2003, 12, 675-687.
366. A. Yamashita, T. C. Chang, Y. Yamashita, W. Zhu, Z. Zhong, C. Y. Chen and A. B. Shyu, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12, 1054-1063.
367. J. Chicoine, P. Benoit, C. Gamberi, M. Paliouras, M. Simonelig and P. Lasko, *Developmental Cell*, 2007, 13, 691-704.
368. J. H. Kim and J. D. Richter, *Molecular Cell*, 2006, 24, 173-183.
369. K. D. Swisher and R. Parker, *PLoS One*, 2010, 5, e10006.
370. T. Nissan, P. Rajyaguru, M. She, H. Song and R. Parker, *Molecular Cell*, 2010, 39, 773-783.
371. V. Balagopal and R. Parker, *RNA*, 2011, 17, 835-842.
372. S. A. Fromm, V. Truffault, J. Kamenz, J. E. Braun, N. A. Hoffmann, E. Izaurralde and R. Sprangers, *The EMBO Journal*, 2012, 31, 279-290.
373. A. Chowdhury, J. Mukhopadhyay and S. Tharun, *RNA*, 2007, 13, 998-1016.
374. Y. Harigaya, B. N. Jones, D. Muhrad, J. D. Gross and R. Parker, *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30, 1446-1456.
375. M. S. Borja, K. Piotukh, C. Freund and J. D. Gross, *RNA*, 2010, 17, 278-290.
376. M. R. Fabian, M. K. Cieplak, F. Frank, M. Morita, J. Green, T. Srikumar, B. Nagar, T. Yamamoto, B. Raught, T. F. Duchaine and N. Sonenberg, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19, 365-373.
377. M. Chekulaeva, H. Mathys, J. T. Zipprich, J. Attig, M. Colic, R. Parker and W. Filipowicz, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18, 1218-1226.
378. R. Khanna and M. Kiledjian, *The EMBO Journal*, 2004, 23, 1968-1976.
379. C. J. Wilusz, M. Gao, C. L. Jones, J. Wilusz and S. W. Peltz, *RNA*, 2001, 7, 1416-1424.
380. N. Fischer and K. Weis, *The EMBO Journal*, 2002, 21, 2788-2797.
381. G. Lu, J. Zhang, Y. Li, Z. Li, N. Zhang, X. Xu, T. Wang, Z. Guan, G. F. Gao and J. Yan, *Protein Cell*, 2011, 2, 64-73.
382. M. G. Song, Y. Li and M. Kiledjian, *Molecular Cell*, 2010, 40, 423-432.
383. X. Jiao, S. Xiang, C. Oh, C. E. Martin, L. Tong and M. Kiledjian, *Nature*, 2010, 467, 608-611.
384. J. H. Chang, X. Jiao, K. Chiba, C. Oh, C. E. Martin, M. Kiledjian and L. Tong, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19, 1011-1017.
385. X. Jiao, J. H. Chang, T. Kilic, L. Tong and M. Kiledjian, *Molecular Cell*, 2013, 50, 104-115.

386. A. R. Jurado, D. Tan, X. Jiao, M. Kiledjian and L. Tong, *Biochemistry*, 2014, 53, 1882-1898.
387. M. K. Doma and R. Parker, *Cell*, 2007, 131, 660-668.
388. J. Choe, H. Cho, H. C. Lee and Y. K. Kim, *EMBO Reports*, 2010, 11, 380-386.
389. L. Linde, S. Boelz, G. Neu-Yilik, A. E. Kulozik and B. Kerem, *European Journal of Human Genetics*, 2007, 15, 1156-1162.
390. J. T. Mendell, N. A. Sharifi, J. L. Meyers, F. Martinez-Murillo and H. C. Dietz, *Nature Genetics*, 2004, 36, 1073-1078.
391. S. Apcher, C. Daskalogianni, F. Lejeune, B. Manoury, G. Imhoos, L. Heslop and R. Fähræus, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108, 11572-11577.
392. A. van Hoof, P. A. Frischmeyer, H. C. Dietz and R. Parker, *Science*, 2002, 295, 2262-2264.
393. M. K. Doma and R. Parker, *Nature*, 2006, 440, 561-564.
394. T. Bakheet, B. R. Williams and K. S. Khabar, *Nucleic Acids Research*, 2006, 34, D111-D114.
395. W. Eberhardt, A. Doller, E.-S. Akool and J. Pfeilschifter, *Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 114, 56-73.
396. E. L. Murray and D. R. Schoenberg, *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27, 2791-2799.
397. T. Dasgupta and A. N. Ladd, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2012, 3, 104-121.
398. I. V.-S. Louis and P. R. Bohjanen, *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011, 21, 444-451.
399. M. J. Schmidt and C. J. Norbury, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2010, 1, 142-151.
400. O. S. Rissland, A. Mikulasova and C. J. Norbury, *Molecular & Cellular Biology*, 2007, 27, 3612-3624.
401. J. P. Hagan, E. Piskounova and R. I. Gregory, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16, 1021-1025.
402. J. Lim, M. Ha, H. Chang, S. C. Kwon, D. K. Simanshu, D. J. Patel and V. N. Kim, *Cell*, 2014, 159, 1365-1376.
403. B. M. Lunde, I. Magler and A. Meinhart, *Nucleic Acids Research*, 2012, 40, 9815-9824.
404. L. A. Yates, S. Fleurdepine, O. S. Rissland, L. De Colibus, K. Harlos, C. J. Norbury and R. J. Gilbert, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19, 782-787.
405. B. Shen and H. M. Goodman, *Science*, 2004, 306, 997.
406. T. E. Mullen and W. F. Marzluff, *Genes & Development*, 2008, 22, 50-65.
407. Y. S. Choi, W. Patena, A. D. Leavitt and M. T. McManus, *RNA*, 2012, 18, 394-401.
408. H. Chang, J. Lim, M. Ha and V. N. Kim, *Molecular Cell*, 2014, 53, 1044-1052.
409. F. M. Sement, E. Ferrier, H. Zuber, R. Merret, M. Alioua, J. M. Deragon, C. Bousquet-Antonelli, H. Lange and D. Gagliardi, *Nucleic Acids Research*, 2013, 41, 7115-7127.
