

Synteza analogów nukleotydów modyfikowanych lub sfunkcjonalizowanych w łańcuchu oligofosforanowym oraz ich zastosowania w badaniu procesów o znaczeniu biologicznym lub terapeutycznym



**dr Joanna Kowalska**  
Uniwersytet Warszawski  
Wydział Fizyki  
Zakład Biofizyki  
ul. Pasteura 5  
02-093 Warszawa

Autoreferat do wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego

Warszawa, marzec 2019

## 1. Imię i Nazwisko.

Joanna Kowalska

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk fizycznych w zakresie fizyki (z wyróżnieniem), Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki, 13 grudnia 2010, „Synteza i własności analogów końca 5' mRNA (kapu) modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym oraz ich zastosowanie w badaniach nad mechanizmami degradacji mRNA i translacji białka”, promotor dr hab. Edward Darzynkiewicz

Magisterium na kierunku chemia (z wyróżnieniem, studia jednolite magisterskie w ramach Kolegium MISMaP), Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, 27 czerwca 2006, „Synteza i badanie właściwości analogów końca 5' mRNA zawierających resztę tiofosforanową”, promotor dr Jacek Jemielity

Licencjat na kierunku biotechnologia w zakresie biologii molekularnej (studia I stopnia w ramach MISMaP), Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, 8 lipca 2005, „Rola domen RRM w oddziaływaniach RNA – białko”, promotor dr Agnieszka Dzikowska

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

luty 2011 – obecnie, adiunkt naukowo-dydaktyczny, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski

październik 2010 – styczeń 2011 pracownik naukowo-techniczny, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski (½ etatu)

## 4. OMÓWIENIE NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ ZAWARTYCH W PRACACH PRZEDSTAWIONYCH DO HABILITACJI

Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

### a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

„Synteza analogów nukleotydów modyfikowanych lub sfunkcjonalizowanych w łańcuchu oligofosforanowym oraz ich zastosowania w badaniu procesów o znaczeniu biologicznym lub terapeutycznym”

b) Cytowane w Autoreferacie oryginalne naukowe prace twórcze stanowiące podstawę wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego: (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

IF - współczynniki oddziaływania (impact factor) z roku opublikowania

H1. Kowalska, J., Osowniak, A., Zuberek, J. and Jemielity, J.\* (2012) Synthesis of nucleoside phosphosulfates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 3661-3664

IF 2.286 / Cyt: 10

**H2.** Dabrowski-Tumanski, P., Kowalska, J., Jemielity, J.\* (2013) Efficient and Rapid Synthesis of Nucleoside Diphosphate Sugars from Nucleoside Phosphorimidazolides. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013, 2147-2154

IF 2.762 / Cyt: 12

**H3.** Strenkowska, M., Wanat, P., Ziemniak, M., Jemielity, J.,\* Kowalska, J.\* (2012) Preparation of Synthetically Challenging Nucleotides Using Cyanoethyl P-Imidazolides and Microwaves. *Organic Letters*, 14, 4782-4785

IF 6.492 / Cyt: 34

**H4.** Baranowski, M.R., Nowicka, A., Rydzik, A.M., Warminski, M., Kasprzyk, R., Wojtczak, B.A., Wojcik, J., Claridge, T.D.W., Kowalska, J.\*, Jemielity, J.\* (2015) Synthesis of Fluorophosphate Nucleotide Analogues and Their Characterization as Tools for <sup>19</sup>F NMR Studies. *The Journal of Organic Chemistry*, 80, 3982-3997

IF 4.425 / Cyt: 18

**H5.** Wanat, P., Walczak, S., Wojtczak, B.A., Nowakowska, M., Jemielity, J. and Kowalska, J.\* (2015) Ethynyl, 2-Propynyl, and 3-Butynyl C-Phosphonate Analogues of Nucleoside Di- and Triphosphates: Synthesis and Reactivity in CuAAC. *Organic Letters*, 17, 3062-3065.

IF 6.492 / Cyt: 14

**H6.** Baranowski, M.R.#, Nowicka, A.#, Jemielity, J., Kowalska, J.\* (2016) A fluorescent HTS assay for phosphohydrolases based on nucleoside 5'-fluorophosphates: its application in screening for inhibitors of mRNA decapping scavenger and PDE-I. *Organic & biomolecular chemistry* 14 (20), 4595-4604

IF 3.235 / Cyt: 10

**H7.** Kasprzyk, R., Kowalska, J.,\* Wieczorek, Z., Szabelski, M., Stolarski, R. Jemielity, J.\* (2016) Acetylpyrene-labelled 7-methylguanine nucleotides: unusual fluorescence properties and application to decapping scavenger activity monitoring *Organic & biomolecular chemistry* 14 (16), 3863-3868

IF 3.235 / Cyt: 7

**H8.** Wanat P., Kasprzyk R., Kopcjal M., Sikorski P.J., Strzelecka D., Jemielity J., Kowalska J.\* (2018) ExciTides: NTP-derived probes for monitoring pyrophosphatase activity based on excimer-to-monomer transitions *Chemical Communications*, 54, 9773-9776

IF 6.290 / Cyt: 0

**H9.** Kozarski M., Kubacka D., Wojtczak B. A., Kasprzyk R., Baranowski M.R., Kowalska J.\* (2018) 7-Methylguanosine monophosphate analogues with 5'-(1, 2, 3-triazoyl) moiety: Synthesis and evaluation as the inhibitors of cNIIIB nucleotidase, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(1), 191-199, 2018

IF 2.793 / Cyt: 0

**H10.** Mlynarska-Cieslak A., Depaix A., Grudzien-Nogalska E., Sikorski P.J., Warminski M., Kiledjian M., Jemielity J., Kowalska J.\* (2018) Nicotinamide Containing Di- and Trinucleotides as Chemical Tools for Studies of NAD-Capped RNAs, *Organic Letters*, 20, 23, 7650-7655

IF 6.492 / Cyt: 1

**H11.** Strzelecka, D., Chmielinski, S., Bednarek, S., Jemielity, J., Kowalska, J.\* (2017) Analysis of mononucleotides by tandem mass spectrometry: investigation of fragmentation

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

## Wprowadzenie

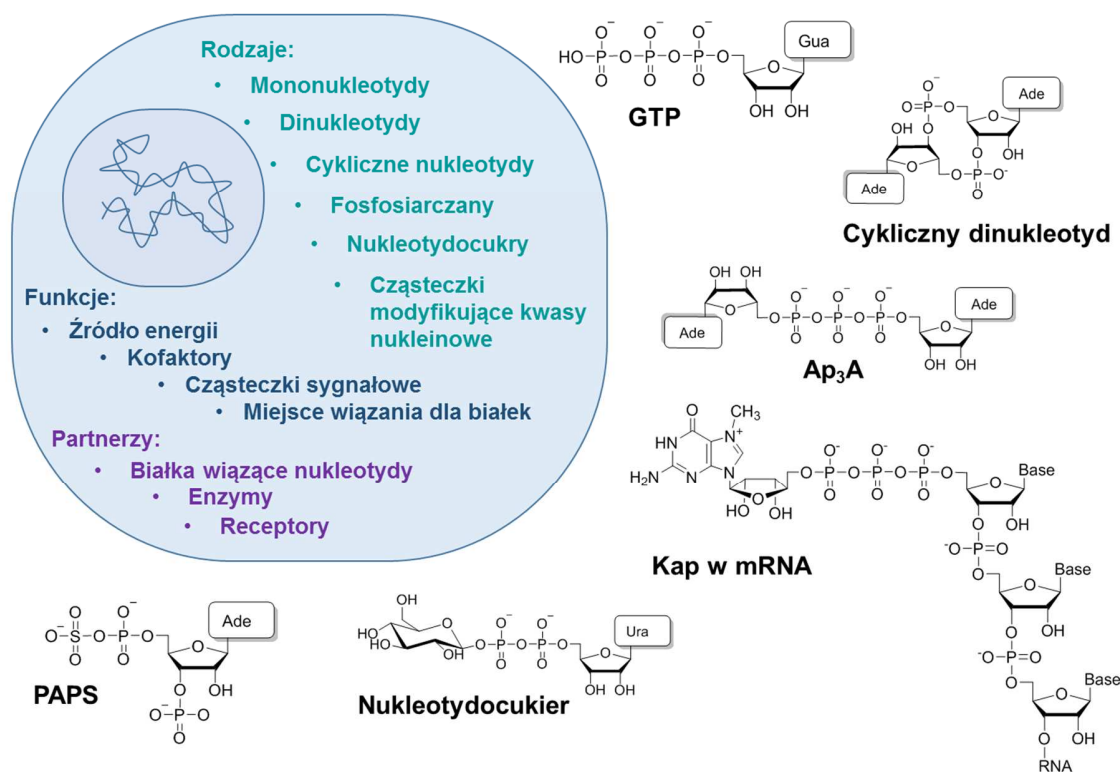
### 1. Małocząsteczkowe nukleotydy – różnorodna grupa związków naturalnych o ważnych funkcjach biologicznych

Małocząsteczkowe nukleotydy z grupy polifosforanów nukleozydów i dinukleozydów pełnią w organizmach żywych wiele kluczowych funkcji (Rys. 1). Trifosforany rybo- i deoksyrybonukleozydów służą w komórce jako **substraty do syntezy kwasów nukleinowych**, odpowiednio RNA i DNA. Niektóre nukleotydy, takie jak ATP lub GTP, są **źródłem energii** swobodnej potrzebnej wykorzystywanej do reakcji enzymatycznych przebiegających w organizmie. Ważnymi związkami są nukleotydydowe **kofaktory enzymatyczne**.  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  oraz  $\text{FAD}^+$  są kofaktorami enzymów z grupy oksydoreduktaz, ale pełnią również inne ważne funkcje w komórce. Trifosforan adenozy (ATP) jest uniwersalnym donorem grupy fosforanowej dla większości komórkowych kinaz, czyli enzymów regulujących aktywność małych cząsteczek i biopolimerów poprzez ich fosforylację. Podobnie, fosfosiarczan 3'-fosfoadenozy (PAPS) jest uniwersalnym donorem grupy siarczanowej dla enzymów z grupy sulfotransferaz. Kolejną grupą nukleotydydów o niezwykle ważnej roli są **cząsteczki sygnałowe pochodzenia nukleotydogo**. GTP jest niezbędny do przekazywania sygnałów przez receptory związane z białkami G. Nukleotydy cykliczne takie jak cAMP i cGMP są cząsteczkami sygnałowymi drugiego rzędu, które w szlakach przekazywania sygnałów odbierają, wzmacniają i przekazują do efektorów informację uzyskaną od receptora związanego z ligandem. Nukleotydy typu  $\text{Ap}_n\text{A}$ ,  $\text{Ap}_n\text{U}$ ,  $\text{Ap}_n$ ,  $\text{Up}_n$  ( $n=2-4$ ) oraz nukleotydocukry pełnią funkcję zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnalizacyjnych wiążących się z receptorami metabotropowymi, czyli receptorami transmembranowymi odbierającymi sygnały z przestrzeni zewnątrzkomórkowej i przekazującymi je do wnętrza komórki.(1) Nukleotydocukry biorą również udział w przemianach monosacharydów i reakcjach transglikozylacji, służąc jako substraty do syntezy oligosacharydów. Przykładem tego typu związku jest urydylo-difosforan glukozy (UDPG), który jest substratem dla enzymu glukozylotransferazy, a zatem źródłem aktywnej formy glukozy w reakcjach metabolicznych. (1) Wreszcie, oligosfosforany nukleozydów są często **cząsteczkami modyfikującymi końce kwasów nukleinowych**, w szczególności RNA, umożliwiającymi bardzo ścisłą regulację procesów ekspresji genów. Najlepiej poznanym przykładem tego typu jest kap 7-metyloguaninowy obecny na końcu 5' mRNA u eukariontów, jednak najnowsze badania wskazują, że na końcach 5' RNA można znaleźć również inne nukleotydy, m.in. NAD, FAD, czy dinukleotydy adeninowe.(2-4)

Ze względu na liczne i złożone funkcje nukleotydydów, ich endogenne poziomy są ściśle kontrolowane, zarówno na etapach biosyntezy, jak i degradacji. Zaburzenie tej kontroli, może prowadzić zarówno do niedoboru kluczowych nukleotydydów, jak i do nagromadzenia ich w stężeniach toksycznych, a w konsekwencji, do rozwoju stanów chorobowych. Jednym z ważnych elementów regulacji puli

nukleotydów dostępnych dla poszczególnych procesów enzymatycznych lub sygnalizacyjnych jest kontrola ich stopnia fosforylacji. Ważnymi klasami enzymów zaangażowanymi w te procesy są fosfatazy i pirofosfatazy katalizujące reakcje hydrolizy, odpowiednio, wiązań fosfoestrowych i pirofosforanowych występujących w nukleotydach. Enzymy te biorą udział w kluczowych procesach biosyntezy, degradacji i naprawy nukleotydów i kwasów nukleinowych. Zaburzenia aktywności wielu z nich powiązano z rozwojem chorób nowotworowych, metabolicznych, czy nerwowo-mięśniowych i zidentyfikowano je, jako cele terapeutyczne dla tych chorób. Od wielu lat na świecie prowadzone są badania nad poznaniem struktur i mechanizmów działania pirofosfataz istotnych w kontekście medycznym oraz poszukiwane są małowcząsteczkowe ligandy modulujące ich aktywność, które mogą być pomocne w zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za regulację aktywności pirofosfataz, jak i dać początek nowym terapiom.

