

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Marcelina Bednarczyk

nr albumu: 321 766

Wykorzystanie metod biofizycznych w poszukiwaniu i badaniu selektywnych inhibitorów białek odpowiedzialnych za degradację struktury końca 5' mRNA

Rozprawa doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem

prof. dr. hab. Jacka Jemielitego

oraz

dr hab. Joanny Kowalskiej

w Zakładzie Biofizyki

Instytutu Fizyki Doświadczalnej

Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa 2024

Badania zostały sfinansowane ze środków FNP
w ramach grantu TEAM/2016-2/13.

Praca była realizowana w Laboratorium Chemii Biofizycznej
Zakładu Biofizyki IFD, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego
oraz w Laboratorium Chemii Biologicznej
Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

PODZIĘKOWANIA

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Moim Promotorom i najlepszym mentorom

Prof. dr. hab. Jackowi Jemielitemu oraz dr hab. Joannie Kowalskiej

za szansę daną 7 lat temu niedoświadczonemu fizykowi i możliwość realizacji badań w zespole. Za ogrom przekazanej wiedzy, wsparcie oraz niezwykle cenne komentarze i wskazówki w trakcie realizacji projektu, a także konstruktywną krytykę, która mobilizowała mnie do rozwijania się jako naukowca.

Wiele się od Was nauczyłam i mam nadzieję, że w przyszłości będę chociaż w połowie tak dobrym naukowcem jak Wy.

Oraz współpracownikom

Dr Renacie Kasprzyk – za wprowadzenie do świata fluorescencji i screeningów płytkowych

Dr. hab. Pawłowi Sikorskiemu – za przekazaną wiedzę w temacie RNA i wskazówki w eksperymentach biologicznych

Dr. Adamowi Mamotowi – za pomoc w pracy z RNA oraz niezwykle inspirujące dyskusje na tematy naukowe i nie tylko

Mgr. Tomaszowi Śpiewli – za przygotowanie białek niezbędnych do przeprowadzenia eksperymentów

Mgr. inż. Sebastianowi Chmielińskiemu – za nieocenioną pomoc w sprawach administracyjnych i zdobywanie miliona podpisów i pieczętek na wczoraj

Mgr inż. Agnieszce Młynarskiej-Cieślak – mojej wiernej towarzyszce doli i niedoli. Agu, dziękuję Ci za te godziny spędzone razem przy komputerze, wspólne przeżywanie radości i pokonywanie kryzysów. Bez Ciebie by się nie udało!

Dr. Markowi Baranowskiemu – za pomoc w wykonaniu eksperymentów z użyciem MS, wnikliwe sprawdzenie rozprawy oraz ciągłą motywację i wsparcie, które znacznie ułatwiły ten długi proces tworzenia niniejszej rozprawy. Dziękuję!

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium za owocne dyskusje i miłą atmosferę pracy.

Rodzicom

*Za nieustającą motywację do pisania
i niezachwianą wiarę, że kiedyś skończę „bić tego doktora”*

Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów	15
1. Wprowadzenie.....	17
2. Przegląd literaturowy	19
2.1 Kwasy nukleinowe: rodzaje, budowa i funkcje	19
2.1.1 Oddziaływania między zasadami kwasów nukleinowych.....	22
2.2 mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy	26
2.2.1 Budowa i funkcje mRNA.....	26
2.2.2 Struktura końca 5' mRNA (kapu).....	31
2.2.2.1 Biosynteza kapu.....	32
2.2.2.2 Funkcje biologiczne struktury kapu.....	34
2.2.3 Mechanizmy degradacji mRNA.....	35
2.2.3.1 eukariotyczne enzymy biorące udział w degradacji końca 5' mRNA.....	38
2.2.3.2 Wirusowe enzymy biorące udział w degradacji końca 5' mRNA.....	44
2.2.4 Ścieżki kontroli jakości RNA	49
2.3 Terapeutyczne zastosowanie mRNA	52
2.4 Badanie oddziaływań w układach biologicznych.....	58
2.4.1 Sposoby opisywania oddziaływań białko-ligand.....	58
2.4.2 Metody badań oddziaływań białko-ligand.....	59
2.5. Metodyka badań	63
2.5.1. Metody spektroskopowe oparte na pomiarze intensywności fluorescencji (FLINT).....	63
2.5.2. Techniki elektroforetyczne na przykładzie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE).....	66
Badania własne	69
3. Opracowanie wysokoprzepustowej metody opartej na fluorescencji do poszukiwania inhibitorów enzymów biorących udział w degradacji końca 5' mRNA	69
3.1 Przedmiot i cel badań.....	69
3.2 Badania wirusowego enzymu D9	71
3.2.1 Optymalizacja struktury sondy.....	71
3.2.2 Optymalizacja warunków reakcji.....	76
3.2.3 Wyznaczenie parametrów kinetycznych hydrolizy sondy katalizowanej przez enzym D9.....	79
3.2.4 Walidacja metody	80
3.2.5 Badania inhibitorowe biblioteki związków nukleotydowych	82
3.2.6 Wysokoprzepustowe badania przesiewowe komercyjnej biblioteki związków LOPAC®1280	89