410. I. Heo, C. Joo, J. Cho, M. Ha, J. Han and V. N. Kim, *Molecular Cell*, 2008, 32, 276-284.
411. I. Heo, M. Ha, J. Lim, M.-J. Yoon, J.-E. Park, S. C. Kwon, H. Chang and V. N. Kim, *Cell*, 2012, 151, 521-532.
412. G. Ren, X. Chen and B. Yu, *Current Biology*, 2012, 22, 695-700.
413. L. M. Kamminga, M. J. Luteijn, M. J. den Broeder, S. Redl, L. J. Kaaij, E. F. Roovers, P. Ladurner, E. Berezikov and R. F. Ketting, *The EMBO Journal*, 2010, 29, 3688-3700.
414. J. C. van Wolfswinkel, J. M. Claycomb, P. J. Batista, C. C. Mello, E. Berezikov and R. F. Ketting, *Cell*, 2009, 139, 135-148.
415. M. Malecki, S. C. Viegas, T. Carneiro, P. Golik, C. Dressaire, M. G. Ferreira and C. M. Arraiano, *The EMBO Journal*, 2013, 32, 1842-1854.
416. M. Lubas, C. K. Damgaard, R. Tomecki, D. Cysewski, T. H. Jensen and A. Dziembowski, *The EMBO Journal*, 2013, 32, 1855-1868.
417. D. Ustianenko, D. Hrossova, D. Potesil, K. Chalupnikova, K. Hrazdilova, J. Pachernik, K. Cetkowska, S. Uldrijan, Z. Zdrahal and S. Vanacova, *RNA*, 2013, 19, 1632-1638.
418. R. Tomecki, M. S. Kristiansen, S. Lykke-Andersen, A. Chlebowski, K. M. Larsen, R. J. Szczesny, K. Drazkowska, A. Pastula, J. S. Andersen and P. P. Stepien, *The EMBO Journal*, 2010, 29, 2342-2357.
419. D. Astuti, M. R. Morris, W. N. Cooper, R. H. Staals, N. C. Wake, G. A. Fewes, H. Gill, D. Gentle, S. Shuib and C. J. Ricketts, *Nature Genetics*, 2012, 44, 277-284.
420. S. Henikoff and K. Ahmad, *Annual Reviews in Cellular & Developmental Biology*, 2005, 21, 133-153.
421. W. F. Marzluff, E. J. Wagner and R. J. Duronio, *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9, 843-854.
422. W. F. Marzluff, *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17, 274-280.
423. Z.-F. Wang, M. L. Whitfield, T. C. r. Ingledue, Z. Dominski and W. F. Marzluff, *Genes & Development*, 1996, 10, 3028-3040.
424. P. B. Talbert and S. Henikoff, *Nature Review Molecular & Cellular Biology*, 2010, 11, 264-275.
425. E. J. Wagner, B. D. Burch, A. C. Godfrey, H. R. Salzer, R. J. Duronio and W. F. Marzluff, *Molecular Cell*, 2007, 28, 692-699.
426. J.-L. Liu, C. Murphy, M. Buszczak, S. Clatterbuck, R. Goodman and J. G. Gall, *The Journal of Cell Biology*, 2006, 172, 875-884.
427. K. Strub and M. L. Birnstiel, *The EMBO Journal*, 1986, 5, 1675-1684.
428. N. B. Pandey, N. Chodchoy, T.-J. Liu and W. F. Marzluff, *Nucleic Acids Research*, 1990, 18, 3161-3170.
429. N. G. Cakmakci, R. S. Lerner, E. J. Wagner, L. Zheng and W. F. Marzluff, *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28, 1182-1194.
430. M. Osley, *Annual Review of Biochemistry*, 1991, 60, 827-861.
431. N. Pandey and W. Marzluff, *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7, 4557-4559.
432. R. A. Graves, N. B. Pandey, N. Chodchoy and W. F. Marzluff, *Cell*, 1987, 48, 615-626.
433. H. Kaygun and W. F. Marzluff, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12, 794-800.
434. J. Ross, S. Peltz, G. Kobs and G. Brewer, *Molecular and Cellular Biology*, 1986, 6, 4362-4371.
435. J. Ross and G. Kobs, *Journal of Molecular Biology*, 1986, 188, 579-593.
436. M. G. Song and M. Kiledjian, *RNA*, 2007, 13, 2356-2365.
437. M. J. Schmidt, S. West and C. J. Norbury, *RNA*, 2011, 17, 39-44.
438. K. P. Hoefig, N. Rath, G. A. Heinz, C. Wolf, J. Dameris, A. Schepers, E. Kremmer, K. M. Ansel and V. Heissmeyer, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20, 73-81.
439. S. M. Lyons, A. S. Ricciardi, A. Y. Guo, C. Kambach and W. F. Marzluff, *RNA*, 2014, 20, 88-102.
440. M. J. Bessman, D. N. Frick and S. F. O'Handley, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 25059-25062.
441. A. S. Mildvan, Z. Xia, H. F. Azurmendi, V. Saraswat, P. M. Legler, M. A. Massiah, S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, L. W. Kang and L. M. Amzel, *Archives Biochemistry Biophysics*, 2005, 433, 129-143.
442. C. Piccirillo, R. Khanna and M. Kiledjian, *RNA*, 2003, 9, 1138-1147.
443. E. van Dijk, N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle and B. Seraphin, *The EMBO Journal*, 2002, 21, 6915-6924.
444. D. Gunawardana, H. C. Cheng and K. R. Gayler, *Nucleic Acids Research*, 2008, 36, 203-216.
445. A. Guranowski, *FEBS Letters*, 1990, 262, 205-208.
446. M. Steiger, A. Carr-Schmid, D. C. Schwartz, M. Kiledjian and R. Parker, *RNA*, 2003, 9, 231-238.
447. H. Naitow, J. Tang, M. Canady, R. B. Wickner and J. E. Johnson, *Nature Structural Biology*, 2002, 9, 725-728.
448. B. A. Peculis, K. Reynolds and M. Cleland, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 24792-24805.
449. M. She, C. J. Decker, D. I. Svergun, A. Round, N. Chen, D. Muhrad, R. Parker and H. Song, *Molecular Cell*, 2008, 29, 337-349.