## Oligofosforany nukleozydów w komórce



Rys. 1. Małowcząsteczkowe nukleotydy w komórce – przegląd struktur i funkcji biologicznych.

Zaprojektowane w racjonalny sposób analogi nukleotydów mogą być pomocne w rozumieniu naturalnych procesów jak i zaburzeń związanych z metabolizmem nukleotydów, ich diagnostyce oraz zaproponowaniu rozwiązań terapeutycznych. Analogi znakowane mogą wykorzystane do śledzenia procesów biologicznych związanych z nukleotydami zarówno *in vitro* („w próbówce”) jak i *in vivo* (rozumianym tutaj jako żywa komórka lub organizm) oraz do poszukiwania związków chemicznych wpływających na te procesy w pożądany sposób (badania przesiewowe w poszukiwaniu potencjalnych leków).(5) Analogi uodpornione na degradację enzymatyczną mogą być natomiast

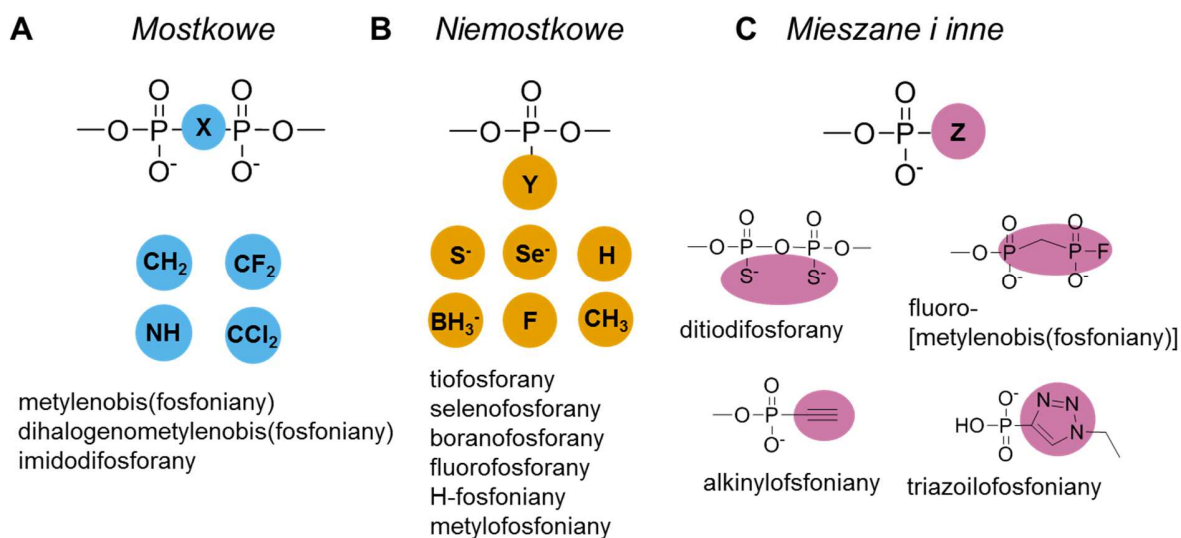
wykorzystywane jako ligandy w badaniach strukturalnych i biofizycznych, jak i selektywne inhibitory naturalnych procesów.

Fizjologiczne znaczenie nukleotydów i ich pochodnych implikuje również ogromny potencjał medyczny dla syntetycznych analogów nukleotydów. Pochodne nukleotydów i analogi nukleotydów znalazły zastosowanie jako terapeutyki przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe. Aktywnymi formami tych leków są ich ufosforylowane metabolity, czyli nukleotydy. Niestety, większość syntetycznych małowymiarowych nukleotydów, ze względu na swoją wysoce polarną budowę i wypadkowy ładunek ujemny, nie jest zdolnych do przenikania przez błony biologiczne na zasadzie biernej dyfuzji, co istotnie ogranicza ich zastosowania medyczne. Jednakże, dzięki rozwojowi metod dostarczania polarnych nukleotydów do komórki (konceptcja „pro-drugs”, wehikuły wirusowe, nanożele, kapsułkowanie, zamykanie w liposomach) pojawia się coraz więcej przykładów projektowania tego typu związków jako eksperymentalnych farmaceutyków.(6)

## **2. Nukleotydy modyfikowane w grupach fosforanowych jako narzędzia molekularne i potencjalne terapeutyki**

Zarówno przy projektowaniu analogów nukleotydów jako terapeutyków jak i narzędzi badawczych takich jak substraty do badań biochemicznych, ligandy do badań strukturalnych i biofizycznych, czy cząsteczki biologicznie aktywne do badań prowadzonych na modelach komórkowych i żywych organizmach, niezmiernie istotnym jest wybór miejsca i sposobu modyfikacji. Metody standardowej chemii medycznej skupiają się wprowadzaniu modyfikacji chemicznych w obrębie reszt rybozy i zasad azotowych nukleotydów. Od wielu lat intensywnie rozwijane są także metody syntezy nukleotydów modyfikowanych i sfunkcjonalizowanych w resztach fosforanowych. Pierwszymi zsyntezowanymi analogami nukleotydów były metylenobis(fosfonianowe) i tiofosforanowe pochodne nukleotydów, otrzymane w latach sześćdziesiątych XX w.(7) Przez kilkadziesiąt lat, które upłynęły od momentu opublikowania tych pionierskich syntez, opracowano wiele innych sposobów modyfikacji reszt fosforanowych oraz zaproponowano dla nich liczne zastosowania w syntezie biologicznie ważnych nukleotydów i kwasów nukleinowych. Modyfikacje te obejmują zarówno zastąpienie pojedynczych atomów innymi atomami lub niewielkimi podstawnikami, jak i wprowadzanie dużych podstawników i grup funkcyjnych (Rys. 2). Niewielkie modyfikacje reszt fosforanowych mogą w wpływać na właściwości cząsteczki takie jak jej geometria, właściwości kwasowo-zasadowe, wypadkowy ładunek w warunkach fizjologicznych, polaryzowalność i rozkład ładunku w reszcie (oligo)fosforanowej, czy zdolność do koordynacji kationów metali i kationów organicznych. To z kolei może pociągać zmiany powiązanych ze sobą właściwości biologicznych takich jak powinowactwo, a tym samym selektywność, względem obranego celu białkowego, podatność na degradację enzymatyczną, czy stabilność metaboliczna. Modyfikacja reszt fosforanowych większymi podstawnikami może dodatkowo wpływać na ich przenikalność przez błony biologiczne oraz umożliwiać ich następczą funkcjonalizację, np. poprzez znakowanie fluorescencyjne lub biokoniugację.

Przedstawione w niniejszym autoreferacie badania przyczyniły się do rozwoju chemii nukleotydów modyfikowanych w resztach fosforanowych poprzez opracowywanie metod syntezy nowych analogów zawierających znane już modyfikacje, projektowanie i syntezę nowych rodzajów modyfikacji fosforanowych (wybrane przykłady przedstawiono na Rys. 2C), jak i poszukiwaniu nowych zastosowań dla tego typu związków w badaniach biofizycznych i biochemicznych oraz rozwiązywaniu problemów biologicznych.



Rys. 2. Przykłady modyfikacji reszt fosforanowych w nukleotydach.

### 3. Synteza nowych analogów nukleotydów modyfikowanych lub sfunkcjonalizowanych w łańcuchu fosforanowym

Synteza nukleotydów jest wyzwaniem ze względu na ich silnie polarną budowę oraz obecność licznych ugrupowań jonizowalnych (kwasowe reszty fosforanowe lub sole fosforanów) utrudniających stosowanie warunków reakcji i metod oczyszczania typowych dla klasycznej chemii organicznej. Kluczowym i często najtrudniejszym do realizacji etapem syntezy nukleotydów i ich analogów jest tworzenie wiązania pirofosforanowego. Najczęściej etap ten jest realizowany poprzez reakcję odpowiednio zaktywowanej, elektrofilowej pochodnej nukleotydowej z fosforanowym nukleofilem. W cyklu prac [H1–H5](#), wspólnie ze współpracownikami, podjęliśmy się eksploracji możliwości wykorzystania chemii fosforoimidazolidów do syntezy wybranych nukleotydowych celów syntetycznych ([Rys. 3](#)). Obranymi przez nas celami syntetycznymi były zarówno naturalne nukleotydy ze zmodyfikowanym lub sfunkcjonalizowanym w łańcuchu fosforanowym takie jak fosfosiarczany nukleozydów (praca [H1](#)), nukleotydocukry (praca [H2](#)), jak również syntetyczne analogi nukleotydów zmodyfikowane w łańcuchu fosforanowym (praca [H3](#)). Cele te zostały wybrane ze względu na ich znaczenie biologiczne oraz na poważne ograniczenia istniejących wówczas metod syntetycznych dających dostęp do tego typu związków. W pracach [H1](#), [H2](#), [H4](#) i [H5](#) zademonstrowaliśmy, że w reakcjach aktywowanych imidazolem nukleotydów oprócz typowych nukleofili takich jak nukleozydo 5'-mono- i difosforany-, można zastosować również nietypowe nukleofile takie jak fosforan monosacharydu, anion siarczanowy, fluorkowy, fluorofosforanowy, czy funkcjonalizowane grupą alkinową aniony C-fosfonianowe ([Rys. 3A](#)). W każdym przypadku kluczem do wydajnej syntezy była optymalizacja warunków reakcji, w szczególności dobór rozpuszczalnika, stężeń reagentów, odpowiedniego przeciwjonu alkiloamoniowego dla ujemnie naładowanego nukleofila, oraz stężenia i rodzaju chlorku metalu dwuwartościowego, który zwiększa rozpuszczalność pozostałych reagentów i jest mediatorem reakcji. W większości przypadków stosowaliśmy handlowo dostępne nukleofile, które wymagały jedynie przekształcenia przed reakcją w odpowiednią sól alkiloamoniową. Wyjątkiem była praca [H5](#), w której zaprojektowaliśmy oraz opracowaliśmy metody syntezy dla odpowiednich podjednostek C-fosfonianowych zawierających funkcję alkinową. W pracy tej zoptymalizowaliśmy

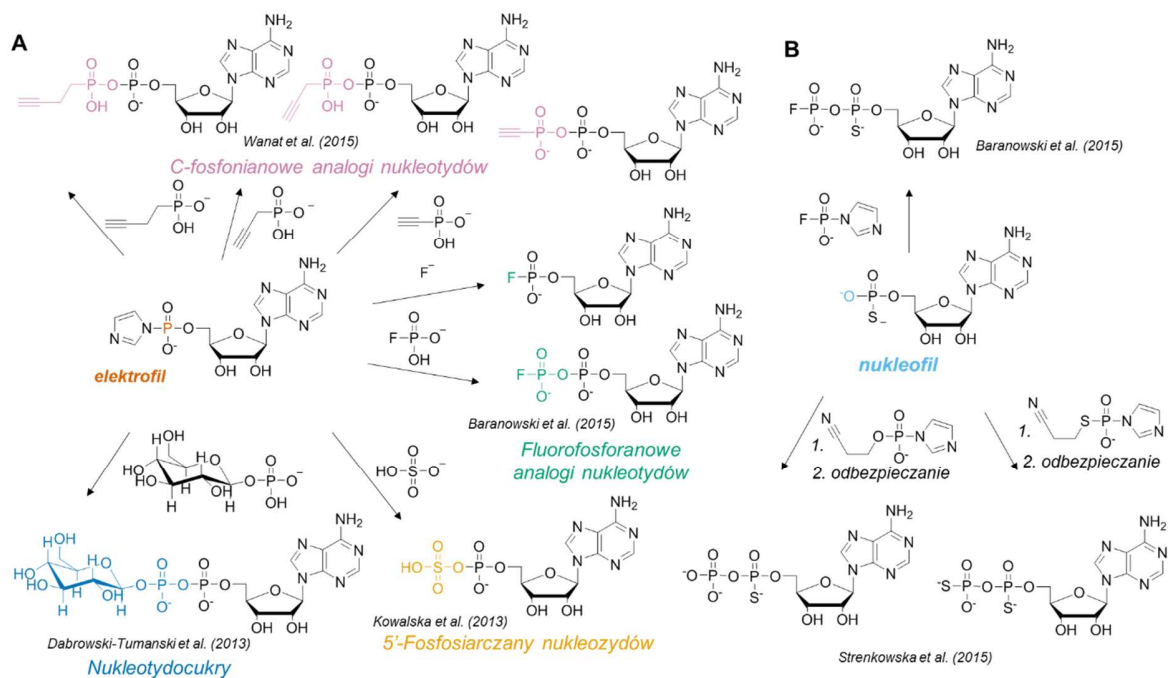
również warunki reakcji cykloaddycji azydkowo-alkinowej pomiędzy fosfonianowymi analogami nukleotydów a różnymi związkami funkcjonalizowanymi grupą azydkową m.in. nukleozydami, biotyną, czy znacznikami fluorescencyjnymi. Metodologia syntezy „klikalnych” podjednostek fosfonianowych i nukleotydów je zawierających opisana w pracy H5 stała się punktem wyjścia dla kilku kolejnych projektów, których wyniki opublikowaliśmy w pracach H8, H9 i (8).