3.2.7	Weryfikacja wyników niezależną metodą na krótkim substracie RNA	91
3.2.7.1	Przygotowanie transkryptów RNA	91
3.2.7.2	Potwierdzenie właściwości inhibitorowych wyselekcjonowanych związków w teście <i>in vitro</i> degradacji RNA	93
3.2.8	Badania krystalograficzne	97
3.3	Badania ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1/DCP2	99
3.3.1	Optymalizacja struktury sondy	100
3.3.2	Optymalizacja warunków reakcji	103
3.3.3	Wyznaczenie parametrów kinetycznych hydrolizy sondy katalizowanej przez kompleks dekapujący PNRC2-DCP1-DCP2	105
3.3.4	Walidacja metody	107
3.3.5	Badania inhibitorowe biblioteki związków nukleotydowych	108
3.3.6	Wysokoprzepustowe badania przesiewowe komercyjnej biblioteki związków LOPAC ^{®1280}	110
3.2.7	Weryfikacja wyników niezależną metodą na krótkim substracie RNA	114
4.	Podsumowanie	118
5.	Część eksperymentalna	122
5.1	Spektrofotometryczne oznaczanie stężeń	122
5.2	Materiały biologiczne	122
5.2.1	Wirusowy enzym dekapujący D9	122
5.2.2	Ludzki kompleks dekapujący PNRC2-DCP1/DCP2	123
5.2.3	Wirusowy enzym dekapujący D10	124
5.3	Synteza sond fluorescencyjnych	125
5.4	Pomiary spektroskopowe	127
5.5	Pomiary z wykorzystaniem HPLC	127
5.5.1.	Monitorowanie hydrolizy sondy m ⁷ GTP-Py katalizowanej przez D9	128
5.5.2.	Badanie podatności związków nukleotydowych na hydrolizę przez D9	128
5.6.	Wysokoprzepustowa metoda przesiewowa (HTS)	129
5.6.1	Wyznaczenie parametrów hydrolizy sondy	129
5.6.2	Wyznaczenie parametru Z'	130
5.6.3	Badania HTS	131
5.6.4	Wyznaczanie parametru IC ₅₀	131
5.7	Synteza RNA	132
5.9	Test <i>in vitro</i> degradacji RNA	134
6.	Bibliografia	135

Publikacje bezpośrednio związane z tematem pracy:

- „*Fluorescence-Based Activity Screening Assay Reveals Small Molecule Inhibitors of Vaccinia Virus mRNA Decapping Enzyme D9*”, **Marcelina Bednarczyk**, Jessica K. Peters, Renata Kasprzyk, Jagoda Starek, Marcin Warmiński, Tomasz Śpiewła, Jeffrey S. Mugridge, John D. Gross, Jacek Jemielity Joanna Kowalska, *ACS Chem. Biol.* **2022**, 17(6), 1460-1471.

Inne publikacje:

- „*Trinucleotide cap analogs with triphosphate chain modifications: synthesis, properties, and evaluation as mRNA capping reagents*”, Warmiński Marcin, Anaïs Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Tomasz Śpiewła, Joanna Żuberek, Karolina Drażkowska, Hanna Kędzierska, Agnieszka Popielec, Marek R. Baranowski, Marta Skłucka, **Marcelina Bednarczyk**, Mirosław Śmiałowski, Karol Wołosewicz, Bartosz Majewski, Remigiusz A. Serwa, Dominika Nowis*, Jakub Gołąb*, Joanna Kowalska*, Jacek Jemielity; zaakceptowane w NAR, **2024**
- „*Trinucleotide mRNA Cap Analogue N6-Benzylated at the Site of Posttranscriptional m6Am Mark Facilitates mRNA purifications and Confers Superior Translational Properties In Vitro and In Vivo*”, Marcin Warmiński, Edyta Trepkowska, Mirosław Śmiałowski, Paweł J. Sikorski, Marek R. Baranowski, **Marcelina Bednarczyk**, Hanna Kędzierska, Bartosz Majewski, Adam Mamot, Diana Papiernik, Agnieszka Popielec, Remigiusz A. Serwa, Britanny A. Shimanski, Piotr Sklepkiwicz, Marta Skłucka, Olga Sokołowska, Tomasz Śpiewła, Diana Toczyłowska-Socha, Zofia Warmińska, Karol Wołosewicz, Joanna Żuberek, Jeffrey S. Migridge, Dominika Nowis*, Jakub Gołąb*, Jacek Jemielity*, Joanna Kowalska*, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, 146(12), 8149-8163;
- „*Synthesis and Evaluation of Diguanosine Cap Analogs Modified at the C8-Position by Suzuki–Miyaura Cross-Coupling: Discovery of 7-Methylguanosine-Based Molecular Rotors*”, Błażej Wojtczak & **Marcelina Bednarczyk**, Paweł J. Sikorski, Anna Wojtczak, Piotr Surynt, Joanna Kowalska & Jacek Jemielity, *J. Org. Chem.* **2023**, 88(11), 6827-6846;