450. M. She, C. J. Decker, N. Chen, S. Tumati, R. Parker and H. Song, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13, 63-70.
451. M. She, C. J. Decker, K. Sundramurthy, Y. Liu, N. Chen, R. Parker and H. Song, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, 11, 249-256.
452. M. V. Deshmukh, B. N. Jones, D. U. Quang-Dang, J. Flinders, S. N. Floor, C. Kim, J. Jemielity, M. Kalek, E. Darzynkiewicz and J. D. Gross, *Molecular Cell*, 2008, 29, 324-336.
453. L. S. Cohen, C. Mikhli, X. Jiao, M. Kiledjian, G. Kunkel and R. E. Davis, *Molecular & Cellular Biology*, 2005, 25, 8779-8791.
454. E. van Dijk, H. Le Hir and B. Seraphin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100, 12081-12086.
455. S. N. Floor, B. N. Jones, G. A. Hernandez and J. D. Gross, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17, 1096-1101.
456. J. Lykke-Andersen, *Molecular & Cellular Biology*, 2002, 22, 8114-8121.
457. J. Xu, J. Y. Yang, Q. W. Niu and N. H. Chua, *Plant Cell*, 2006, 18, 3386-3398.
458. S. N. Floor, M. S. Borja and J. D. Gross, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109, 2872-2877.
459. S. Rozovsky, G. Jogl, L. Tong and A. E. McDermott, *Journal of Molecular Biology*, 2001, 310, 271-280.
460. E. Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. M. Korzhnev, M. Wolf-Watz, D. A. Bosco, J. J. Skalicky, L. E. Kay and D. Kern, *Nature*, 2005, 438, 117-121.

461. D. D. Boehr, R. Nussinov and P. E. Wright, *Nature Chemical Biology*, 2009, 5, 789-796.
462. D. Schwartz, C. J. Decker and R. Parker, *RNA*, 2003, 9, 239-251.
463. G. Haas, J. E. Braun, C. Igreja, F. Tritschler, T. Nishihara and E. Izaurralde, *Journal of Cellular Biology*, 2010, 189, 289-302.
464. S. Tharun, W. He, A. E. Mayes, P. Lennertz, J. D. Beggs and R. Parker, *Nature*, 2000, 404, 515-518.
465. T. Lai, H. Cho, Z. Liu, M. W. Bowler, S. Piao, R. Parker, Y. K. Kim and H. Song, *Structure*, 2012, 20, 2025-2037.
466. F. Tritschler, A. Eulalio, V. Truffault, M. D. Hartmann, S. Helms, S. Schmidt, M. Coles, E. Izaurralde and O. Weichenrieder, *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27, 8600-8611.
467. F. Tritschler, J. E. Braun, A. Eulalio, V. Truffault, E. Izaurralde and O. Weichenrieder, *Molecular Cell*, 2009, 33, 661-668.
468. H. Sharif, S. Ozgur, K. Sharma, C. Basquin, H. Urlaub and E. Conti, *Nucleic Acids Research*, 2013, 41, 8377-8390.
469. S. A. Fromm, J. Kamenz, E. R. Nöldeke, A. Neu, G. Zocher and R. Sprangers, *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53, 7354-7359.
470. Y. Li, J. Dai, M. Song, P. Fitzgerald-Bocarsly and M. Kiledjian, *Molecular and Cellular Biology*, 2012, 32, 1164-1172.
471. S. Shukla and R. Parker, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111, E3277-3286.
472. N. Chen, M. A. Walsh, Y. Liu, R. Parker and H. Song, *Journal of Molecular Biology*, 2005, 347, 707-718.
473. M. Gu, C. Fabrega, S. W. Liu, H. Liu, M. Kiledjian and C. D. Lima, *Molecular Cell*, 2004, 14, 67-80.
474. S. Bail and M. Kiledjian, *RNA Biology*, 2008, 5, 216-219.
475. M. Zhou, S. Bail, H. L. Plasterer, J. Rusche and M. Kiledjian, *RNA*, 2015, 21, 1306-1312.
476. C. K. Ng, M. Shboul, V. Taverniti, C. Bonnard, H. Lee, A. Eskin, S. F. Nelson, M. Al-Raqad, S. Altawalbeh, B. Seraphin and B. Reversade, *Human Molecular Genetics*, 2015, 24, 3163-3171.
477. I. Ahmed, R. Buchert, M. Zhou, X. Jiao, K. Mittal, T. I. Sheikh, U. Scheller, N. Vasli, M. A. Rafiq, M. Q. Brohi, A. Mikhailov, M. Ayaz, A. Bhatti, H. Sticht, T. Nasr, M. T. Carter, S. Uebe, A. Reis, M. Ayub, P. John, M. Kiledjian, J. B. Vincent and R. A. Jamra, *Human Molecular Genetics*, 2015, 24, 3172-3180.
478. A. Wypijewska, E. Bojarska, M. Lukaszewicz, J. Stepinski, J. Jemielity, R. E. Davis and E. Darzynkiewicz, *Biochemistry*, 2012, 51, 8003-8013.
479. J. Singh, M. Salsius, S. W. Liu, B. L. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. R. Mattoon, J. Christensen, J. M. Bjornsson, B. A. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki and M. E. Gurney, *ACS Chemical Biology*, 2008, 3, 711-722.
480. H. Xu, E. C. Hett, A. Gopalsamy, M. D. Parikh, K. F. Geoghegan, R. E. Kyne, C. A. Menard, A. Narayanan, R. P. Robinson, D. S. Johnson, M. A. Tones and L. H. Jones, *Molecular BioSystems*, 2015.
481. J. Zhang, F. Gao, Q. Zhang, Q. Chen, J. Qi and J. Yan, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Crystallography Communication*, 2008, 64, 639-640.
482. M.-G. Song, S. Bail and M. Kiledjian, *RNA*, 2013, 19, 390-399.
483. S. Xiang, A. Cooper-Morgan, X. Jiao, M. Kiledjian, J. L. Manley and L. Tong, *Nature*, 2009, 458, 784-788.
484. J. Kowalska, A. Wypijewska Del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Strenkowska, M. Ziemniak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin and J. Jemielity, *Nucleic Acids Research*, 2014, 42, 10245-10264.