Wyniki powyższych badań uświadomiły nam jednak, że istnieją cele syntetyczne, dla których próby syntezy za pomocą opisanego wyżej podejścia nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. W szczególności zawodzi ono gdy otrzymanie aktywowanej, elektrofilowej pochodnej nukleotydu jest wyzwaniem syntetycznym lub pochodna ta wykazuje niepożądaną reaktywność. Trudności tego typu napotykaliliśmy przede wszystkim w przypadkach gdy nukleotyd zawierał więcej niż dwie grupy fosforanowe lub modyfikacje w postaci grupy tiofosforanowej lub boranofosforanowej. Aby pokonać tego typu wyzwania, w pracy H3 opracowaliśmy nowe elektrofilowe reagenty, które umożliwiły wydłużenie łańcucha oligofosforanowego w reakcjach z nieaktywowanymi nukleotydami (Rys. 3B).<sup>1</sup> Reagenty te to zabezpieczone grupą 2-cyanoetylową i aktywowane imidazolem elektrofilowe syntony umożliwiające wydłużanie łańcucha fosforanowego w dowolnie modyfikowanych nukleotydach bez konieczności ich uprzedniej aktywacji. Skuteczność tego podejścia, które można nazwać „odwrotną aktywacją”, zademonstrowaliśmy poprzez otrzymanie serii 23 nukleotydów, których synteza znanymi metodami byłaby niezwykle trudna a nawet nieosiągalna. W puli tej znalazły się di-, tri-, a nawet tetrafosforany nukleotydów zawierające w łańcuchu fosforanowym różnorodne modyfikacje, w tym metylenobisfosfonianową, imidodifosforanową, tiofosforanową, boranofosforanową, a także ich kombinacje nigdy wcześniej nie opublikowane w literaturze. Jednymi z najbardziej wymagających celów syntetycznych były nukleotydy posiadające dwie sąsiadujące ze sobą grupy tiofosforanowe – opracowana w pracy H3 metodologia ich syntezy pozwoliła na późniejsze otrzymanie zestawu ditiodifosforanowych analogów końca 5' mRNA (analogi 2S), które charakteryzowały się wysoką odpornością na degradację enzymatyczną oraz nadawały mRNA wyjątkowo korzystne właściwości translacyjne (9). „Odwrotną aktywację” wykorzystaliśmy również w pracy H4 do otrzymania nukleotydów i oligonukleotydów zawierających resztę fluorofosforanową, których otrzymanie standardowym sposobem okazało się mało wydajne. Umożliwiło to wydajną syntezę nukleotydów zawierających kombinację modyfikacji fluorofosforanowej z innymi modyfikacjami łańcucha fosforanowego a także 5'-fluorodifosforylowanych oligonukleotydów.

---

<sup>1</sup> Badania nad otrzymaniem opisanych reagentów były częściowo finansowane z kierowanych przeze mnie projektów: IUVENTUS Plus nr IP 2010 020170 „Synteza i zastosowania polifosforanów nukleotydów i ich analogów” oraz SONATA, nr UMO-2011/01/D/ST5/05869, „Koniugaty analogów końca 5' mRNA z nanomateriałami i biomolekułami o potencjalnym zastosowaniu w farmakologii lub diagnostyce”.





Rys. 3. Zastosowania imidazolowych pochodnych w syntezie analogów nukleotydów (na podstawie prac H1–H5). A) Syntezy oparte na reakcjach imidazolowych pochodnych nukleotydów (reprezentowanych tutaj przez 5'-imidazolofosforan adenozy) z różnymi nukleofilami; B) Syntezy z wykorzystaniem elektrofilowych odczynników fosforylujących i nieaktywowanych nukleotydów modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym (reprezentowanych tutaj przez 5'-tiofosforan adenozy). Dla uproszczenia na schemacie nie umieszczono warunków reakcji.

#### 4. Poszukiwania nowych zastosowań dla analogów nukleotydów modyfikowanych w grupach fosforanowych

Opracowanie wydajnych metod syntezy opisanych klas nukleotydów modyfikowanych w łańcuchu fosforanowym umożliwiło poszukiwanie nowych zastosowań badawczych dla tych związków. Prace, na których opiera się niniejszy autoreferat dotyczyły kilku potencjalnych zastosowań, wymienionych poniżej:

- a) wykorzystanie modyfikowanych analogów nukleotydów jako ligandów w badaniach biofizycznych nad kompleksami białko-nukleotyd

*Badania te dotyczyły przede wszystkim fosfosiarzanych nukleotydów i fluorofosforanów nukleotydów jako ligandów dla białka eIF4E. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach H1 i H4, ale nie będą szczegółowo omawiane w niniejszym autoreferacie.*

- b) wykorzystanie analogów nukleotydów i oligonukleotydów znakowanych atomem fluoru w badaniach  $^{19}\text{F}$  NMR

*Badania te dotyczyły zastosowania fluorofosforanów nukleotydów jako narzędzi do badania procesów istotnych biologicznie takich jak degradacja enzymatyczna czy hybrydyzacja oligonukleotów. Wyniki zostały opublikowane głównie w pracy H5 i zostały krótko omówione w rozdziale 4.1.*

c) wykorzystanie modyfikowanych lub fluorescencyjnie znakowanych analogów nukleotydów jako alternatywnych substratów enzymatycznych umożliwiających monitorowanie aktywności enzymów z grupy pirofosfataz.

*Badania te dotyczyły zastosowania fluorofosforanów nukleotydów w połączeniu z sondami fluorogenicznymi oraz fluorescencyjnie znakowanych nukleotydów w badaniach aktywności biologicznie ważnych pirofosfataz ze szczególnym uwzględnieniem enzymu DcpS. Wyniki te zostały opublikowane w pracach H6, H7 i H8 oraz zostały krótko omówione w rozdziale 4.2.*

Ponadto, czerpiąc inspirację z najnowszych doniesień na temat biologicznych funkcji nukleotydów oraz enzymów je metabolizujących, podjęliśmy się syntezy dwóch rodzajów starannie zaprojektowanych analogów nukleotydów jako narzędzi do badania interesujących nas procesów biologicznych.

*Badania te dotyczą syntezy odpornych na degradację analogów NAD umożliwiających syntezę stabilnych cząsteczek NAD-RNA oraz syntezy triazolowych analogów m<sup>7</sup>GMP jako potencjalnych inhibitorów niedawno odkrytego enzymu cNIIIB. Wyniki te opublikowano w pracach H9 i H10 oraz zostały krótko omówione w rozdziałach 4.3 i 4.4.*

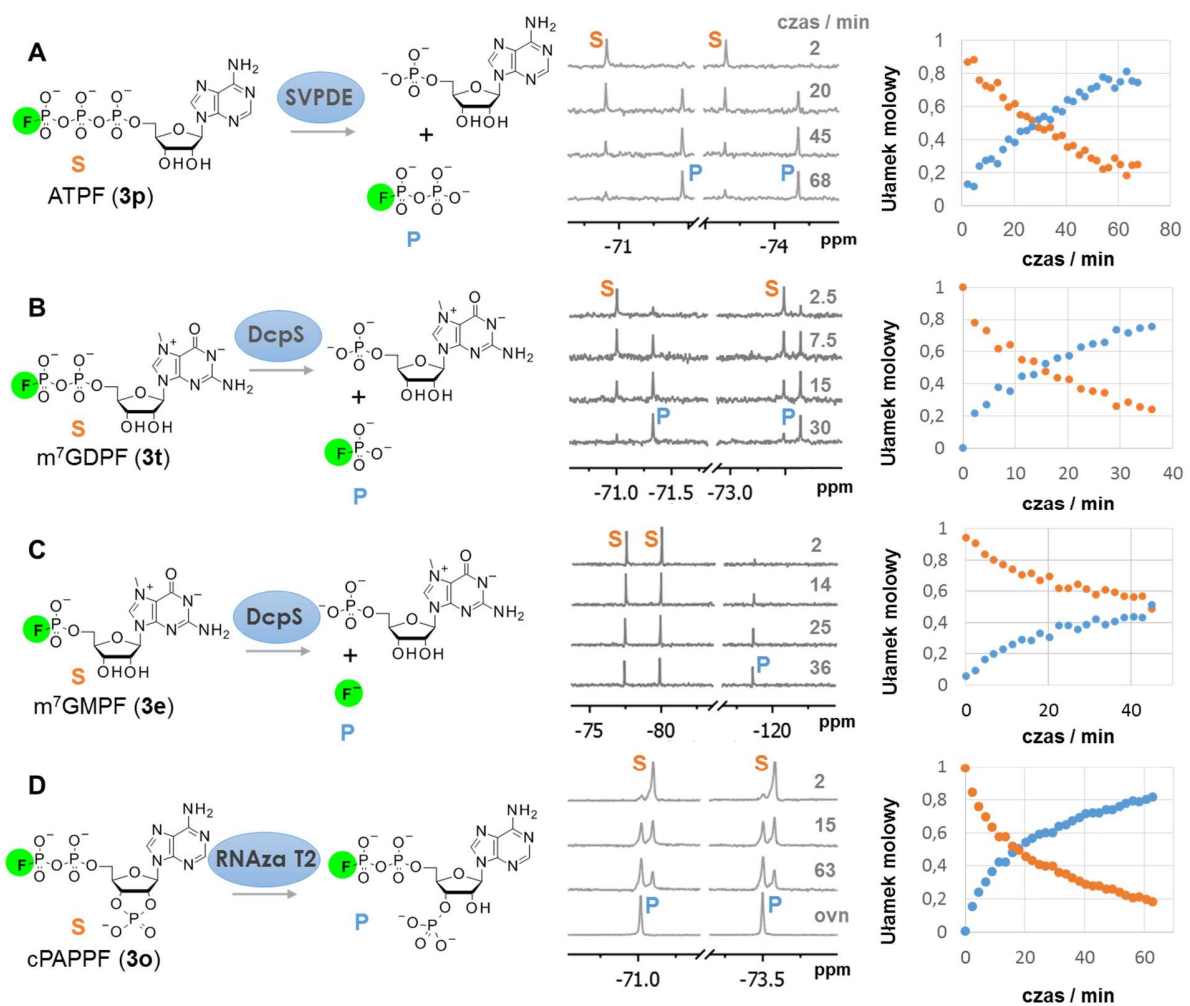
Jednym z najważniejszych warunków efektywnego prowadzenia badań w kierunku syntezy analogów nukleotydów jest umiejętność szybkiej i jednoznacznej identyfikacji produktów reakcji. Mimo iż standardowo używaną w tym kontekście metodą jest <sup>31</sup>P NMR, w prowadzonych przez nas badaniach nieoceniona okazała się również tandemowa spektrometria mas, która jest metodą znacznie szybszą, mniej materiałochłonną i mniej wymagającą w kontekście przygotowania próbki. Dzięki ogromnej liczbie analogów nukleotydów uzyskanych na przestrzeni lat mieliśmy możliwość zbadania ścieżek fragmentacji nukleotydów i ich analogów w sposób usystematyzowany i wyciągnięcia na ten temat ogólnych wniosków, które mogłyby być przydatne również dla innych naukowców prowadzących podobne badania.

*Wyniki te opublikowano w pracy H11 oraz zostały krótko omówione w rozdziale 4.5.*

#### **4.1. Zastosowanie fluorofosforanowych analogów nukleotydów do badania aktywności enzymatycznej.**

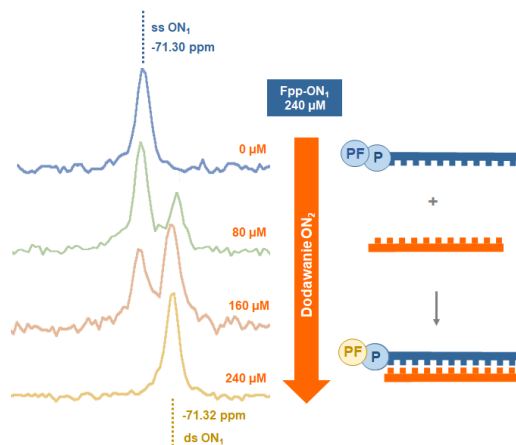
Wprowadzenie atomu fluoru do cząsteczki nukleotydu umożliwia jej detekcję i analizę metodą <sup>19</sup>F NMR. Właściwości spektroskopowe jądra <sup>19</sup>F takie jak spin równy ½, wysoki współczynnik magnetogiryczny i 100% abundancja sprawia, że czułość spektroskopii <sup>19</sup>F jest niemalże porównywalna z <sup>1</sup>H NMR. Jednakże, w przeciwieństwie do protonu, zawartość fizjologiczna fluoru (rozumiana tu jako zawartość w naturalnych związkach organicznych) jest bardzo niska. Dzięki temu fluor może być wykorzystywany jako znacznik molekularny dedykowany do badań <sup>19</sup>F NMR, zarówno w przypadku małych cząsteczkowych związków naturalnych jak i biomakromolekuł (10). Cząsteczka wyznakowana atomem fluoru może być selektywnie monitorowana metodą <sup>19</sup>F NMR nawet w złożonych mieszaninach chemicznych lub biologicznych. Znakowane fluorem sondy molekularne wykorzystuje się do śledzenia procesów enzymatycznych, obserwowania zmian konformacyjnych biocząsteczek, a także w poszukiwaniu ligandów wiążących cele terapeutyczne(10). W pracy H4

postanowiliśmy zweryfikować, czy fluorofosforanowe analogi nukleotydów mogą mieć zastosowanie w badaniach  $^{19}\text{F}$  NMR. W tym celu zsyntezowane w tej pracy analogi poddaliśmy szczegółowej charakterystyce metodami NMR. Badaliśmy zależności przesunięć chemicznych jąder  $^{19}\text{F}$  ( $\delta_{\text{F}}$ ) od struktury nukleotydów i czynników zewnętrznych takich jak pH roztworu, obecność jonów magnezu i różnych czynników buforujących. Okazało się, że atom fluoru w reszcie fluorofosforanowej jest bardzo czuły na zmiany w strukturze związku, ale relatywnie nieczuły na inne czynniki, co było dobrą przesłanką w kontekście potencjalnych zastosowań. W następnym etapie badań wybraliśmy kilka związków modelowych i poddaliśmy je działaniu enzymów z rodziny fosfohydrolaz. Monitorowanie próbek reakcyjnych za pomocą  $^{19}\text{F}$  NMR potwierdziło możliwość wykorzystania fluorofosforanowych analogów jako wszechstronnych cząsteczek reporterowych (Rys. 4).