- „*Towards superior mRNA caps accessible by click chemistry: synthesis and translational properties of triazole-bearing oligonucleotide cap analogs*”, Mateusz Kozarski, Karolina Drażkowska, **Marcelina Bednarczyk**, Marcin Warmiński, Jacek Jemielity & Joanna Kowalska, *RCS Adv.* **2023**, 13, 12809-12824;
- „*Fluorescence Anisotropy Assay with Guanine Nucleotides Provides Access to Functional Analysis of Gail Proteins*”, Anna Pepanian, Paul Sommerfeld, Renata Kasprzyk, Toni Kühl, F. Ayberk Binbay, Christoph Hauser, Reik Löser, Robert Wodtke, **Marcelina Bednarczyk**, Mikołaj Chromiński, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity*, Diana Imhof*, Markus Pietsch*, *Anal. Chem.* **2022**, 94(41), 14410-14418;
- „*Fluorinated Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Analogues for Continuous Sulfotransferase Activity Monitoring and Inhibitor Screening by ¹⁹F NMR Spectroscopy*”, Agnieszka Młynarska-Cieślak, Mikołaj Chromiński, Tomasz Śpiewła, Marek R. Baranowski, **Marcelina Bednarczyk**, Jacek Jemielity Joanna Kowalska, *ACS Chem. Biol* **2022**, 17(3), 661-669;
- „*Novel N7-Arylmethyl Substituted Dinucleotide mRNA 5' cap Analogs: Synthesis and Evaluation as Modulators of Translation*”, Radosław Wójcik, Marek R. Baranowski, Łukasz Markiewicz, Dorota Kubacka, **Marcelina Bednarczyk**, Natalia Baran, Anna Wojteczak, Paweł J. Sikorski, Joanna Żuberek, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, *Pharmaceutics* **2021**, 13(11), 1941.

Wystąpienia konferencyjne:

- XXIV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Sztokholm, Szwecja, 28-31 sierpnia 2022 r., **poster**: *Identification of small molecule inhibitors of human decapping complex PNRC2-Dcp1/Dcp2 through fluorescent HTS assay*
- Young Researcher Symposium, Sztokholm, Szwecja, 1 września 2022 r., **prezentacja ustna**: *Identification of small molecule inhibitors of human decapping complex PNRC2-Dcp1/Dcp2 through fluorescent HTS assay*
- 18th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Ceski Krumlov, Czechy, 5-10 czerwca 2022 r., **poster**: *Targeting mRNA decapping proteins – discovery of small molecule inhibitors of Vaccinia Virus decapping enzyme D9 by fluorescence-based activity assay*
- Druga Edycja Wirtualnej Konferencji Naukowej Kampusu Ochota, Warszawa (online), 20-21 września 2021 r., **poster**: *A fluorescence-based high-throughput screening assay for investigation of small molecule inhibitors of Vaccinia Virus decapping enzyme D9* (wyróżnienie)
- Sympozjum Młodych Naukowców 2021, Warszawa (online), 30 sierpnia - 3 września 2021 r., **prezentacja ustna**: *Poszukiwanie małowcząsteczkowych inhibitorów enzymu dekapującego D9 o potencjalnych właściwościach przeciwwirusowych* (wyróżnienie)
- Fizyka Medyczna - Farmacja Fizyczna 2020, Warszawa (online), 25 września 2020 r., **prezentacja ustna**: *Poszukiwanie inhibitorów enzymów dekapujących na przykładzie wirusowego enzymu D9* (wyróżnienie)
- Sympozjum Młodych Naukowców 2020, Warszawa (online), 24-28 sierpnia 2020 r., **prezentacja ustna**: *Opracowanie wysokoprzepustowej metody opartej na fluorescencji do poszukiwania inhibitorów wirusowego enzymu dekapującego D9*
- Pierwsza Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota, Warszawa (online), 30 czerwca - 1 lipca 2020 r., **poster**: *Development of high-throughput screening assay for decapping proteins: targeting viral decapping enzyme D9* (wyróżnienie)
- Summer School 2019 „Nucleic Acid Chemistry and Synthetic Biology”, Würzburg, Niemcy, 28 lipca – 4 sierpnia 2019 r., **poster**: *Investigation of potential inhibitors of viral decapping enzyme D9 using activity assay based on fluorescent turn-on probes*
- 12th EBSA 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, Madryt, Hiszpania, 20-24 lipca 2019 r., **poster**: *A fluorescence-based high-throughput screening assay for inhibitors of viral decapping enzyme D9*