485. M. Zytek, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, B. A. Wojtczak, J. Zuberek, A. Ferenc-Mrozek, E. Darzynkiewicz, A. Niedzwiecka and J. Jemielity, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2014, 12, 9184-9199.
486. A. M. Rydzik, M. Kulis, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Zuberek, Z. M. Darzynkiewicz, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20, 1699-1710.
487. W. Su, S. Slepnev, E. Grudzien-Nogalska, J. Kowalska, M. Kulis, J. Zuberek, M. Lukaszewicz, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity and R. E. Rhoads, *RNA*, 2011, 17, 978-988.
488. J. Jemielity, J. Kowalska, A. M. Rydzik and E. Darzynkiewicz, *New Journal of Chemistry*, 2010, 34, 829-844.
489. J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Ziemniak, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 2009, 19, 1921-1925.
490. J. Kowalska, M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Grudzien-Nogalska, E. Bojarska, J. Stepinski, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, R. E. Davis and J. Jemielity, *RNA*, 2008, 14, 1119-1131.
491. J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *ChemBioChem*, 2009, 10, 2469-2473.
492. M. Kalek, J. Jemielity, Z. M. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis and E. Darzynkiewicz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14, 3223-3230.
493. E. Grudzien, M. Kalek, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281, 1857-1867.
494. E. Grudzien-Nogalska, J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads, *RNA*, 2007, 13, 1745-1755.
495. M. Strenkowska, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, W. Su, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *New Journal of Chemistry*, 2010, 34, 993-1007.
496. I. B. Yanachkov, E. J. Dix, M. I. Yanachkova and G. E. Wright, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2011, 9, 730-738.
497. M. Maeda, A. D. Patel and A. Hampton, *Nucleic Acids Research*, 1977, 4, 2843-2853.
498. P. C. Zamecnik, B. Kim, M. J. Gao, G. Taylor and G. M. Blackburn, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89, 2370-2373.
499. J. Stepinski, C. Waddell, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads, *RNA*, 2001, 7, 1486-1495.
500. J. Jemielity, T. Fowler, J. Zuberek, J. Stepinski, M. Lewdorowicz, A. Niedzwiecka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads, *RNA*, 2003, 9, 1108-1122.
501. Q. Han, B. L. Gaffney and R. A. Jones, *Organic Letters*, 2006, 8, 2075-2077.
502. I. Nakagawa, S. Konya, S. Ohtani and T. Hata, *Synthesis-Stuttgart*, 1980, 556-557.
503. J. Moffatt and H. Khorana, *Journal of the American Chemical Society*, 1961, 83, 649-658.
504. Q. Sun, J. P. Edathil, R. Wu, E. D. Smidansky, C. E. Cameron and B. R. Peterson, *Organic Letters*, 2008, 10, 1703-1706.
505. F. Cramer, H. Schaller and H. A. Staab, *Chemische Berichte*, 1961, 94, 1612-1621.
506. D. E. Hoard and D. G. Ott, *Journal of the American Chemical Society*, 1965, 87, 1785-1788.
507. K. Burgess and D. Cook, *Chemical Reviews*, 2000, 100, 2047-2060.
508. T. Mukaiyama and M. Hashimoto, *Journal of the American Chemical Society*, 1972, 94, 8528-8532.
509. A. Kanavarioti and M. T. Rosenbach, *The Journal of Organic Chemistry*, 1991, 56, 1513-1521.
510. A. Kanavarioti, C. F. Bernasconi, D. L. Doodokyan and D. J. Alberas, *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111, 7247-7257.
511. M. Shimazu, K. Shinozuka and H. Sawai, *Tetrahedron Letters*, 1990, 31, 235-238.
512. H. Sawai, H. Wakai and A. Nakamura-Ozaki, *The Journal of Organic Chemistry*, 1999, 64, 5836-5840.
513. M. Kadokura, T. Wada, C. Urashima and M. Sekine, *Tetrahedron Letters*, 1997, 38, 8359-8362.
514. J. Jemielity, J. Stepinski, M. Jaremko, D. Haber, R. Stolarski, R. E. Rhoads and E. Darzynkiewicz, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 2003, 22, 691-694.
515. M. Kalek, J. Jemielity, E. Grudzien, J. Zuberek, E. Bojarska, L. S. Cohen, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, R. E. Rhoads and E. Darzynkiewicz, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2005, 24, 615-621.
516. S. A. Szczepaniak, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, J. Kufel and J. Jemielity, *RNA*, 2012, 18, 1421-1432.
517. M. Strenkowska, P. Wanat, M. Ziemniak, J. Jemielity and J. Kowalska, *Organic Letters*, 2012, 14, 4782-4785.
518. M. Ziemniak, M. Szabelski, M. Lukaszewicz, A. Nowicka, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, Z. Wieczorek and J. Jemielity, *RSC Advances*, 2013, 3, 20943-20958.
519. A. D. Broom, L. B. Townsend, J. W. Jones and R. K. Robins, *Biochemistry*, 1964, 3, 494-500.
520. J. W. Jones and R. K. Robins, *Journal of the American Chemical Society*, 1963, 85, 193-201.
521. A. R. Kore and G. Parmar, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2006, 25, 337-340.
522. P. J. Murphy, *Organophosphorus Reagents: a Practical Approach in Chemistry*, Oxford University Press, Oxford; New York, 2004.
523. D. B. Davies and S. S. Danyluk, *Biochemistry*, 1974, 13, 4417-4434.
524. C. Altona and M. Sundaralingam, *Journal of the American Chemical Society*, 1973, 95, 2333-2344.
525. C. Altona and M. Sundaralingam, *Journal of the American Chemical Society*, 1972, 94, 8205-8212.
526. S. B. Nielsen, T. Chakraborty and S. V. Hoffmann, *ChemPhysChem*, 2005, 6, 2619-2624.
527. N. Simpson, D. J. Shaw, P. W. Frederix, A. H. Gillies, K. Adamczyk, G. M. Greetham, M. Towrie, A. W. Parker, P. A. Hoskisson and N. T. Hunt, *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117, 16468-16478.