Rys. 4. Zastosowanie fluorofosforanowych analogów nukleotydów do monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznych katalizowanych przez różne enzymy. A) Hydroliza ATPF przez fosfodiesterazę SVPDE; B) Hydroliza m<sup>7</sup>GTPF przez enzym DcpS; D) Hydroliza cPAPPF przez RNAzę T2 (badania opublikowane w pracy H4).

Innym interesującym przykładem zastosowania otrzymanych w pracy H4 związków jako sond molekularnych było wykorzystanie fluorodifosforylowanych oligonukleotydów do monitorowania tworzenia dwuniciowego DNA (Rys. 5). Ponadto, pokazaliśmy również, że metodą  $^{19}\text{F}$  NMR można również obserwować oddziaływanie fluorofosforanowych analogów nukleotydów z białkami wiążącymi. Obecnie kontynuujemy te badania w kierunku poszerzenia repertuaru procesów, które można obserwować dzięki zastosowaniu fluorofosforanowych analogów nukleotydów i oligonukleotydów.



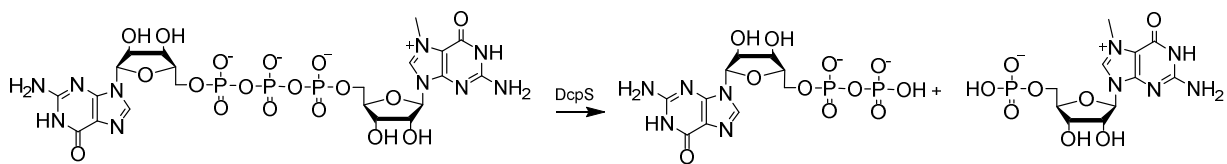
Rys. 5. Zastosowania 5'-fluorodifosforylowanego analogu oligonukleotydu (FppON<sub>1</sub>) do monitorowania tworzenia dupleksu z komplementarnym nieznakowanym oligonukleotydem (ON<sub>2</sub>; badania opublikowane w pracy H4).

#### 4.2. Poszukiwanie sond molekularnych do oznaczania i monitorowania aktywności enzymu DcpS

DcpS (Decapping Scavenger) to enzym z nadrodziny triad histydynowych (HIT) zaangażowany w proces degradacji mRNA u organizmów eukariotycznych, w tym u ludzi. W komórkach eukariotycznych istnieją dwie główne ścieżki degradacji mRNA, degradacja w kierunku 5'→3' oraz degradacja w kierunku 3'→5'. Obie ścieżki degradacji inicjowane są przez hydrolizę ogona poliA (deadenylację). Degradacja w kierunku 5'→3' przebiega następnie poprzez usunięcie znajdującej się na końcu 5' mRNA struktury kapu, złożonej z 7-metyloguanozyny połączonej mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem mRNA (Rys. 1). Usunięcie kapu (decapping) następuje w wyniku rozcięcia wiązania pomiędzy fosforanami  $\alpha$  i  $\beta$  przez enzym Dcp1-Dcp2 i uwolnienie 5'-difosforanu 7-metyloguanozyny ( $m^7\text{GDP}$ ) oraz 5'-monofosforanu mRNA. Dalszej degradacji mRNA dokonuje 5'-egzonukleaza.

W toku degradacji w kierunku 3'→5' mRNA jest degradowane przez egzozom począwszy od końca 3'. W wyniku takiej degradacji uwalniane są fragmenty mRNA w postaci 5'-monofosforanów nukleozydów oraz pozostałości końca 5', którymi mogą być dinukleotydowe reszty kapu lub zakończone kapem krótkie oligonukleotydy. Pozostałości końca 5' są następnie degradowane przez enzym DcpS. DcpS, który hydrolizuje kap pomiędzy fosforanami  $\gamma$  i  $\beta$  uwalniając 5'-monofosforan 7-metyloguanozyny ( $m^7\text{GMP}$ ) i drugi produkt, który jest odpowiednio 5'-difosforanem nukleozydu lub krótkiego oligonukleotydu (Rys. 6). Zakończone kapem mRNA pełnej długości nie są natomiast

substratami dla DcpS. Substratem DcpS nie jest również  $m^7\text{GDP}$ , (11) który jest produktem degradacji mRNA w kierunku  $5' \rightarrow 3'$ , może on jednak ulegać w komórce fosforylacji do  $m^7\text{GTP}$ , który jest substratem DcpS. Aktywność enzymu DcpS jest uważana za niezbędną dla homeostazy komórki, gdyż nadmierne nagromadzenie reszt kapu uwolnionych z mRNA w trakcie degradacji  $3' \rightarrow 5'$  mogłyby niekorzystnie wpływać na inne kluczowe procesy komórkowe zależne od kapu, np. hamować transport nukleocytoplazmatyczny lub translację. DcpS lokalizuje się zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym, gdzie prawdopodobnie zaangażowany jest w regulację splicingu.(12) W literaturze istnieją sugestie, że rola DcpS w komórce może być bardziej ogólna i wykracza poza jego dobrze scharakteryzowaną funkcję pełnioną w  $3' \rightarrow 5'$  degradacji mRNA obejmując również udział w dojrzewaniu mRNA.(13)



**Rys. 6. Schemat reakcji katalizowanej przez enzym DcpS na przykładzie dinukleotyduowego substratu,  $m^7\text{GpppG}$ .**

Biologiczne znaczenie enzymu DcpS odzwierciedlone jest również w jego powiązaniu z chorobami. Mutacje genu DcpS występują bardzo rzadko i zostały powiązane z zaburzeń rozwojowych m.in. upośledzenia intelektualnego, zwanego syndromem Al-Raqad.(14-16) Świadczy to o istotnej roli enzymu DcpS w rozwoju układu nerwowego. W roku 2008 doniesiono, że hamowanie aktywności DcpS za pomocą małocząsteczkowych inhibitorów może przynieść efekt terapeutyczny w rdzeniowej atrofii mięśniowej (spinal muscular atrophy, SMA). SMA jest powszechnie występującą chorobą neurodegeneracyjną występującą średnio raz na 6000 urodzeń.(12) Jest spowodowana niskim poziomem białka SMN (Survival Motor Neuron), które kodowane jest przez geny SMN. U ludzi występują dwa geny SMN: SMN1 oraz SMN2. Główną różnicą między nimi jest zmiana sekwencji w egzonie 7, która wpływa na splicing pre-mRNA. W rezultacie ekspresja genu SMN1 prowadzi do stabilnego i funkcjonalnego białka, natomiast białko eksprymowane z SMN2 jest skrócone. Mutacje w obu kopiach genu SMN1, w tym delecje, konwersje do genu przypominającego SMN2 i mutacje punktowe skutkują chorobą SMA. Osoby, które mają tylko jedną defektywną kopię SMN1 są nosicielami SMA, ale nie wykazują objawów chorobowych.

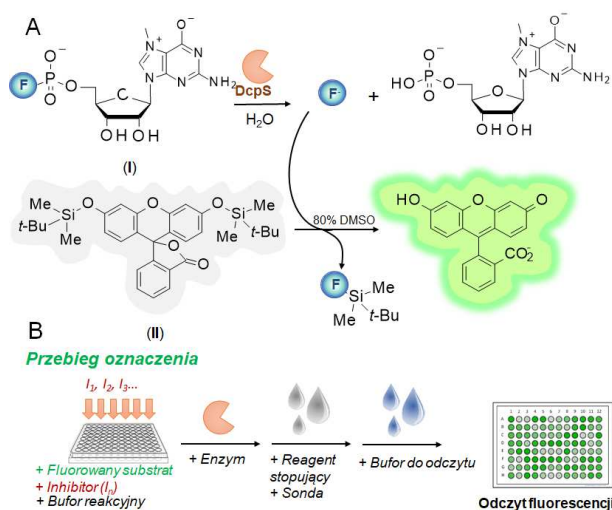
Homologiczny gen SMN2 nie może dostarczyć wystarczających ilości funkcjonalnego białka SMN, ale zaobserwowano, że więcej kopii genu SMN2 towarzyszy bardziej łagodnemu przebiegowi choroby. Dlatego też, uważa się, że związki powodujące wzrost ilości białka kodowanego przez gen SMN2 w komórce mogą być terapeutykami przeciwko SMA. Signh i współpracownicy przy użyciu badań przesiewowych odkryli, że niektóre 5-podstawione chinazoliny mogą zwiększać ekspresje genu SMN2 nawet dwukrotnie. Próbując rozwickłać mechanizm molekularny leżący u podstaw tej aktywacji, w innej pracy autorzy wykorzystując znakowanie radioaktywnie zidentyfikowali DcpS jako białko wiążące C5-podstawioną chinazolinę. Te eksperymenty zapoczątkowały trwające do chwili obecnej badania nad DcpS jako celem terapeutycznym w leczeniu SMA. Badania te wykazały między

innymi, że potencjał inhibitora skorelowany jest pozytywnie z poziomem aktywacji promotora genu SMN2. Potencjał terapeutyczny tych związków wykazano następnie *in vivo*, w modelu mysim, a najlepsze związki poddano badaniom klinicznym, które jednak do chwili dzisiejszej nie przyniosły sukcesu, prawdopodobnie ze względu na niespecyficzną toksyczność związków. Fakt ten uzasadnia dalsze poszukiwanie związków o potencjale terapeutycznym hamujących aktywność DcpS. Co więcej, najnowsze badania wskazują, że DcpS może być również celem terapeutycznym w leczeniu ostrej białaczki szpikowej (*acute myeloid leukemia, AML*).<sup>(17, 18)</sup>

Przedstawiony kontekst biologiczny sprawił, że postanowiliśmy podjąć się opracowania nowych metod oznaczania aktywności enzymu DcpS oraz poszukiwania jego inhibitorów. Cel ten stanowił przede wszystkim ciekawe wyzwanie badawcze, ale efekty jego realizacji mogły mieć również potencjalne znaczenie terapeutyczne. Pierwszym krokiem w kierunku opracowania metody poszukiwania enzymu DcpS było opisane w pracy [H4](#) odkrycie naszego zespołu, że ludzki enzym DcpS akceptuje jako substraty fluorofosforanowe analogi mono-, di- i trifosforanów 7-metyloguanozyny (odpowiednio  $m^7GMPF$ ,  $m^7GDPF$ ,  $m^7GTPF$ , [Rys. 4](#)). W trakcie reakcji z DcpS substraty te przekształcane są w  $m^7GMP$  oraz odpowiedni anion fluoro(oligo)fosforanowy lub fluorkowy. Stwierdziliśmy, że ponieważ odpowiednie substraty i produkty tych reakcji mają różne przesunięcia chemiczne, postęp każdej z reakcji można monitorować metodą  $^{19}F$  NMR. W przypadku  $m^7GMPF$  hydroliza przez DcpS prowadziła do uwolnienia jonu fluorkowego, co dało możliwość ilościowego oznaczenia ich stężenia z użyciem sond fluorogenicznych selektywnych względem anionu fluorkowego.

Wstępne wyniki potwierdzające przydatność fluorofosforanowych analogów substratów do oznaczania aktywności i poszukiwania inhibitorów enzymu DcpS, stały się treścią zgłoszenia patentowego (J.Kowalska, J.Jemielity, M.R.Baranowski, A.Nowicka, R.Kapsrzyk, „Fluorofosforanowe analogi końca 5' mRNA (kapu), sposób ich otrzymywania i zastosowanie”), a dalsze badania, zwieńczone publikacją pracy [H6](#), realizowane były w ramach kierowanego przeze mnie projektu LIDER. Celem projektu było opracowanie i zoptymalizowanie nowych metod umożliwiających wysokoprzepustowe przesiewowe (high throughput screening; HTS) badania ukierunkowane na poszukiwanie inhibitorów pirofosfataz nukleotydowych o znaczeniu terapeutycznym w oparciu o fluorofosforanowe analogi nukleotydów. Głównym obiektem zainteresowania był właśnie enzym DcpS jako cel terapeutyczny w rdzeniowej atrofii mięśniowej (SMA). W trakcie realizacji projektu przetestowaliśmy możliwość śledzenia aktywności enzymu zarówno za pomocą  $^{19}F$  NMR, jak i metodami fluorescencyjnymi opartymi na detekcji jonów fluorkowych. Metoda  $^{19}F$  NMR opierała się na porównaniu stopnia konwersji substratu w produkt w obecności inhibitora i w próbie kontrolnej określonego na podstawie intensywności odpowiednich sygnałów na widmie  $^{19}F$  NMR. W przypadku metody fluorescencyjnej potencjał inhibitora określany był poprzez porównanie ilości uwolnionego jonu fluorkowego w mieszaninie reakcyjnej zawierającej inhibitor z mieszaniną referencyjną niezawierającą inhibitora ([Rys. 7](#)). Substrat reakcji,  $m^7GMPF$ , pod wpływem enzymu DcpS ulega hydrolizie do nukleotydu ( $m^7GMP$ ) i anionu fluorkowego. Zawartość jonu fluorkowego oznaczana jest następnie poprzez reakcję z sondą fluorogeniczną zabezpieczoną grupami silylowymi ([Rys. 7](#)). Wysokie powinowactwo jonu fluorkowego do krzemu jest siłą napędową reakcji odbezpieczenia

sondy i powstawania sygnału fluorescencyjnego. Opracowanie tej metody wymagało szczegółowej optymalizacji wielu czynników takich jak stężenie substratu, stężenie enzymu, stężenie testowanego inhibitora, wybór sondy fluorogenicznej, skład buforu, skład roztworu do inkubacji z sondą, skład buforu do odczytu fluorescencji, temperatura i czas reakcji, czy sposób obróbki mieszaniny reakcyjnej w celu dezaktywacji enzymu przed pomiarem fluorescencji. Optymalizacja dała dobre rezultaty o czym świadczy m.in. współczynnik Z' o wartości powyżej 0,6.(19)



Rys. 7. Zasada działania metody poszukiwania inhibitorów enzymu DcpS opisana w pracy H6.