- 24th Annual Meeting of the RNA Society, Kraków, 11-16 czerwca 2019 r., **poster:** *Activity studies of poxvirus decapping enzyme D9*
- 61 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, 17-21 września 2018 r.; **poster:** *Charakterystyka mononukleotydów modyfikowanych w pozycji C8 (7-metylo)guaniny jako potencjalnych inhibitorów białek zależnych od kapu.*
- XXIII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, San Diego, Stany Zjednoczone, 26-30 sierpnia 2018 r.; **poster:** *Biophysical characterization of mononucleotides with C8-modified (7-methyl)guanine as potential inhibitors of cap dependent processes.*

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

- BSA** – z ang. *bovine serum albumin* – albumina surowicy wołowej
- DCP1** – z ang. *decapping enzyme 1* – białko składowe kompleksu dekapującego
- DCP2** – z ang. *decapping enzyme 2* – hydrolaza, główny enzym wchodzący w skład kompleksu dekapującego
- DCPS** – z ang. *decapping scavenger* – enzym degradujący strukturę końca 5' mRNA
- DNA** – z ang. *deoxyribonucleic acid* – kwas deoksyrybonukleinowy
- dsRNA** – z ang. *double stranded RNA* – cząsteczki dwuniciowego RNA
- DTT** – z ang. *dithiothreitol* – ditiotreitól
- FLINT** – z ang. *fluorescence intensity* – metody oparte na pomiarze intensywności fluorescencji
- HEPES** - kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy
- HIT** – z ang. *histidine triad protein* – rodzina białek triady histydynowej
- HTS** – z ang. *high throughput screening* – wysokoprzepustowe eksperymenty przesiewowe
- IC₅₀** – z ang. *half maximal inhibitory concentration* - parametr określający stężenie inhibitora, które hamuje aktywność enzymu o połowę
- IVT** – z ang. *in vitro transcription* – reakcja *in vitro* transkrypcji RNA
- LOPAC** – z ang. *library of pharmacologically active compounds* – komercyjna biblioteka związków czynnych farmakologicznie
- m⁷Guo / m⁷G** – z ang. *N⁷-methylguanosine* - N⁷-metyloguanozyna
- MOPS** – kwas 3-(N-morfolino) propanosulfonowy
- mRNA** – z ang. *messenger ribonucleic acid* – informacyjny kwas rybonukleinowy
- NCLDV** – z ang. *nucleocytoplasmic large DNA viruses* – rodzina nukleocytoplazmatycznych dużych wirusów DNA
- NGD** – z ang. *no-go mRNA decay* – rodzaj procesu kontroli jakości RNA
- NMD** – z ang. *nonsense-mediated mRNA decay* – rodzaj procesu kontroli jakości RNA
- NSD** – z ang. *non-stop mRNA decay* – rodzaj procesu kontroli jakości RNA
- NTP** – z ang. *nucleoside triphosphate* - 5' trifosforan dowolnego nukleozydu

NUDIX – z ang. ***n**ucleoside **d**iphosphate linked to other moiety*, **X** – rodzina enzymów hydrolizujących substraty zawierające difosforany nukleozydów

OAS – z ang. *2'-5'-oligoadenylate synthetase* – syntetaza 2'-5' oligoadenyłowa

PAGE – z ang. ***p**olyacrylamide **g**el **e**lectrophoresis* - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

PKR – z ang. ***p**rotein **k**inase **R**NA-activated* – zależna od dsRNA kinaza białkowa R

PNRC2 – z ang. ***p**roline-rich **n**uclear **r**eceptor **c**oactivator **2*** – białko składowe kompleksu dekapującego pełniące rolę aktywatora

RNA – z ang. ***r**ibonucleic **a**cid* – kwas rybonukleinowy

RNAP – z ang. ***R**NA **p**olymerase* – polimeraza RNA

RNaza L/H – z ang. ***r**ibonuclease **L/H*** – rybonukleaza L/H

RP HPLC – z ang. ***r**eversed-**p**hase **h**igh-**p**erformance **l**iquid **c**hromatography* - wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych

SD – z ang. ***s**tandard **d**eviation* – odchylenie standardowe

SEM – z ang. ***s**tandard **e**rror of the **m**ean* – błąd standardowy średniej

Tris – tris(hydroksymetylo)aminometan

UTR – z ang. ***u**ntranslated **r**egion* - część sekwencji mRNA nie ulegająca translacji

UV-Vis – z ang. ***u**ltraviolet-**v**isible **s**pectroscopy* - spektroskopia w zakresie nadfioletu i światła widzialnego