528. A. Kropiwnicka, K. Kuchta, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Jemielity, K. Ginalski, E. Darzynkiewicz and J. Zuberek, *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, 2015, 456, 47-52.

529. W. Liu, M. Jankowska-Anyszka, K. Piecyk, L. Dickson, A. Wallace, A. Niedzwiecka, J. Stepinski, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, J. Kieft, R. Zhao, D. N. Jones and R. E. Davis, *Nucleic Acids Research*, 2011, 39, 8820-8832.
530. C. J. Brown, I. McNaie, P. M. Fischer and M. D. Walkinshaw, *Journal of Molecular Biology*, 2007, 372, 7-15.
531. A. Wypijewska del Nogat, M. D. Surleac, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Jemielity, M. Bissaillon, E. Darzynkiewicz, A. L. Milac and E. Bojarska, *FEBS Journal*, 2013, 280, 6508-6527.
532. A. Wypijewska, E. Bojarska, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, J. Jemielity, R. E. Davis and E. Darzynkiewicz, *FEBS Journal*, 2010, 277, 3003-3013.
533. A. Guranowicz, A. M. Wojdyla, J. Zimny, A. Wypijewska, J. Kowalska, J. Jemielity, R. E. Davis and P. Bieganski, *FEBS Letters*, 2009, 584, 93-98.
534. L. S. Cohen, C. Mikhli, C. Friedman, M. Jankowska-Anyszka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz and R. E. Davis, *RNA*, 2004, 10, 1609-1624.
535. A. Zdanowicz, R. Thermann, J. Kowalska, J. Jemielity, K. Duncan, T. Preiss, E. Darzynkiewicz and M. W. Hentze, *Molecular Cell*, 2009, 35, 881-888.
536. A. E. Pasquinelli, J. E. Dahlberg and E. Lund, *RNA*, 1995, 1, 957-967.
537. E. Grudzien, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads, *RNA*, 2004, 10, 1479-1487.
538. A. R. Kore, M. Shanmugasundaram and A. V. Vlassov, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18, 4828-4832.
539. M. Warminski, J. Kowalska, J. Buck, J. Zuberek, M. Lukaszewicz, C. Nicola, A. N. Kuhn, U. Sahin, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23, 3753-3758.
540. A. R. Kore, M. Shanmugasundaram, I. Charles, A. V. Vlassov and T. J. Barta, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131, 6364-6365.
541. A. R. Kore and I. Charles, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, 18, 8061-8065.
542. A. R. Kore, M. Shanmugasundaram, I. Charles, A. M. Cheng and T. J. Barta, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17, 5295-5299.
543. K. Karikó, H. Muramatsu, J. M. Keller and D. Weissman, *Molecular Therapy*, 2012.
544. A. N. Kuhn, M. Diken, S. Kreiter, A. Selmi, J. Kowalska, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, C. Huber, O. Tureci and U. Sahin, *Gene Therapy*, 2010, 17, 961-971.
545. L. Warren, P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y.-H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith and A. Meissner, *Cell Stem Cell*, 2010, 7, 618-630.
546. W. Hobo, L. Strobbe, F. Maas, H. Fredrix, A. Greupink-Draaisma, B. Esendam, T. de Witte, F. Preijers, H. Levenga, B. van Rees, R. Raymakers, N. Schaap and H. Dolstra, *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2013, 62, 1381-1392.
547. S. Wiigenhof, A. M. T. Van Nuffel, D. Bentejn, J. Corthals, C. Aerts, C. Heirman, I. Van Riet, A. Bonehill, K. Thielemans and B. Neyns, *Annals of Oncology*, 2013
548. B. Mopert, Z. Herbert, J. Caldwell and G. Jirikowski, *Hormone and Metabolic Research*, 2006, 38, 246-252.
549. U. Sahin, K. Kariko and O. Tureci, *Nature Review Drug Discovery*, 2014, 13, 759-780.
550. R. P. Deering, S. Kommareddy, J. B. Ulmer, L. A. Brito and A. J. Geall, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2014, 11, 885-899.
551. E. Van Gulck, E. Vlieghe, M. Vekemans, V. F. Van Tendeloo, A. Van De Velde, E. Smits, S. Anguille, N. Cools, H. Goossens and L. Mertens, *AIDS*, 2012, 26, F1-F12.
552. M. Mockey, C. Gonçalves, F. P. Dupuy, F. M. Lemoine, C. Pichon and P. Midoux, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340, 1062-1068.
553. S. Kreiter, A. Selmi, M. Diken, M. Koslowski, C. M. Britten, C. Huber, Ö. Tureci and U. Sahin, *Cancer Research*, 2010, 70, 9031-9040.
554. M. S. Kormann, G. Hasenpusch, M. K. Aneja, G. Nica, A. W. Flemmer, S. Herber-Jonat, M. Huppmann, L. E. Mays, M. Illenyi and A. Schams, *Nature Biotechnology*, 2011, 29, 154-157.
555. G. Gao, C. Leberer, D. J. Weiner, R. Grant, R. Calcedo, B. McCullough, A. Bagg, Y. Zhang and J. M. Wilson, *Blood*, 2004, 103, 3300-3302.
556. K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, 2006, 126, 663-676.
557. P. B. Bitterman and V. A. Polunovsky, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849, 774-780, 2014.
558. Y. Jia, V. Polunovsky, P. B. Bitterman and C. R. Wagner, *Medicines; Research Reviews*, 2012, 32, 786-814.
559. H.-G. Wendel, E. d. Stanchina, J. S. Fridman, A. Malina, S. Ray, S. Kogan, C. Cordon-Cardo, J. Pelletier and S. W. Lowe, *Nature*, 2004, 428, 332-337.
560. A. De Benedetti and J. R. Graff, *Oncogene*, 2004, 23, 3189-3199.
561. P. M. Fischer, *Cell Cycle*, 2009, 8, 2535-2541.
562. D. S. Hong, R. Kurzrock, Y. Oh, J. Wheler, A. Naing, L. Brail, S. Callies, V. André, S. K. Kadam and A. Nasir, *Clinical Cancer Research*, 2011, 17, 6582-6591.
563. N. J. Moerke, H. Aktas, H. Chen, S. Cantel, M. Y. Reibarkh, A. Fahmy, J. D. Gross, A. Degterev, J. Yuan and M. Chorev, *Cell*, 2007, 128, 257-267.