Opracowana metoda HTS umożliwiła nam podjęcie szerszej zakreślonych badań, których celem było znalezienie nowych inhibitorów enzymu DcpS. Wyniki tych badań zostały już częściowo opublikowane w kilku pracach (8, 20), (H6 i H9) i przyczyniły się do odkrycia jednego z najsilniejszych inhibitorów enzymu DcpS.(20)

W toku realizacji badań okazało się, że metoda oparta na detekcji fluorescencyjnej charakteryzuje się dobrą przepustowością i mniejszą materiałochłonnością niż metody oparte na <sup>19</sup>F NMR. Zaletą detekcji fluorescencyjnej jest przede wszystkim większa czułość, która zapewnia mniejsze zużycie substratu, enzymu i testowanego inhibitora. Niewątpliwą kolejną zaletą tej metody była również możliwość łatwego przystosowania jej do formatu 96-dołkowego, co umożliwiło usprawnienie pomiarów dzięki użyciu czytnika fluorescencji. Wadą metody fluorescencyjnej jest natomiast możliwość otrzymania zafałszowanych wyników w przypadku, gdy związek testowany jako inhibitor posiada właściwości fluorescencyjne lub zdolność do wygaszania fluorescencji. Warto jednak dodać, że w takim przypadku w celu dodatkowej weryfikacji aktywności inhibitora można zastosować metodę opartą o <sup>19</sup>F NMR.

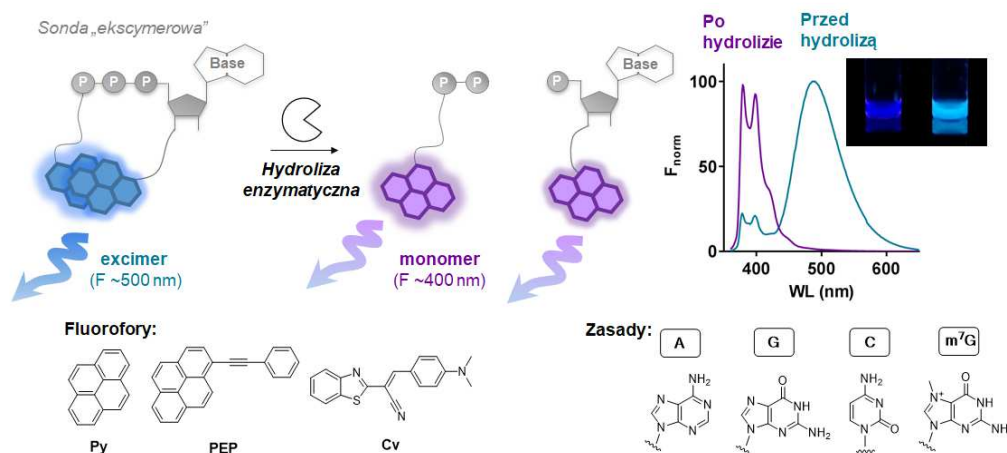
Kolejnym ograniczeniem metody HTS opartej o detekcję jonów fluorkowych jest konieczność oznaczenia stężenia jonów fluorkowych w roztworze zawierającym co najmniej 80% DMSO, co uniemożliwia monitorowanie reakcji enzymatycznej w sposób ciągły. W związku z tym wciąż poszukiwaliśmy alternatywnych metod badania aktywności enzymu DcpS. Szczególnie interesująca wydała nam się możliwość stworzenia sond molekularnych, które umożliwiałyby monitorowanie

aktywności enzymu DcpS metodami spektrofluorymetrycznymi w sposób ciągły. Pierwszymi zaprojektowanymi przez nas sondami o takich właściwościach były nukleotydy 7-metyloguaninowe znakowane acetylopirenem opracowane w pracy H7. Sondy te zostały otrzymane poprzez wydajną funkcjonalizację terminalnego ugrupowania tiofosforanowego w analogach nukleotydów za pomocą bromoacetylopirenu. Związki te wykazywały bardzo ciekawe właściwości fluorescencyjne, po wprowadzeniu do struktury nukleotydu 7-metyloguaninowego intensywność emisji reszty acetylopirenu wzrastała nawet trzykrotnie. Zjawisko to wykorzystaliśmy do opracowania alternatywnej metody badania inhibitorów enzymu DcpS, jak i do monitorowania aktywności enzymu DcpS w czasie rzeczywistym. Podjęliśmy się również wyjaśnienia obserwowanych właściwości fluorescencyjnych sondy, stwierdzając m.in. że wynikają one z oddziaływania warstwowego w stanie podstawowym pomiędzy resztą acetylopirenu a 7-metyloguaniną.

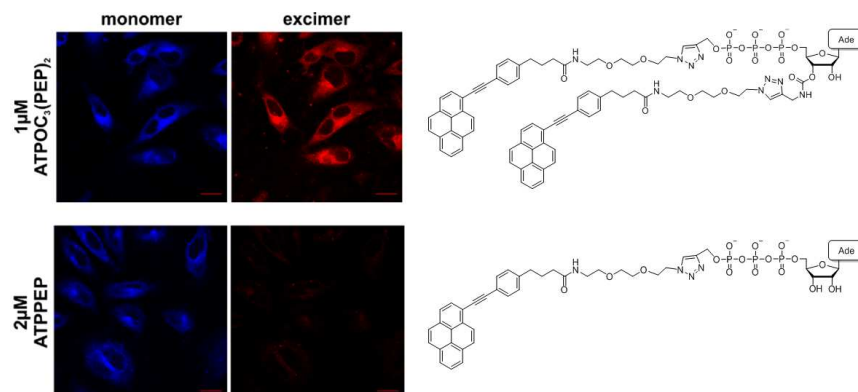
W kolejnych etapach badań poszukiwaliśmy kolejnych sposobów na zwiększenie czułości i możliwości zastosowań sond fluorescencyjnych dla enzymu DcpS. Rozważaliśmy zarówno możliwość zwiększenia czułości sond pojedynczo znakowanych poprzez zamianę reszty acetylopirenu na bardziej czuły znacznik (Kasprzyk et al. 2019, praca zaakceptowana) jak również rozbudowania struktury sondy w celu umożliwienia detekcji dualnej (ratiometrycznej). W literaturze opisano sondy nukleotydowe podwójnie znakowane parą fluoroforów wykazujących efekt bezpromienistego transferu energii (FRET), które zostały wykorzystane do monitorowania wielu procesów enzymatycznych zależnych od nukleotydów adeninowych.(21-23) Synteza tego typu nukleotydów, znakowanych dwoma różnymi fluoroforami, jest jednak zazwyczaj wieloetapowym i niskowydajnym procesem, co czyni optymalizację tego typu struktur niezwykle dużym wyzwaniem. W pracy H8 zaproponowaliśmy nukleotydowe sondy fluorescencyjne umożliwiające dualną detekcję, których synteza jest znacznie łatwiejsza dzięki znakowaniu za pomocą fluoroforów tworzących homodimery o unikalnych właściwościach emisyjnych, czego najlepszym przykładem są ekscymery pirenowe. Zaproponowana przez nas idea projektu i zasada działania takich sond została przedstawiona na Rys. 8. W podwójnie znakowanej pirenem sondzie, pod wpływem promieniowania UV dochodzi do wydajnego tworzenia wzbudzonych dimerów (ekscymerów), które charakteryzują się emisją z maksimum w pobliżu 500 nm. W wyniku hydrolizy enzymatycznej sondy fragmenty cząsteczki znakowane pirenem ulegają rozdzieleniu, wydajność tworzenia ekscymerów spada, pojawia się więc emisja monomerowa pirenu z maksimum ok. 400 nm (Rys. 8). Postęp reakcji enzymatycznej można więc śledzić zarówno poprzez obserwację spadku intensywności emisji przy długości fali 500 nm, wzrost intensywności emisji przy 400 nm lub ratiometrycznie, czyli poprzez zmianę stosunku intensywności  $I_{500}/I_{400}$ . W celu otrzymania tego typu sond w pierwszej kolejności opracowaliśmy metodę syntezy nukleotydów podwójnie sfunkcjonalizowanych grupą alkinową, przy czym jedna z grup została wprowadzona poprzez modyfikację terminalnego fosforanu natomiast druga poprzez odpowiednią modyfikację reszty rybozy w pozycji 2' lub 3'. Aby zweryfikować ogólną użyteczność tego typu sond ekscymerowych otrzymaliśmy związki zawierające różne warianty zasad azotowych, różne rodzaje „klikanych” reszt fosforanowych oraz różne warianty znaczników fluorescencyjnych o zbliżonych własnościach emisyjnych (Rys. 8). Otrzymane związki poddaliśmy drobiazgowej charakterystyce w celu oceny ich stabilności chemicznej, właściwości emisyjnych i podatności na degradację enzymatyczną. Na



podstawie tych eksperymentów wyselekcjonowaliśmy związki najlepsze do monitorowania aktywności i inhibicji różnych enzymów, w tym enzymu DcpS, w czasie rzeczywistym, co również zademonstrowaliśmy odpowiednimi eksperymentami. Co istotne pokazaliśmy również, że dzięki zastosowaniu sond ekscymerowych, możemy monitorować nie tylko aktywność rekombinowanego enzymu DcpS, ale również jego aktywność w lizatach komórkowych. Ze względu na amfifilową budowę sond postanowiliśmy również sprawdzić, czy są one w stanie penetrować błonę komórkową i wnikać do komórek. Okazało się, że niektóre z sond posiadają rzeczywiście taką właściwość, co ważne również w komórkach możliwa jest ich detekcja dualna (Rys. 9). Stało się to dla nas inspiracją do kontynuacji tego projektu i podjęcia badań nad możliwością monitorowania aktywności enzymu DcpS w żywych komórkach. Zagadnienie to jest obecnie intensywnie badane w naszym zespole.



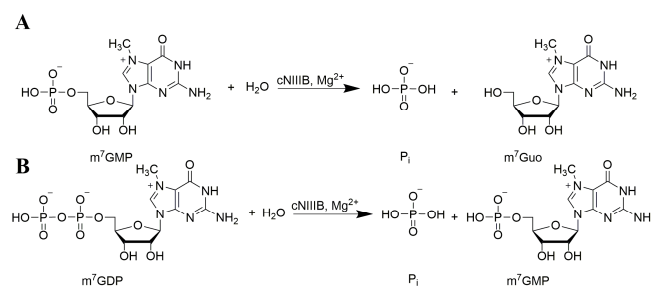
Rys. 8. Zasada działania i warianty sond ekscymerowych zaprojektowanych do badania aktywności pirofosfataz opisanych w pracy H8.



Rys. 9. Badanie przenikalności modelowej sondy ekscymerowej do komórek linii HeLa. Obecność sondy ekscymerowej w komórkach można wykryć zarówno dzięki obserwacji fluorescencji odpowiadającej monomerom (niebieski) jak i ekscymerom (czerwony) fenyloetynylopirenu (PEP). Dla porównania pokazano również wynik eksperymentu dla sondy pojedynczo znakowanej, która również wnika do komórek, ale zgodnie z oczekiwaniami, nie wykazuje fluorescencji ekscymerowej.