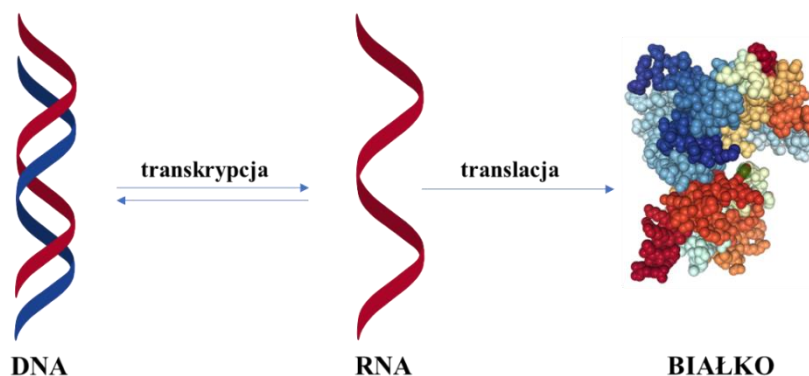
VACV – z łac. ***V**accinia **v**irus* – wirus ospy krowiej

VCE – z ang. ***V**accinia **c**apping **e**nzyme* – enzym z wirusa krowianki wprowadzający strukturę kapu

Inne skróty zostały wyjaśnione w tekście.

1. WPROWADZENIE

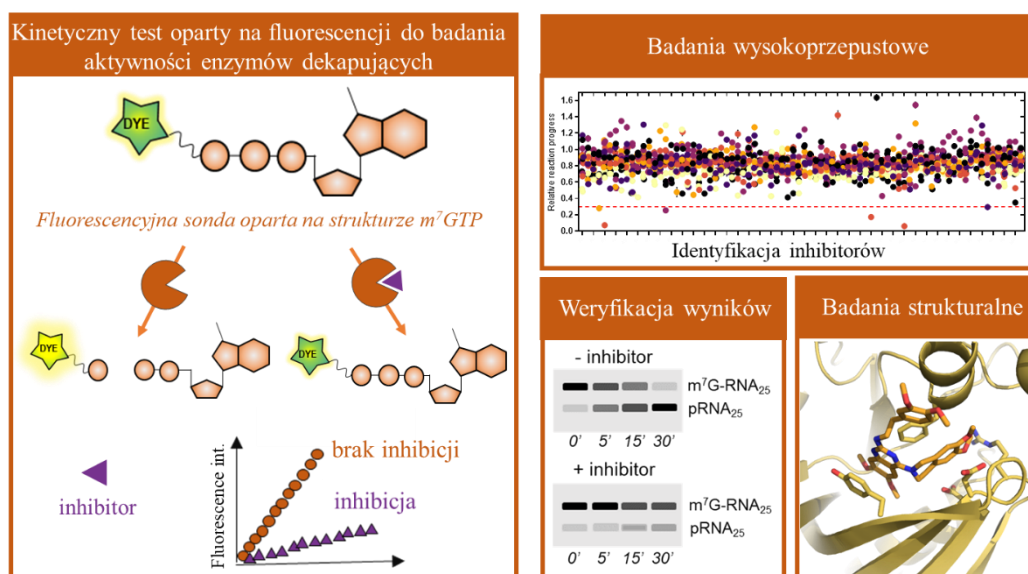
Centralny dogmat biologii molekularnej zaproponowany w 1957 roku przez Francisa Cricka, wybitnego biologa molekularnego i współodkrywcę struktury przestrzennej kwasów nukleinowych, mówi, że przepływ informacji genetycznej następuje od DNA przez RNA do białka (Rys. 1). DNA zawiera całość materiału genetycznego danego organizmu, ale to właśnie cząsteczka RNA (a właściwie mRNA) i przepisane na nią tej wyjątkowej instrukcji pozwala na ekspresję genów i powstawanie funkcjonalnych białek. Na końcu 5' każdej cząsteczki mRNA znajduje się charakterystyczna struktura trifosforanu 7-metyloguanozyny, zwana też czapczką lub kapem (od angielskiej nazwy *cap* oznaczającej czapkę, czapeczkę), która pełni w organizmie szereg bardzo istotnych funkcji. Do najważniejszych należy ochrona informacyjnego RNA przed przedwczesną degradacją przez nukleazy. mRNA jest jednak z istoty cząsteczką nietrwałą i po spełnieniu swojego zadania ulega degradacji. Proces ten może się odbywać na dwóch ścieżkach – albo w kierunku od końca 5' do końca 3', albo w kierunku odwrotnym. Pierwszy z nich inicjowany jest przez proces zwany dekapowaniem, który polega na usunięciu struktury kapu i dalszej degradacji transkryptu przez odpowiednie egzonukleazy. Za hydrolizę fragmentu zawierającego 7-metyloguanozynę odpowiada grupa enzymów z rodziny Nudix i to właśnie jej przedstawiciele i procesy, w których biorą udział, są poniekąd tematem niniejszej rozprawy.