564. P. Ghosh, C. Park, M. S. Peterson, P. B. Bitterman, V. A. Polunovsky and C. R. Wagner, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15, 2177-2180.
565. B. W. Konicek, J. R. Stephens, A. M. McNulty, N. Robichaud, R. B. Peery, C. A. Dumstorf, M. S. Dowless, P. W. Iversen, S. Parsons and K. E. Ellis, *Cancer Research*, 2011, 71, 1849-1857.
566. R. Cencic, D. R. Hall, F. Robert, Y. Du, J. Min, L. Li, M. Qui, I. Lewis, S. Kurtkaya and R. Dingleline, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108, 1046-1051.
567. N. L. Sasavage, K. Friderici and F. M. Rottman, *Nucleic Acids Research*, 1979, 6, 3613-3624.
568. E. Darzynkiewicz, I. Ekiel, P. Lassota and S. M. Tahara, *Biochemistry*, 1987, 26, 4372-4380.
569. E. Darzynkiewicz, J. Stepinski, I. Ekiel, C. Goyer, N. Sonenberg, A. Temeriusz, Y. Jin, T. Sijuwade, D. Haber and S. M. Tahara, *Biochemistry*, 1989, 28, 4771-4778.
570. M. Ziemniak, M. Strenkowska, J. Kowalska and J. Jemielity, *Future Medicinal Chemistry*, 2013, 5, 1141-1172.
571. S. Li, Y. Jia, B. Jacobson, J. McCauley, R. Kratzke, P. B. Bitterman and C. R. Wagner, *Molecular Pharmaceutics*, 2013, 10, 523-531.
572. Y. Jia, T.-L. Chiu, E. A. Amin, V. Polunovsky, P. B. Bitterman and C. R. Wagner, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45, 1304-1313.
573. M. Kalek, J. Jemielity, E. Grudzien, J. Zuberek, E. Bojarska, L. S. Cohen, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, R. E. Rhoads and E. Darzynkiewicz, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 2005, 24, 615-621.
574. A. V. Kabanov and S. V. Vinogradov, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48, 5418-5429.
575. C. Henewefer, S. E. Gendy and O. Peñate-Medina, *Therapeutic Delivery*, 2012, 3, 645-656.
576. M. Zochowska, A. C. Piguat, J. Jemielity, J. Kowalska, E. Szolajska, J. F. Dufour and J. Chroboczek, *Nanomedicine*, 2015, 11, 67-76.
577. Y. Ma, R. J. Nolte and J. J. Cornelissen, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64, 811-825.
578. S. V. Vasilyeva, V. N. Silnikov, N. V. Shatskaya, A. S. Levina, M. N. Repkova and V. F. Zarytova, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21, 703-711.
579. K. Tomoo, X. Shen, K. Okabe, Y. Nozoe, S. Fukuhara, S. Morino, T. Ishida, T. Taniguchi, H. Hasegawa, A. Terashima, M. Sasaki, Y. Katsuya, K. Kitamura, H. Miyoshi, M. Ishikawa and K. I. Miura, *Biochemical Journal*, 2002, 362, 539-544.
580. L. Volpon, M. J. Osborne, I. Topisirovic, N. Siddiqui and K. L. Borden, *The EMBO Journal*, 2006, 25, 5138-5149.
581. C. Visco, C. Perra, S. Thieffine, F. R. Sirtori, R. D' Alessio and P. Magnaghi, *Journal of Biomolecular Screening*, 2012, 17, 581-592.
582. I. Rutkowska-Wlodarczyk, J. Stepinski, M. Dadlez, E. Darzynkiewicz, R. Stolarski and A. Niedzwiecka, *Biochemistry*, 2008, 47, 2710-2720.
583. X. Chen, D. J. Kopecky, J. Mihalic, S. Jeffries, X. Min, J. Heath, J. Deignan, S. Lai, Z. Fu and C. Guimaraes, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55, 3837-3851.
584. A. Niedzwiecka, J. Stepinski, J. M. Antosiewicz, E. Darzynkiewicz and R. Stolarski, *Methods in Enzymology*, 2007, 430, 209-245.
585. B. Ghosh, A. O. Benyumov, P. Ghosh, Y. Jia, S. Avdulov, P. S. Dahlberg, M. Peterson, K. Smith, V. A. Polunovsky and P. B. Bitterman, *ACS Chemical Biology*, 2009, 4, 367-377.
586. A. Cai, M. Jankowska-Anyszka, A. Centers, L. Chlebicka, J. Stepinski, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads, *Biochemistry*, 1999, 38, 8538-8547.
587. Z. M. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Kowalska, M. Lewdorowicz, J. Jemielity, M. Kalek, J. Stepinski, R. E. Davis and E. Darzynkiewicz, *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2007, 19.
588. A. M. Rydzik, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, J. Kowalska, Z. M. Darzynkiewicz, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7, 4763-4776.
589. M. Zochowska, A. Paca, G. Schoehn, J.-P. Andrieu, J. Chroboczek, B. Dublet and E. Szolajska, *PLoS One*, 2009, 4, e5569.
590. K. Kijewska, P. Glowala, J. Kowalska, J. Jemielity, K. Kaczynska, K. Janiszewska, J. Stolarski, G. J. Blanchard, D. Kepinska and K. Lubelska, *Polymer*, 2015, 57, 77-87.
591. K. Kijewska, A. Jarzebinska, J. Kowalska, J. Jemielity, D. Kepinska, J. Szczytko, M. Pisarek, K. Wiktorska, J. Stolarski, P. Krysinski, A. Twardowski and M. Mazur, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 1867-1876.