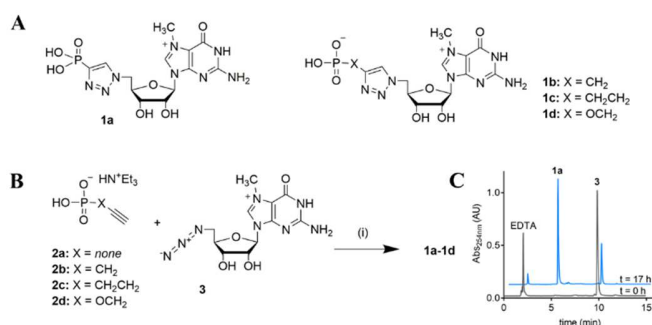
#### 4.3. Poszukiwanie inhibitorów białka cNIIIB

W wyniku degradacji kapu przez enzym DcpS uwalniany jest 5'-monofosforan 7-metyloguanozyny ( $m^7GMP$ ) jako unikalny nukleotydowy metabolit końca 5' eukariotycznych mRNA na ścieżce degradacji 3'-5'. Natomiast na ścieżce 5'-3', w wyniku degradacji kapu w mRNA przez kompleks Dcp1-Dcp2 uwalniany jest  $m^7GDP$ . Zakłada się, że akumulacja  $m^7GMP$  i  $m^7GDP$  w zdrowych komórkach byłaby dla nich niekorzystna, ponieważ mogłaby hamować istotne procesy zależne od kapu takie jak inicjacja translacji z udziałem białka eIF4E, czy transport mRNA. Wydaje się zatem naturalne, że komórce istnieją mechanizmy szybkiej degradacji nukleotydów guaninowych. Jednak do niedawna dokładne mechanizmy na drodze których następuje degradacja  $m^7GMP$  i  $m^7GDP$  pozostawały niewyjaśnione. Dopiero w roku 2012 w komórkach ludzkich oraz *Drosophila Melanogaster* zidentyfikowano enzym cNIIIB kodowany przez gen NT5C3B, który katalizuje reakcję degradacji  $m^7GMP$  do 7-metyloguanozyny i nieorganicznego fosforanu (Rys. 10A) (24). Enzym ten należy do rodziny 5'-nukleotydaz cytozolowych (cN), odpowiedzialnych za defosforylację 5'-monofosforanów nukleotydów i jest on ósmą w kolejności 5'-nukleotydazą zidentyfikowaną w komórkach ludzkich. Poza aktywnością względem  $m^7GMP$  enzym wykazuje również dużą aktywność względem CMP, a także, co nietypowe, aktywność pirofosfatazy względem  $m^7GDP$  (Rys. 10B), natomiast aktywność względem nukleotydów takich jak GMP i AMP jest znacząco niższa. Wartości parametrów kinetycznych wskazują, że  $m^7GMP$  jest substratem najlepiej dopasowanym do kieszeni wiążącej białka (ma najniższą wartość  $K_m$  spośród wszystkich substratów). W roku 2014 rozwiązano strukturę krystalograficzną enzymu cNIIIB z *Drosophila Melanogaster* wskazującą, że preferencja do  $m^7GMP$  może wynikać z istnienia w strukturze białka elastycznej hydrofobowej kieszeni tworzonej głównie przez trzy reszty tryptofanowe(25). Wysokie powinowactwo cNIIIB do  $m^7GMP$  sugerowało, że enzym ten może brać udział w degradacji metabolitów końca 5' mRNA w komórce, a także, tak jak inne enzymy z rodziny 5'-nukleotydaz, w degradacji terapeutyków pochodzenia nukleotydowego wykorzystywanych m.in. w terapiach przeciwnowotworowych (26, 27). Jednakże rzeczywista funkcja (lub funkcje) enzymu cNIIIB nie została do tej pory zweryfikowana.



Rys. 10. Enzymatyczna aktywność cNIIIB względem nukleotydów 7-metyloguaninowych będących metabolitami końca 5' mRNA.

W pracy [H9](#) biorąc za punkt wyjścia strukturę m<sup>7</sup>GMP zaprojektowaliśmy i zsyntezowaliśmy grupę potencjalnych inhibitorów i narzędzi molekularnych do badania enzymu cNIIIB. Zaprojektowane analogi m<sup>7</sup>GMP posiadały modyfikację w pozycji 5' 7-metyloguanozyny w postaci reszty 1,2,3-triazolowej funkcjonującej jako łącznik pomiędzy nukleozydem a resztą fosforanową lub fosfonianową ([Rys. 11A](#)). Ponieważ enzym cNIIIB akceptuje jako substraty zarówno m<sup>7</sup>GMP jak i m<sup>7</sup>GDP, co sugeruje dość dużą elastyczność kieszeni katalitycznej, zakładaliśmy, iż wprowadzona modyfikacja, mimo iż sterycznie wymagająca, może pozwolić na zachowanie oddziaływania z enzymem blokując jednocześnie przebieg reakcji enzymatycznej. Związki zostały otrzymane w wydajnej reakcji katalizowanej miedzią cykloaddycji azydku do alkinu (CuAAC) pomiędzy 5'-azydo-5'-deoksy-7-metyloguanozyną a czterema różnymi pochodnymi fosfonianowymi lub fosforanowymi zawierającymi terminalną grupę alkinową, których syntezę opracowaliśmy w pracy [H5](#) ([Rys. 11B](#)). Zdolność do hamowania aktywności enzymu cNIIIB oceniliśmy wstępnie za pomocą dwóch niezależnych testów: opartego na metodzie HPLC oraz testu kolorymetrycznego z wykorzystaniem zieleni malachitowej. Badania te wykazały, że jeden z spośród badanych związków, ten zawierający ugrupowanie 1,2,3-triazolofosfonianowe bezpośrednio połączone z atomem fosforu (związek **2a** na [Rys. 11B](#)), hamował aktywność enzymu cNIIIB w stężeniach mikromolarnych (IC<sub>50</sub> ~88 μM), podczas gdy pozostałe analogi nie wykazywały aktywności inhibitorowych w badanym zakresie stężeń. Co ciekawe, związek zawierający ugrupowanie fosforanowe (**2d**) okazał się dobrym nienaturalnym substratem dla cNIIIB, co pośrednio potwierdzało nasze początkowe założenie, że modyfikacja triazolowa jest akceptowana w miejscu wiążącym enzymu. Odnaleziony inhibitor poddaliśmy dalszym badaniom, które doprowadziły do wykazania jego selektywności względem cNIIIB w kontekście innych białek rozpoznających nukleotydy 7-metyloguaninowe – eIF4E i DcpS. Odkryty przez nas inhibitor wykorzystujemy obecnie do weryfikacji roli enzymu cNIIIB w degradacji metabolitów końca 5' mRNA. Realizujemy również badania mające na celu syntezę związków II generacji o zwiększonym potencjale inhibitorowym.



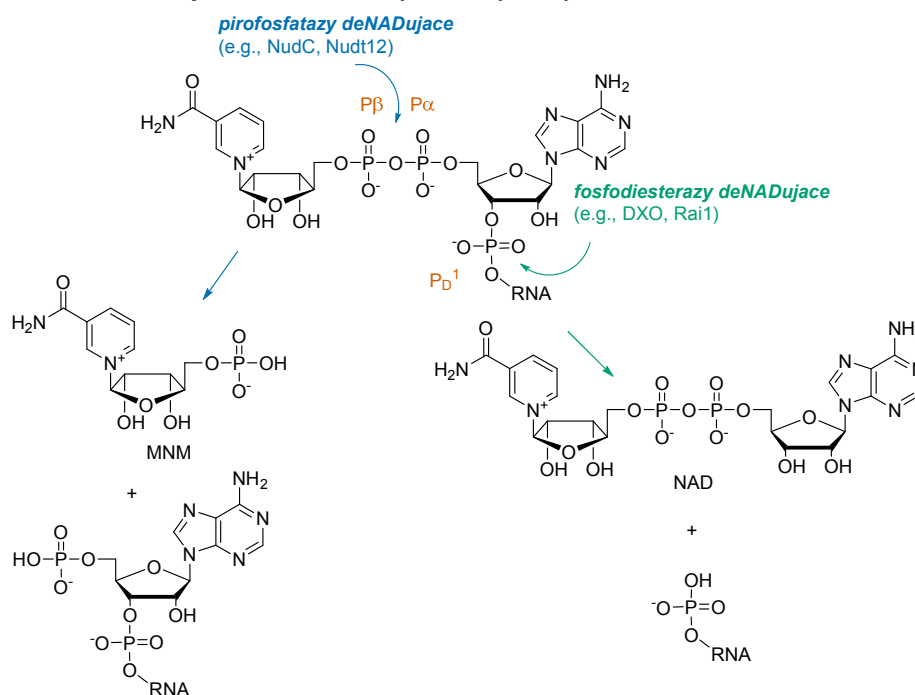
Rys. 11. Synteza triazolowych analogów m<sup>7</sup>GMP jako potencjalnych inhibitorów enzymu cNIIIB.

#### 4.4. Odporne na hydrolizę analogi NAD-RNA

Dinukleotyd nikotynowo-adeninowy (NAD) jest niezwykle ważnym naturalnym związkiem o licznych funkcjach biologicznych. Najwcześniej poznaną, a zatem i najlepiej zbadaną funkcją NAD jest uczestniczenie w komórkowych reakcjach redoks. Jednakże NAD jest również substratem dla enzymów wprowadzających lub usuwających modyfikacje post-translacyjne białek (odpowiednio poli(ADPrybozujących) i deacetylujących), bierze udział w transdukcji sygnału (jako prekursor

cząsteczki sygnałowej, cyklicznej ADPrybozy) (28), czy naprawie DNA. Niedawno odkryto również, że NAD służy jako cząsteczka modyfikująca koniec 5' niektórych RNA. Zakończone cząsteczką NAD RNA (Rys. 12) odkryto najpierw u bakterii(29), a taką strukturę końca 5' nazwano 'bakteryjnym kapem' ze względu na pewne podobieństwo do kapu 7-metyloguanozynowego ( $m^7G$ ) u Eukariontów.(2, 30, 31) Najnowsze badania wskazują jednak, że RNA zakończone NAD występują również w organizmach eukariotycznych(32-34) i w komórkach ludzkich(35). Funkcje biologiczne tej modyfikacji nie zostały jeszcze dobrze zidentyfikowane, ale dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że mogą być one nieco różne w zależności od organizmu. Nie mniej jednak, stwierdzono, że zarówno u bakterii jak i Eukariontów obecność NAD na końcu 5' wpływa na stabilność RNA. Zgodnie z tym, zidentyfikowano również kilka enzymów, zdolnych do usuwania struktur NAD z końca 5' RNA (tzw. enzymy deNADujące) (Rys. 12)(3).

U bakterii *E.coli* obecność NAD na końcu 5' mRNA prawdopodobnie zwiększa stabilność RNA w wyniku zmniejszenia podatności na degradację przez enzym RppH(36), czyli bakteryjną pirofosfatazę uczestniczącą w defosforylacji RNA 5'-trifosforanów do 5'-monofosforanów inicjując w ten sposób ich dalszą degradację. Jednakże, wiadomo również, że reszta NAD w RNA może być hydrolizowana przez enzym NudC, bakteryjną pirofosfatazę, która specyficznie hydrolizuje wiązanie pirofosforanowe w NAD *in vitro* i *in vivo* usuwając mononukleotyd nikotyny (MNM) (36, 37).



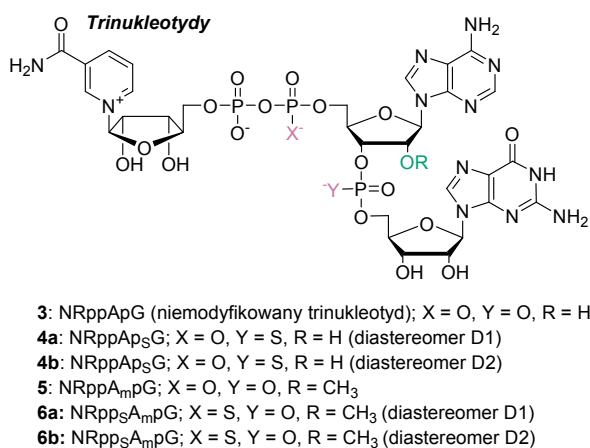
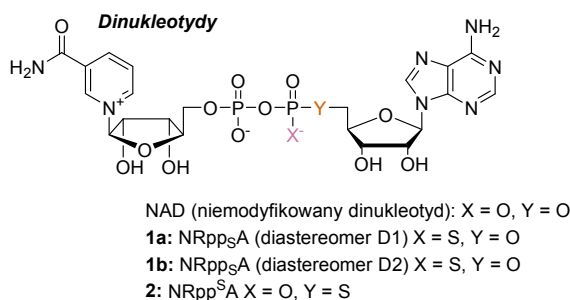
Rys. 12. Struktura NAD-RNA oraz produkty jego hydrolizy przez dwie zidentyfikowane do tej pory klasy enzymów deNADujących: NAD-RNA pirofosfatazy i NAD-RNA fosfodiesterazy. Na rysunku zaznaczono symbolami fosforany  $\alpha$ ,  $\beta$  i fosfodiestrowy ( $P_D$ ).

Zupełnie inaczej niż u organizmów prokariotycznych, u Eukaryota obecność NAD na końcu 5' destabilizuje RNA i kieruje je na ścieżkę szybkiej degradacji. Degradacja inicjowana jest przez usunięcie z końca 5' całej cząsteczki NAD przez nukleazę DXO, która hydrolizuje pierwsze wiązanie fosfodiestrowe w RNA(32). Niedawno odkryto, że ludzki enzym Nudt12, który jest homologiem enzymu NudC, również posiada aktywność deNADującą *in vitro* jak również uczestniczy w degradacji

NAD-RNA w komórkach ludzkich(38). W przeciwieństwie do DXO, Nudt12 posiada aktywność pirofosfatazy NAD-RNA.

Pomimo wzrastającej liczby narzędzi molekularnych i metod chemii biologicznej projektowanych do badania procesów zależnych od NAD(39-42), znaczenie biologiczne NAD-RNA pozostaje nadal w dużej mierze niewyjaśnione. Jednym z najważniejszych pytań pozostaje to czy, modyfikacja ta w komórkach eukariotycznych pełni jakąś definiowalną funkcję biologiczną, np. jako odpowiedź na warunki stresowe, czy jest jedynie skutkiem błędnej inicjacji transkrypcji i jako produkt nieprawidłowy musi zostać szybko usunięta w ramach mechanizmów kontroli RNA.