Rys. 1. Centralny dogmat biologii molekularnej sformułowany przez Francisa Cricka w 1957 roku. Teoria ta wyjaśnia, w jaki sposób informacja genetyczna zakodowana w DNA jest przekazywana i wykorzystywana w komórkach – najpierw następuje przepisanie cennej informacji genetycznej z DNA na roboczą cząsteczkę RNA w procesie transkrypcji, a następnie w procesie translacji dochodzi do przetłumaczenia tej informacji na sekwencję aminokwasową polipeptydu i produkcji funkcjonalnego białka.

Głównym celem mojego projektu doktorskiego (Rys. 2) było opracowanie metody, która umożliwi monitorowanie aktywności enzymów zaangażowanych w degradację końca 5' mRNA i zaadaptowanie jej do formatu wysokoprzepustowego

(z ang. *high throughput screening*, HTS). Umożliwiło to szybkie i efektywne przeszukiwanie bibliotek związków w celu identyfikacji potencjalnych inhibitorów badanych enzymów o znaczeniu terapeutycznym. W ramach niniejszej rozprawy zostały opisane wyniki badań nad dwoma enzymami dekapującymi – wirusowym enzymem D9 z wirusa ospy krowiej oraz ludzkim kompleksem dekapującym PNRC2-DCP1-DCP2. W pierwszej części opisany został proces opracowania odpowiedniej metody do śledzenia aktywności enzymów w czasie rzeczywistym, wyboru odpowiedniej sondy fluorescencyjnej i warunków pomiaru, a następnie próba zaadaptowania metody do wysokoprzepustowych badań przesiewowych i jej walidacja przez wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy sondy oraz parametru Z' , będącego miarą jakości danego testu. W dalszej części przedstawiono wyniki badań dwóch bibliotek związków – stworzonej w naszej grupie badawczej biblioteki związków nukleotydowych modyfikowanych w różnych pozycjach zasady azotowej oraz w obrębie mostka fosforanowego oraz komercyjnej biblioteki związków farmakologicznie czynnych LOPAC. Otrzymane wyniki dostarczyły wielu cennych informacji na temat preferencji strukturalnych obu enzymów względem potencjalnych inhibitorów oraz pozwoliły na wyselekcjonowanie kilku związków wykazujących silne właściwości hamujące aktywność badanych obiektów (wartości parametru IC_{50} , charakteryzującego siłę danego inhibitora, w zakresie kilku μM – im niższa wartość, tym silniejszy inhibitor). Wyniki te zostały następnie potwierdzone niezależną metodą przez monitorowanie reakcji dekapingu na krótkim substracie RNA *in vitro*. Sprawdzono również selektywność zidentyfikowanych związków względem innych enzymów dekapujących. Na końcu zostały opisane badania strukturalne, które pozwoliły na scharakteryzowanie oddziaływania enzymu z jednym ze zidentyfikowanych inhibitorów na poziomie atomowym.



Rys. 2. Schematyczny plan realizacji projektu doktorskiego.