592. J. H. Ren and D. J. Goss, *Nucleic Acids Research*, 1996, 24, 3629-3634.
593. C.-C. Wei, M. L. Balasta, J. Ren and D. J. Goss, *Biochemistry*, 1998, 37, 1910-1916.
594. M. A. Khan and D. J. Goss, *Biochemistry*, 2005, 44, 4510-4516.
595. M. Gilman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2002, Chapter 4, Unit 4.1.
596. K. J. Reddy and M. Gilman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001, Chapter 4, Unit 4.

597. B. E. Slatko and L. M. Albright, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001, Chapter 7, Unit 7.6.
598. L. M. Albright and B. E. Slatko, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2001, A. 3B. 1-A. 3B. 5.
599. R. Biggin, T. Gibson and G. Hong, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1983, 80, 3963-3965.
600. M. Isfort and J. Ihle, *Biotechniques*, 1988, 6, 138-141.
601. N. F. Lue and R. D. Kornberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84, 8839-8843.
602. J. D. Dignam, R. M. Lebovitz and R. G. Roeder, *Nucleic Acids Research*, 1983, 11, 1475-1489.
603. W. C. Soeller, S. J. Poole and T. Kornberg, *Genes & Development*, 1988, 2, 68-81.
604. B. Jani and R. Fuchs, *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2012, 61, e3702.
605. M. M. Konarska, R. A. Padgett and P. A. Sharp, *Cell*, 1984, 38, 731-736.
606. S. Martin, E. Paoletti and B. Moss, *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250, 9322-9329.
607. E. Grudzien-Nogalska, J. Stepinski, J. Jemielity, J. Zuberek, R. Stolarski, R. E. Rhoads and E. Darzynkiewicz, *Translation Initiation: Cell Biology, High-Throughput Methods, and Chemical-Based Approaches*, 2007, 431, 203-227.
608. E. Grudzien-Nogalska, J. Kowalska, W. Su, A. N. Kuhn, S. V. Slepnev, E. Darzynkiewicz, U. Sahin, J. Jemielity and R. E. Rhoads, *Methods in Molecular Biology*, 2013, 969, 55-72.
609. S. Nagata, T. Hamasaki, K. Uetake, H. Masuda, K. Takagaki, N. Oka, T. Wada, T. Ohgi and J. Yano, *Nucleic Acids Research*, 2010, 38, 7845-7857.
610. J. W. Whittaker, *Biotechnology Letters*, 2013, 35, 143-152.
611. R. Jagus, B. Joshi, S. Miyamoto and G. S. Beckler, *Current Protocols in Cell Biology*, 2001, 11.12. 11-11.12. 25.
612. O. Kovtun, S. Mureev, W. Jung, M. H. Kubala, W. Johnston and K. Alexandrov, *Methods*, 2011, 55, 58-64.
613. S. Mikami, T. Kobayashi, M. Masutani, S. Yokoyama and H. Imataka, *Protein Expression and Purification*, 2008, 62, 190-198.
614. C. J. Murray and R. Baliga, *Current Opinions in Chemical Biology*, 2013, 17, 420-426.
615. Y. Zhou, H. Asahara, E. A. Gaucher and S. Chong, *Nucleic Acids Research*, 2012, gks568.
616. H. H. Wang, P.-Y. Huang, G. Xu, W. Haas, A. Marblestone, J. Li, S. P. Gygi, A. C. Forster, M. C. Jewett and G. M. Church, *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1, 43-52.
617. S. J. Gould and S. Subramani, *Analytical Biochemistry*, 1988, 175, 5-13.
618. T. O. Baldwin, J. A. Christopher, F. M. Raushel, J. F. Sinclair, M. M. Ziegler, A. J. Fisher and I. Rayment, *Current Opinions in Structural Biology*, 1995, 5, 798-809.
619. P. J. Paddison, A. A. Caudy and G. J. Hannon, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99, 1443-1448.
620. S. A. Stewart, D. M. Dykshoorn, D. Palliser, H. Mizuni, E. Y. Yu, D. S. An, D. M. Sabatini, I. S. Y. Chen, W. C. Hahn, P. A. Sharp, R. A. Weinberg and C. D. Novina, *RNA*, 2003, 9, 493-501.
621. P. J. Paddison, A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon and D. S. Conklin, *Genes & Development*, 2002, 16, 948-958.
622. M. T. McManus and P. A. Sharp, *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3, 737-747.
623. E. Pennisi, *Science*, 2013, 341, 833-836.
624. P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84, 7413-7417.
625. A. Hamm, N. Krott, I. Breibach, R. Blindt and A. K. Bosserhoff, *Tissue Engineering*, 2002, 8, 235-245.
626. L. Kaestner, A. Scholz and P. Lipp, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25, 1171-1176.
627. S. J. Adelstein, F. J. Manning and Institute of Medicine (U.S.). Committee on Biomedical Isotopes., *Isotopes for Medicine and The Life Sciences*, National Academy Press, Washington, D.C., 1995.
628. R. A. Laskey and A. D. MILLS, *European Journal of Biochemistry*, 1975, 56, 335-341.
629. R. A. Laskey, *Methods in Enzymology*, 1979, 65, 363-371.
630. R. F. Johnston, S. C. Pickett and D. L. Barker, *Electrophoresis*, 1990, 11, 355-360.
631. D. Voytas and N. Ke, *Currents Protocols in Molecular Biology*, 2001, Appendix 3, Appendix 3A.
632. L. P. McIntosh and F. W. Dahlquist, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1990, 23, 1-38.
633. D. M. LeMaster, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1990, 23, 133-174.
634. V. Tugarinov, P. M. Hwang, J. E. Ollerenshaw and L. E. Kay, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, 10420-10428.
635. E. H. Strickland, J. Horwitz and C. Billups, *Biochemistry*, 1970, 9, 4914-4921.
636. S. Doose, H. Neuweiler and M. Sauer, *ChemPhysChem*, 2009, 10, 1389-1398.
637. M. Sun and P. S. Song, *Photochemistry and Photobiology*, 1977, 25, 3-9.
638. E. Burstein, N. Vedenkina and M. Ivkova, *Photochemistry and Photobiology*, 1973, 18, 263-279.
639. M. Kronman and L. Holmes, *Photochemistry and Photobiology*, 1971, 14, 113-134.
640. R. Ballew, J. Sabelko and M. Gruebele, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93, 5759-5764.
641. J. T. Vivian and P. R. Callis, *Biophysical Journal*, 2001, 80, 2093-2109.
642. M. R. Eftink and C. A. Ghiron, *Analytical Biochemistry*, 1981, 114, 199-227.
643. A. Grinvald and I. Z. Steinberg, *Analytical Biochemistry*, 1974, 59, 583-598.
644. J. C. Brochon, *Methods in Enzymology*, 1994, 240, 262-311.
645. B. N. Jones, D. U. Quang-Dang, Y. Oku and J. D. Gross, *Methods in Enzymology*, 2008, 448, 23-40.
646. M. Dixon, *Biochemical Journal*, 1953, 55, 170.
647. P. Atkins and J. de Paula, *Physical Chemistry*, W. H. Freeman, 2009.
648. K. E. Van Holde, W. C. Johnson and P. S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry*, Pearson/Prentice Hall, 2006.