**Zestaw narzędzi chemicznych do badania NAD-RNA**



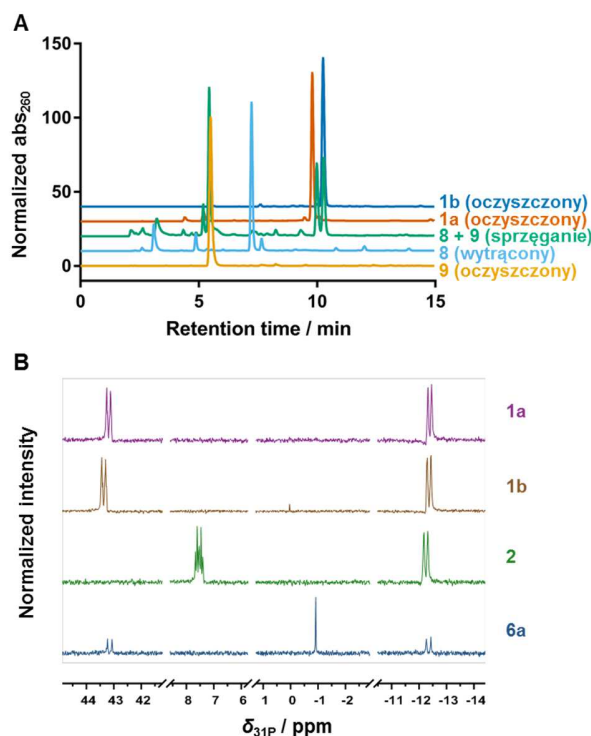
Rys. 13. Struktury otrzymanych przez nas analogów NAD jako uodpornionych na degradację enzymatyczną narzędzi molekularnych do badania NAD-RNA.

Nasz zespół uznał, że badania nad RNA zakończonymi NAD na 5' końcu i specyficznymi dla nich białkami mogłyby być ułatwione dzięki zastosowaniu racjonalnie zaprojektowanych narzędzi molekularnych, które umożliwiłyby syntezę analogów NAD-RNA uodpornionych na degradację przez enzymy deNADujące. Uznaliśmy, że tego typu narzędzia umożliwiłyby dostęp do NAD-RNA o zwiększonej stabilności, co ułatwiłoby przeprowadzenie badań strukturalnych kompleksów NAD-RNA ze specyficznymi enzymami, umożliwiło ocenę udziału poszczególnych enzymów deNADujących w ogólnej degradacji NAD-RNA, ułatwiło prowadzenie eksperymentów nakierowanych na identyfikację nowych białek wiążących NAD-RNA w komórkach, a także otworzyło wiele innych możliwości badawczych.

Dlatego też, w pracy [H10](#) otrzymaliśmy zestaw analogów NAD zaprojektowanych tak, aby dzięki wprowadzonym do nich modyfikacjom chemicznym, po wbudowaniu ich do RNA zapewniały

częściową lub całkowitą odporność na enzymatyczny deNADding. Aby nadać analogom potencjalną odporność na enzymy o aktywności pirofosfataz (NudC i Nudt12), opracowaliśmy analogi NAD zawierające modyfikację 5'-tiofosforanową lub 5'-fosfotioestrową w obrębie fosforanu  $\alpha$  (Rys. 13). Tego typu modyfikacje stosowaliśmy wcześniej z powodzeniem do stabilizacji eukariotycznych końców 5' mRNA (kapów 7-metyloguaninowych) aby nadać im odporność na enzymy degradujące nie zaburzając jednocześnie ich aktywności translacyjnej (20, 43, 44). Aby nadać analogom NAD odporność na fosfodiesterazy, takie jak DXO, modyfikacja tiofosforanowa została wprowadzona w obrębie pierwszego wiązania fosfodiesterowego w trinukleotydom analogu NAD (NRpppApG) (Rys. 13). Oprócz tego, otrzymaliśmy również trinukleotydy posiadający grupę 2'-O-metylową w obrębie adenozy. Według najnowszych badań modyfikacja taka zabezpiecza przed degradacją przez DXO RNA zakończone kapem guaninowym lub 7-metyloguaninowym (45), chcieliśmy więc sprawdzić czy podobny efekt będzie można osiągnąć dla NAD. Wreszcie, aby uzyskać potencjalną odporność na oba rodzaje enzymów deNADujących, zestawiliśmy w jednym trinukleotydzie modyfikację tiofosforanową z modyfikacją 2'-O-metylową. Syntezy wszystkich związków dokonaliśmy korzystając z metod opracowanych wcześniej w naszym zespole, przeprowadzając najpierw wszystkie niezbędne optymalizacje. Synteza zarówno di- jak i trinukleotydów wymagała otrzymania w dużych ilościach aktywowanego imidazolem mononukleotydu nikotynowego, a także różnorodnie modyfikowanych podjednostek mono- i dinukleotydom, przy czym te ostatnie zostały otrzymane na drodze syntezy na podłożu stałym. Finalnym etapem syntezy wszystkich analogów było tworzenie wiązania pirofosforanowego w oparciu o chemię fosforoimidazolidów. Analogi NAD zawierające ugrupowanie  $\alpha$ -tiofosforanowe zostały zsyntezowane w postaci dwóch P-diastereomerów, które zostały rozdzielone metodą HPLC, co umożliwiło poddanie ich badaniom biologicznym w postaci diastereomerycznie czystej (Rys. 14A). Struktury i czystości otrzymanych związków zostały potwierdzone metodami spektroskopowymi, przy czym szczególnie przydatną techniką był w tym przypadku fosforowy rezonans magnetyczny (Rys. 14B).

Otrzymany zestaw związków poddaliśmy wstępnej charakteryzacji biochemicznej, aby określić ich (i) zdolność do wbudowywania się do RNA w procesie transkrypcji katalizowanej przez polimerazę T7 oraz (ii) podatność na różne enzymy deNADujące. Eksperymenty transkrypcji *in vitro* potwierdziły, że zgodnie z oczekiwaniami, związki te mogą być inicjatorami transkrypcji katalizowanej przez polimerazę T7, a zatem umożliwiają otrzymanie cząsteczek RNA zakończonych NAD na końcu 5'. Co więcej, okazało się, że zastosowanie trinukleotydom analogów NAD daje RNA o wyjątkowo wysokiej czystości i homogenności, jest więc korzystniejsze niż standardowo obecnie wykorzystywane metody syntezy NAD-RNA, które charakteryzują się niższą wydajnością wbudowywania NAD (46, 47). Podatność modyfikowanych NAD na degradację przez enzymy deNADujące: NudC, Nudt12 i DXO została zbadana we współpracy z grupą prof. Mike Kiledjiana z Rutgers University (M. Kiledjian i E. Grudzień-Nogalska). Zgodnie z wyjściowymi założeniami, w wyniku tych badań zidentyfikowaliśmy analogi, które są podatne na hydrolizę przez enzymy deNADujące wyłącznie jednego rodzaju, obu rodzajów lub całkowicie odporne na hydrolizę. Wyniki te również zostały zawarte w pracy H10. Obecnie otrzymane przez nas analogi NAD są wykorzystywane w dalszych badaniach nad właściwościami i funkcjami biologicznymi NAD-RNA prowadzonymi w naszym zespole w ramach kierowanego przeze mnie projektu SONATA BIS oraz we współpracy z grupą prof. Kiledjiana.



Rys. 14 A) Reprezentatywne profile HPLC przedstawiające postęp syntezy analogu NAD modyfikowanego grupą tiofosforanową w pozycji  $\alpha$ ; B) Porównanie widm  $^{31}\text{P}$  NMR wybranych analogów NAD (wyniki opublikowane w pracy H10).

#### 4.5. Analiza syntetycznych analogów nukleotydów metodą tandemowej spektrometrii mas

Niezwykle przydatnym narzędziem analitycznym w badaniach nukleotydów i ich analogów jest spektrometria mas. W literaturze opisano przykłady zastosowania spektrometrii mas do rozwiązywania konkretnych problemów badawczych, takich jak np. analiza stopnia ufosforylowania wybranych leków nukleozydowych, czy oznaczenia ilościowe wybranych pochodnych naturalnych. Zazwyczaj do rozwiązywania tego typu problemów stosuje się spektrometrię mas z użyciem „miękkich” technik jonizacji typu MALDI czy elektrosprej (najczęściej w trybie jonów dodatnich). Bardzo ważnym aspektem jest możliwość identyfikacji związków na podstawie ich widma fragmentacyjnego. Tandemowa spektrometria mas pozwala na fragmentację jonu o wybranym stosunku masy do ładunku, a otrzymane fragmenty o określonych wartościach  $m/z$  mogą posłużyć jako cenna wskazówka w przewidywaniu struktury chemicznej. W oznaczeniach ilościowych często wykorzystuje się selektywne monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (*single reaction monitoring*, SRM lub *multiple reaction monitoring*, MRM). Przy odpowiednim doborze par jon pierwotny-jon wtórny metoda ta zapewnia wysoką selektywność oraz czułość oznaczenia.

W przypadku metabolitów nukleotydowych, często napotykanymi problemami w oznaczeniach jakościowych i ilościowych jest występowanie zbliżonych strukturalnie związków izomerycznych i izobarycznych (czyli o różnym składzie, ale tej samej masie nominalnej), które mogą interferować z wynikami prowadzonych oznaczeń (np. w przypadku oznaczeń rybonukleotydów adeninowych konieczne jest odróżnienie ich od izobarycznych deoksyrybo nukleotydów guaninowych). Aby uniknąć tych błędów, konieczny jest rozważny dobór warunków chromatograficznych oraz

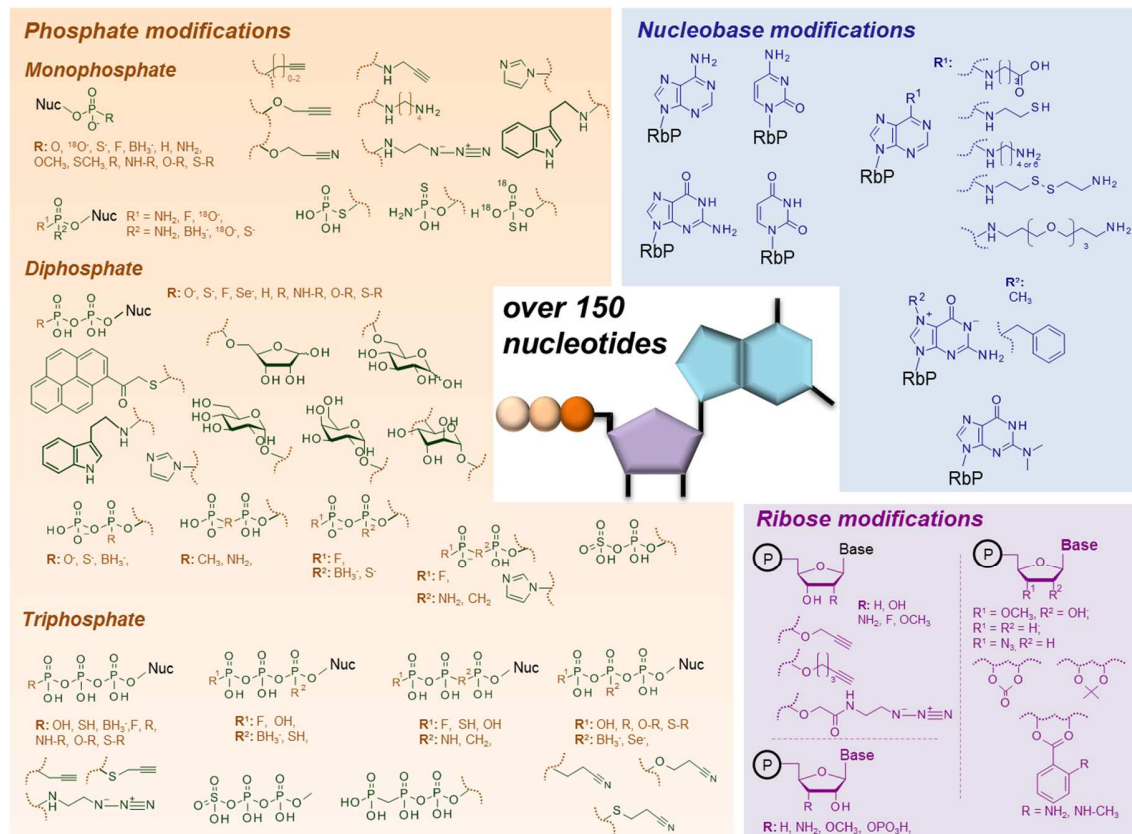
odpowiedni dobór obserwowanych metodą MRM jonów wtórnych, najlepiej takich, które nie występują powszechnie w widmach fragmentacyjnych nukleotydów. Przed rozpoczęciem realizacji projektu, zdaliśmy sobie sprawę, że nie podjęto jeszcze próby przeprowadzenia kompleksowych badań, które pozwoliłyby na wyciągnięcie bardziej ogólnych wniosków i reguł dotyczących fragmentacji nukleotydów oraz wytycznych co do doboru jonów wtórnych w oznaczeniach ilościowych. Co więcej, większość doniesień literaturowych skupiała się na analizie jonów potomnych pochodzących od zasad nukleinowych badanych nukleotydów, stosunkowo niewiele było natomiast doniesień na temat jonów potomnych zawierających elementy reszt rybozy i fosforanów. W szczególności, bardzo niewiele wiadomo było na temat fragmentacji mono- i dinukleotydów modyfikowanych w obrębie mostka oligofosforanowego. Uznaliśmy też, że ciekawym a dość słabo poznanym aspektem byłoby porównanie fragmentacji jonów pochodzenia nukleotydowego generowanych w trybie jonów dodatnich i ujemnych. W projekcie realizowanym wraz z zespołem w ramach grantu Iuventus Plus, zaplanowaliśmy przeprowadzenie szeregu systematycznych badań nad różnorodnie modyfikowanymi nukleotydami w celu uzupełnienia i usystematyzowania aktualnej wiedzy na temat fragmentacji nukleotydów i ich analogów w eksperymentach MS.