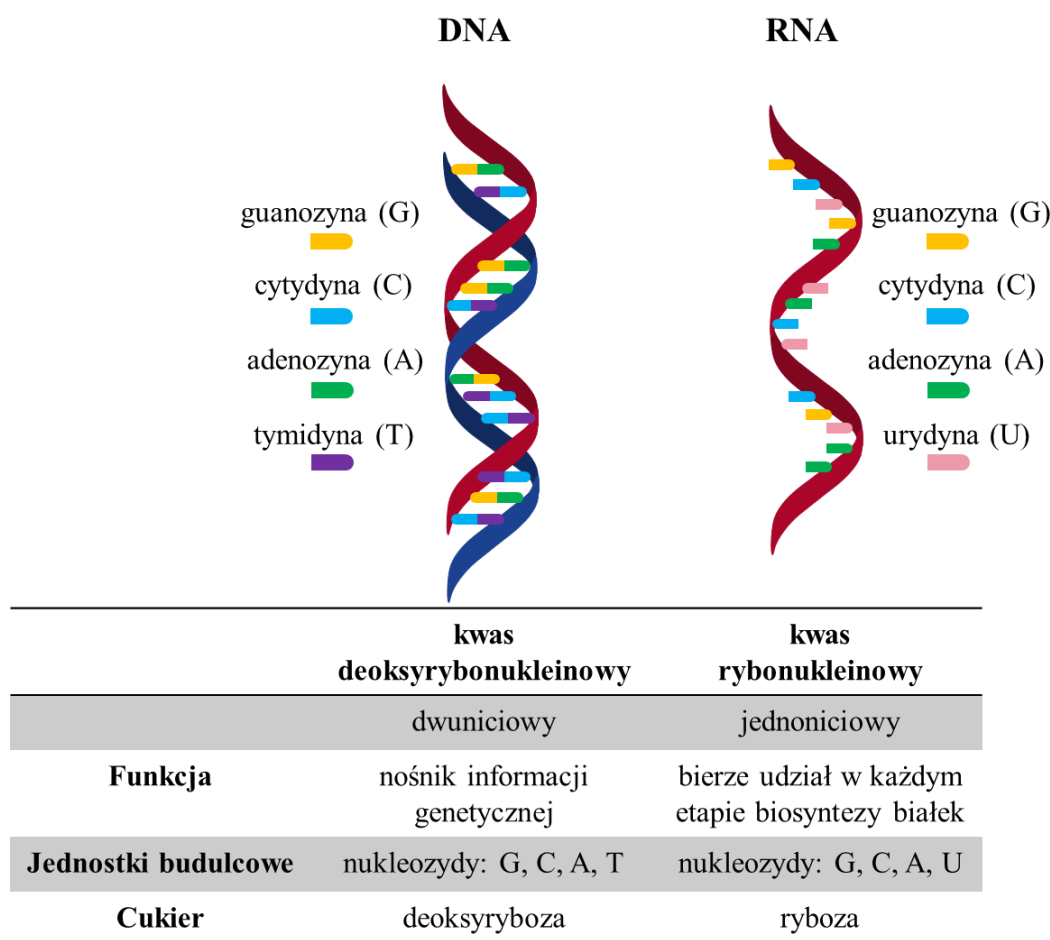
2. PRZEGLĄD LITERATUROWY

W części teoretycznej niniejszej rozprawy przedstawię ogólny zarys tematyki badawczej, której dotyczy praca, aby ułatwić czytelnikowi orientację w części opisującej wyniki i późniejszą dyskusję dotyczącą badań własnych. Zostaną zatem opisane dość dokładnie kwasy nukleinowe, ze szczególnych uwzględnieniem informacyjnego RNA (mRNA) i jego degradacji w komórce oraz wynikających z tego implikacji w przypadku, gdy proces ten jest zaburzony. W świetle ostatnich wydarzeń nie sposób nie wspomnieć też, choćby krótko, o dotychczasowym i przyszłościowym zastosowaniu mRNA w prewencji i terapii różnych chorób. Tematem rozprawy jest poszukiwanie małącząsteczkowych inhibitorów białek, więc na końcu zostanie opisane, w jaki sposób można badać oddziaływania typu białko-ligand i jakie metody biofizyczne są w tym celu stosowane. Przedstawię również aktualny stan wiedzy na temat dotychczas zidentyfikowanych inhibitorów enzymów biorących udział w degradacji końca 5' mRNA.

2.1 KWASY NUKLEINOWE: RODZAJE, BUDOWA I FUNKCJE

DNA i RNA – pod tymi dwoma tak niepozornymi skrótami kryje się ogrom informacji, które definiują każdą istotę żywą. Kwasy nukleinowe, bo o nich mowa, to makrocząsteczki, biopolimery, które biorą udział w przenoszeniu informacji genetycznej i biosyntezie białek organizmu (Rys. 3).

DNA, czyli kwas deoksyrybonukleinowy (z ang. *deoxyribonucleic acid*) pełni funkcję nośnika, na którym znajduje się unikalna dla każdego organizmu sekwencja nukleotydów, która determinuje jego budowę i funkcjonowanie. Każdy nukleotyd zbudowany jest z reszty kwasu fosforowego, cukru – deoksyrybozy oraz połączonej z nim wiązaniami N-glikozydowymi jednej z czterech zasad azotowych: adeniny (A), cytozyny (C), guaniny (G) lub tyminy (T). Nukleotydy łączą się ze sobą poprzez wiązanie 3',5'-fosfodiesterowe, tworząc nić. A dwie komplementarne nici nukleotydowe, stabilizowane wiązaniami wodorowymi i ułożone w podwójną helisę, tworzą cząsteczkę DNA. Za wiązania wodorowe występujące pomiędzy dwiema nićmi helisy odpowiadają zasady azotowe, które parują ze sobą zgodnie z regułą komplementarności. Polega ona na odpowiednim chemicznym i przestrzennym dopasowaniu się zasad. Oznacza to, że cytozyna oddziałuje wyłącznie z guaniną, a adenina z tyminą.



Rys. 3. Schematyczne przedstawienie kwasów nukleinowych. W tabeli znajdują się podstawowe informacje dotyczące budowy dwóch rodzajów kwasów nukleinowych, które znajdują się w komórce.