649. M. H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, 2001.
650. J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III and N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Academic Press, 1995.
651. G. Bodenhausen and D. J. Ruben, *Chemical Physics Letters*, 1980, 69, 185-189.
652. L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin and A. Bax, *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 1990, 89, 496-514.
653. D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia and A. Bax, *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111, 1515-1517.
654. L. Fielding, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2007, 51, 219-242.
655. M. Betz, K. Saxena and H. Schwalbe, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10, 219-225.
656. C. Ludwig and U. L. Guenther, *Frontiers in Bioscience*, 2009, 14, 4565-4574.
657. L. Fielding, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2003, 3, 39-53.
658. P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak and S. W. Fesik, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 12257-12261.
659. S. J. Gibbs and C. S. Johnson, *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 1991, 93, 395-402.
660. B. Meyer, T. Weimar and T. Peters, *European Journal of Biochemistry*, 1997, 246, 705-709.
661. M. Mayer and B. Meyer, *Angewandte Chemie International Edition*, 1999, 38, 1784-1788.
662. J. L. Wagstaff, S. L. Taylor and M. J. Howard, *Molecular BioSystems*, 2013, 9, 571-577.
663. J. Angulo, P. M. Enriquez-Navas and P. M. Nieto, *Chemistry*, 2010, 16, 7803-7812.
664. C. Ludwig, P. J. Michiels, X. Wu, K. L. Kavanagh, E. Pilka, A. Jansson, U. Oppermann and U. L. Günther, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 51, 1-3.
665. L. Whitmore and B. A. Wallace, *Biopolymers*, 2008, 89, 392-400.
666. K. E. Van Holde, W. C. Johnson and P. S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry*, Prentice Hall, 2006.
667. B. J. Frisken, *Applied Optics*, 2001, 40, 4087-4091.
668. Z. Yu, J. C. Reid and Y. P. Yang, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 102, 4284-4290.
669. A. L. Papish, L. W. Tari and H. J. Vogel, *Biophysical Journal*, 2002, 83, 1455-1464.
670. K. Gast, D. Zirwer, M. Müller-Frohne and G. Damaschun, *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1998, 7, 2004.
671. J. Stepinski, M. Bretner, M. Jankowska, K. Felczak, R. Stolarski, Z. Wieczorek, A. L. Cai, R. E. Rhoads, A. Temeriusz, D. Haber and E. Darzynkiewicz, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 1995, 14, 717-721.
672. J. J. Richard, K. E. Burke, J. W. O'Laughlin and C. V. Banks, *Journal of the American Chemical Society*, 1961, 83, 1722-1726.
673. D. A. Nicholson and H. Vaughn, *The Journal of Organic Chemistry*, 1971, 36, 1835-1837.



674. B. T. Chamberlain, T. G. Upton, B. A. Kashemirov and C. E. McKenna, *The Journal of Organic Chemistry*, 2011, 76, 5132-5136.
675. Q. F. Ma, P. C. Babbitt and G. L. Kenyon, *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110, 4060-4061.
676. D. Ecke, M. E. Tulapurkar, V. Nahum, B. Fischer and G. Reiser, *British Journal of Pharmacology*, 2006, 149, 416-423.
677. K. F. Sheu, J. P. Richard and P. A. Frey, *Biochemistry*, 1979, 18, 5548-5556.
678. M. Wright and A. D. Miller, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14, 2813-2816.
679. K. S. Gates, T. Nooner and S. Dutta, *Chemical Research in Toxicology*, 2004, 17, 839-856.
680. P. Acharya, B. Nawrot, M. Sprinzl, C. Thibaudeau and J. Chattopadhyaya, *Journal of Chemical Society. Perkin Transactions 2*, 1999, 1531-1536.
681. D. T. Major, V. Nahum, Y. Wang, G. Reiser and B. Fischer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, 47, 4405-4416.
682. S. Raut, A. Heck, J. Vishwanatha, P. Sarkar, A. Mody, R. Luchowski, Z. Gryczynski and I. Gryczynski, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2011, 102, 241-245.
683. A. Beeby and A. E. Jones, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2001, 64, 109-116.
684. R. F. Turchiello, M. T. Lamy-Freund, I. Y. Hirata, L. Juliano and A. S. Ito, *Biophysical Chemistry*, 1998, 73, 217-225.
685. A. Wypijewska, E. Bojarska, M. Lukaszewicz, J. Stepinski, J. Jemielity and E. Darzynkiewicz, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2011, 40, 65-65.
686. R. Contreras, H. Cheroutre, W. Degrave and W. Fiers, *Nucleic Acids Research*, 1982, 10, 6353-6362.
687. J. Zuberek, J. Jemielity, A. Niedzwiecka, J. Stepinski, A. Wyslouch-Cieszynska, R. Stolarski and E. Darzynkiewicz, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 2003, 22, 1707-1710.
688. J. Jemielity, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Czarniecki, J. Zuberek and E. Darzynkiewicz, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2012, 10, 8570-8574.
689. M. V. Deshmukh, Y. Oku and J. D. Gross, *Biomolecular NMR Assignments*, 2007, 1, 17-18.
690. S. N. Floor, B. N. Jones and J. D. Gross, *RNA Biology*, 2008, 5, 189-192.
691. R. A. Aglietti, S. N. Floor, C. L. McClendon, M. P. Jacobson and J. D. Gross, *Structure*, 2013, 21, 1571-1580.
692. W. Su, S. V. Slepnev, M. K. Slevin, S. M. Lyons, M. Ziemniak, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, W. F. Marzluff and R. E. Rhoads, *RNA*, 2013, 19, 1-16.