W pracy [H11](#), wykorzystaliśmy unikalne zasoby naszego laboratorium dokonując analizy ponad 150 mononukleotydów metodą tandemowej spektrometrii mas stosując jonizację typu elektrospej. Analizie poddaliśmy przede wszystkim 5'-mono-, 5'-di- i 5'-trifosforany nukleotydów, a także ich strukturalnie zbliżone analogi modyfikowane w obrębie zasady azotowej, reszt fosforanowych oraz reszt rybozy w celu zidentyfikowania charakterystycznych jonów fragmentacyjnych, które mogą być pomocne przy ustalaniu struktury. Porównując jonizację w trybach dodatnim i ujemnym zauważyliśmy, że w trybie jonów dodatnich widma fragmentacyjne zawierają głównie sygnały pochodzące od zasad azotowych, natomiast w trybie jonów ujemnych obecne są również fragmenty pochodzące od reszt fosforanowych i fosforybozowych, co daje możliwość ustalenia pewnych elementów struktury takich jak liczba grup fosforanowych w związku czy obecność modyfikacji w obrębie fosforanów i reszt rybozy. W oparciu o te wyniki, zaproponowaliśmy struktury najważniejszych jonów fragmentacyjnych, które dodatkowo zweryfikowaliśmy badając izotopologię wybranych związków znakowane ciężkim izotopem tlenu ( $[^{18}\text{O}]$ ) w obrębie reszt fosforanowych. Zademonstrowaliśmy również możliwość zastosowania metody ESI(-)/MS/MS do rozróżniania strukturalnie zbliżonych związków poprzez analizę porównawczą widm izomerycznych i izobarycznych nukleotydów i ich syntetycznych analogów, a także potencjał tej metody do szybkiej identyfikacji nukleotydowych produktów syntezy organicznej z bardzo niewielkiej ilości materiału. Wreszcie, sformułowaliśmy ogólne zasady dotyczące fragmentacji nukleotydów i zdefiniowaliśmy powiązania pomiędzy widem fragmentacyjnym a strukturą, które mogą być pomocne przy analizie widm ESI(-)/MS/MS nukleotydów o nieznannej strukturze. Aby jak najszerzej upowszechnić wyniki naszych badań stworzyliśmy bazę widm ESI(-)/MS/MS w której umieliliśmy widma wszystkich związków analizowanych w pracy (baza msTide; [www.msTide-db.com](http://www.msTide-db.com)).

Wyniki tej pracy wykorzystujemy obecnie do rozwiązania konkretnych problemów badawczych związanych z trwałością mRNA, m.in. do opracowania metody ilościowego oznaczania wydajności wbudowywania modyfikowanych nukleotydów do RNA transkrybowanego *in vitro* (projekt ten realizowany jest w ramach projektu PRELUDIUM przez doktorantkę, mgr Dominikę Strzelecką). Opracowujemy także metodę ilościowego oznaczania metabolitów końca 5' mRNA (kapu), która zostanie wykorzystana do oznaczenia metabolitów kapu w wybranych komórkach roślinnych i



związanych oraz do badania aktywności i inhibicji enzymów degradacji kapu w lizatach komórkowych. Dzięki tym badaniom możliwe było również opracowanie metody monitorowania degradacji sond enzymatycznych zastosowanej w pracy H8. Obecnie, rutynowo wykorzystujemy również analizę ESI(-)/MS/MS do szybkiej i jednoznacznej identyfikacji nukleotydów otrzymanych na drodze syntezy chemicznej lub z materiału biologicznego, co jest szczególnie przydatne w przypadku badania związków znacznie zmodyfikowanych i fluorescencyjnie znakowych, które nie są dostępne w ilościach umożliwiających przeprowadzenie analizy metodą NMR.



Rys. 15. Poglądowe przedstawienie biblioteki nukleotydów badanych w pracy H11.

Referencje:

1. Shaver S, Rideout J, Pendergast W, Douglass J, Brown E, Boyer J, et al. Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Purinerg Signal.* 2005;1(2):183-91.
2. Jaschke A, Hofer K, Nubel G, Frindert J. Cap-like structures in bacterial RNA and epitranscriptomic modification. *Current Opinion in Microbiology.* 2016;30:44-9.
3. Kiledjian M. Eukaryotic RNA 5'-End NAD(+) Capping and DeNADding. *Trends in Cell Biology.* 2018;28(6):454-64.
4. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research.* 2016;44(16):7511-26.
5. Joachimiak L, Blazewska KM. Phosphorus-Based Probes as Molecular Tools for Proteome Studies: Recent Advances in Probe Development and Applications. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2018;61(19):8536-62.

6. Pradere U, Garnier-Amblard EC, Coats SJ, Amblard F, Schinazi RF. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chemical Reviews*. 2014;114(18):9154-218.
7. Eckstein F, Gindl H. SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE 5'-POLYPHOSPHOROTHIOATES. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1967;149(1):35-&.
8. Walczak S, Nowicka A, Kubacka D, Fac K, Wanat P, Mroczek S, et al. A novel route for preparing 5' cap mimics and capped RNAs: phosphate-modified cap analogues obtained via click chemistry. *Chemical Science*. 2017;8(1):260-7.
9. Strenkowska M, Grzela R, Majewski M, Wnek K, Kowalska J, Lukaszewicz M, et al. Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(20):9578-90.
10. Dalvit C, Fagerness PE, Hadden DTA, Sarver RW, Stockman BJ. Fluorine-NMR Experiments for High-Throughput Screening: Theoretical Aspects, Practical Considerations, and Range of Applicability. *J Am Chem Soc*. 2003;125(25):7696-703.
11. Wypijewska A, Bojarska E, Lukaszewicz M, Stepinski J, Jemielity J, Davis RE, et al. 7-Methylguanosine Diphosphate (m(7)GDP) Is Not Hydrolyzed but Strongly Bound by Decapping Scavenger (DcpS) Enzymes and Potently Inhibits Their Activity. *Biochemistry*. 2012;51(40):8003-13.
12. Shen V, Liu HD, Liu SW, Jiao XF, Kiledjian M. DcpS scavenger decapping enzyme can modulate pre-mRNA splicing. *Rna-a Publication of the Rna Society*. 2008;14(6):1132-42.
13. Bail S, Kiledjian M. DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *Rna Biology*. 2008;5(4):216-9.
14. Ng CKL, Shboul M, Taverniti V, Bonnard C, Lee H, Eskin A, et al. Loss of the scavenger mRNA decapping enzyme DCPS causes syndromic intellectual disability with neuromuscular defects. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(11):3163-71.
15. Alesi V, Capolino R, Genovesea S, Capriati T, Loddo S, Calvieri G, et al. An additional patient with a homozygous mutation in DCPS contributes to the delineation of Al-Raqad syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2018;176(12):2781-6.
16. Ahmed I, Buchert R, Zhou M, Jiao X, Mittal K, Sheikh TI, et al. Mutations in DCPS and EDC3 in autosomal recessive intellectual disability indicate a crucial role for mRNA decapping in neurodevelopment. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(11):3172-80.
17. Yamauchi T, Masuda T, Canver MC, Seiler M, Semba Y, Shboul M, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies Leukemia-Specific Dependence on a Pre-mRNA Metabolic Pathway Regulated by DCPS. *Cancer Cell*. 2018;33(3):386-+.
18. Yoshimi A, Abdel-Wahab O. Targeting mRNA Decapping in AML. *Cancer Cell*. 2018;33(3):339-41.
19. Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening*. 1999;4(2):67-73.
20. Wojtczak BA, Sikorski PJ, Fac-Dabrowska K, Nowicka A, Warminski M, Kubacka D, et al. 5'-Phosphorothiolate Dinucleotide Cap Analogues: Reagents for Messenger RNA Modification and Potent Small-Molecular Inhibitors of Decapping Enzymes. *Journal of the American Chemical Society*. 2018;140(18):5987-99.
21. Hacker SM, Pagliarini D, Tischer T, Hardt N, Schneider D, Mex M, et al. Fluorogenic ATP Analogues for Online Monitoring of ATP Consumption: Observing Ubiquitin Activation in Real Time. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2013;52(45):11916-9.
22. Hardt N, Hacker SM, Marx A. Synthesis and fluorescence characteristics of ATP-based FRET probes. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2013;11(48):8298-305.
23. Ermert S, Marx A, Hacker SM. Phosphate-Modified Nucleotides for Monitoring Enzyme Activity. *Topics in Current Chemistry*. 2017;375(2).
24. Buschmann J, Moritz B, Jeske M, Lilie H, Schierhorn A, Wahle E. Identification of Drosophila and Human 7-Methyl GMP-specific Nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(4):2441-51.

25. Monecke T, Buschmann J, Neumann P, Wahle E, Ficner R. Crystal Structures of the Novel Cytosolic 5'-Nucleotidase III<sub>B</sub> Explain Its Preference for m(7)GMP. *Plos One*. 2014;9(3):13.
26. Kozarski M, Kubacka D, Wojtczak BA, Kasprzyk R, Baranowski MR, Kowalska J. 7-Methylguanosine monophosphate analogues with 5'-(1,2,3-triazoyl) moiety: Synthesis and evaluation as the inhibitors of cNIII<sub>B</sub> nucleotidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(1):191-9.
27. Ziemniak M, Strenkowska M, Kowalska J, Jemielity J. Potential therapeutic applications of RNA cap analogs. *Future Medicinal Chemistry*. 2013;5(10):1141-72.
28. Berger F, Ramirez-Hernandez MH, Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends in Biochemical Sciences*. 2004;29(3):111-8.
29. Chen YG, Kowtoniuk WE, Agarwal I, Shen Y, Liu DR. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat Chem Biol*. 2009;5(12):879-81.
30. Luciano DJ, Belasco JG. NAD in RNA: unconventional headgear. *Trends in Biochemical Sciences*. 2015;40(5):245-7.
31. Cahova H, Winz ML, Hofer K, Nubel G, Jaschke A. NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs. *Nature*. 2015;519(7543):374-+.
32. Jiao X, Doamekpor SK, Bird JG, Nickels BE, Tong L, Hart RP, et al. 5' End Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cap in Human Cells Promotes RNA Decay through DXO-Mediated deNADding. *Cell*. 2017;168(6):1015-+.
33. Walters RW, Matheny T, Mizoue LS, Rao BS, Muhlrud D, Parker R. Identification of NAD(+) capped mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(3):480-5.
34. Frindert J, Zhang YQ, Nubel G, Kahloon M, Kolmar L, Hotz-Wagenblatt A, et al. Identification, Biosynthesis, and Decapping of NAD-Capped RNAs in *B. subtilis*. *Cell Reports*. 2018;24(7):1890-+.
35. Bird JG, Basu U, Kuster D, Ramachandran A, Grudzien-Nogalska E, Kiledjian M, et al. Mitochondrial RNA capping: highly efficient 5'-RNA capping with NAD<sup>+</sup> and NADH by yeast and human mitochondrial RNA polymerase. *bioRxiv2018*.
36. Hofer K, Li SS, Abele F, Frindert J, Schlotthauer J, Grawenhoff J, et al. Structure and function of the bacterial decapping enzyme NudC. *Nature Chemical Biology*. 2016;12(9):730-+.
37. Zhang DL, Liu YX, Wang Q, Guan ZY, Wang J, Liu J, et al. Structural basis of prokaryotic NAD-RNA decapping by NudC. *Cell Research*. 2016;26(9):1062-6.
38. Grudzien-Nogalska E, Wu Y, Jiao X, Cui H, Hart RP, Tong L, et al. Structural and biochemical studies define Nudt12 as a new class of RNA deNADding enzyme in mammalian cells. *submitted2018*.
39. Winz ML, Cahova H, Nubel G, Frindert J, Hofer K, Jachke A. Capture and sequencing of NAD-capped RNA sequences with NAD captureSeq. *Nature Protocols*. 2017;12(1).
40. Halle F, Fin A, Rovira AR, Tor Y. Emissive Synthetic Cofactors: Enzymatic Interconversions of (tz)A Analogues of ATP, NAD(+), NADH, NADP(+), and NADPH. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2018;57(4):1087-90.
41. Vvedenskaya IO, Bird JG, Zhang YC, Zhang Y, Jiao XF, Barvik I, et al. CapZyme-Seq Comprehensively Defines Promoter-Sequence Determinants for RNA 5' Capping with NAD(+). *Molecular Cell*. 2018;70(3):553-+.
42. Grudzien-Nogalska E, Bird JG, Nickels B, Kiledjian M. 'NAD-capQ' Detection and Quantitation of NAD caps. *RNA (New York, NY)*. 2018.
43. Grudzien-Nogalska E, Jemielity J, Kowalska J, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. *Rna-a Publication of the Rna Society*. 2007;13(10):1745-55.
44. Kowalska J, Lewdorowicz M, Zuberek J, Grudzien-Nogalska E, Bojarska E, Stepinski J, et al. Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to

eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *Rna*-a Publication of the Rna Society. 2008;14(6):1119-31.

45. Picard-Jean F, Brand C, Tremblay-Letourneau M, Allaire A, Beaudoin MC, Boudreault S, et al. 2'-O-methylation of the mRNA cap protects RNAs from decapping and degradation by DXO. *Plos One*. 2018;13(3).

46. Hofer K, Abele F, Schlotthauer J, Jaschke A. Synthesis of 5'-NAD-Capped RNA. *Bioconjugate Chemistry*. 2016;27(4):874-7.

47. Huang FQ. Efficient incorporation of CoA, NAD and FAD into RNA by in vitro transcription. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(3):8.

*Janna Kowalska*