Kwas rybonukleinowy (RNA, z ang. *ribonucleic acid*), w przeciwieństwie do DNA, jest z kolei jednoniciowy, choć sama jego budowa jest analogiczna, z dwiema tylko różnicami – w cząsteczce RNA znajdziemy cukier rybozę w miejscu deoksyrybozy oraz inną zasadę azotową – uracyl (U) w miejscu tymidyny, która w RNA nie występuje. W związku tym, zmienia się również nieco parowanie zasad i do znanej już pary guanina-cytozyna dołącza również adenina-uracyl. RNA pełni w komórce mnogość różnych funkcji i w zależności od pełnionych zadań wyróżniamy różne rodzaje RNA:

- rybosomalny RNA, rRNA (z ang. *ribosomal ribonucleic acid*) – rodzaj niekodującego RNA, posiadającego funkcję katalityczną i odpowiadającego za biosyntezę białek. W kompleksie z białkami pomocniczymi tworzy rybosom, zbudowany z małej i dużej podjednostki, który pełni rolę „biofabryki”, w której produkowane są białka.
- transportujący RNA, tRNA (z ang. *transfer ribonucleic acid*) – niewielkie cząsteczki RNA o długości ok. kilkudziesięciu nukleotydów, których zadaniem

jest przenoszenie wolnych aminokwasów z cytoplazmy do rybosomów, gdzie następuje synteza polipeptydów w procesie translacji.

- informacyjny RNA, mRNA (z ang. **messenger ribonucleic acid**) – cząsteczka RNA zawierająca informację o sekwencji nukleotydów magazynowaną w DNA. Ten typ RNA zostanie szerzej omówiony w następnym podrozdziale.
- mały jądrowy RNA, snRNA (z ang. **small nuclear ribonucleic acid**) – małe cząsteczki RNA odpowiadające za wycinanie niekodujących sekwencji (tzw. intronów) w procesie składania RNA (z ang. *splicing*).
- mały jąderkowy RNA, snoRNA (z ang. **small nucleolar ribonucleic acid**) – krótkie, niekodujące cząsteczki RNA zlokalizowane głównie w jąderku. Ich zadaniem jest chemiczna modyfikacja nukleotydów w cząsteczkach rRNA.
- heterogenne jądrowy RNA, hnRNA (z ang. **heterogenous nuclear ribonucleic acid**) – heterogenne i niestabilne cząsteczki RNA powstające w jądrze komórkowym, będące prekursorami mRNA, rRNA i tRNA. Przekształcenie to następuje w procesie składania RNA w cytoplazmie.
- mały interferujący RNA, siRNA (z ang. **small interfering ribonucleic acid**) – krótki, dwuniciowy RNA odpowiadający za wyciszanie ekspresji genów. Cząsteczka siRNA wraz z odpowiednimi białkami tworzy kompleks RISC (z ang. **RNA-induced silencing complex**) i wiąże się z komplementarną cząsteczką mRNA, rozcina ją, co prowadzi do jej degradacji i w konsekwencji zahamowania ekspresji docelowego białka.
- mikroRNA, miRNA (z ang. **micro ribonucleic acid**) – niewielkie cząsteczki jednoniciowego RNA o długości około 20 nukleotydów regulujące ekspresję genów. Zasada ich działania jest zbliżona do siRNA, natomiast nie jest wymagana całkowita komplementarność względem docelowego mRNA, co skutkuje zablokowaniem translacji takiego transkryptu.
- mały cytoplazmatyczny RNA, scRNA (z ang. **small cytoplasmic ribonucleic acid**) – niewielka cząsteczka odpowiedzialna za rozpoznawanie sygnałów komórkowych.
- kolisty RNA, circRNA (z ang. **circular ribonucleic acid**) – odkryty stosunkowo niedawno (lata 70. XX wieku) jednoniciowy RNA, którego końce 5' oraz 3' są połączone wiązaniem kowalencyjnym, tworząc zamkniętą pętlę. Za powstawanie cząsteczek circRNA odpowiada mechanizm tzw. *splicing* wstecznego (z ang. *back-splicing*). Przyjmuje się, że ten typ RNA pełni funkcje regulacyjne – wiąże się zarówno z białkami, jak i kwasami nukleinowymi i w ten sposób moduluje procesy, w które zaangażowane są inne rodzaje RNA.

Procentowy udział poszczególnych typów RNA jest bardzo różny i zależy od wielu czynników, jak chociażby rodzaju komórki czy jej stanu fizjologicznego. Uogólniając jednak, można przyjąć, że zdecydowaną większość RNA w komórce ssaczey stanowią cząsteczki rRNA (80-90%) i tRNA (10-15%). Udział mRNA, mimo swojej kluczowej roli, jest szacowany, w zależności od źródeł, tylko na ok. 3-7% wszystkich transkryptów obecnych w komórce. Zawartość pozostałych rodzajów RNA możemy uznać więc za marginalną pod względem ich ilości w komórce [1].

2.1.1 ODDZIAŁYWANIA MIĘDZY ZASADAMI KWASÓW NUKLEINOWYCH

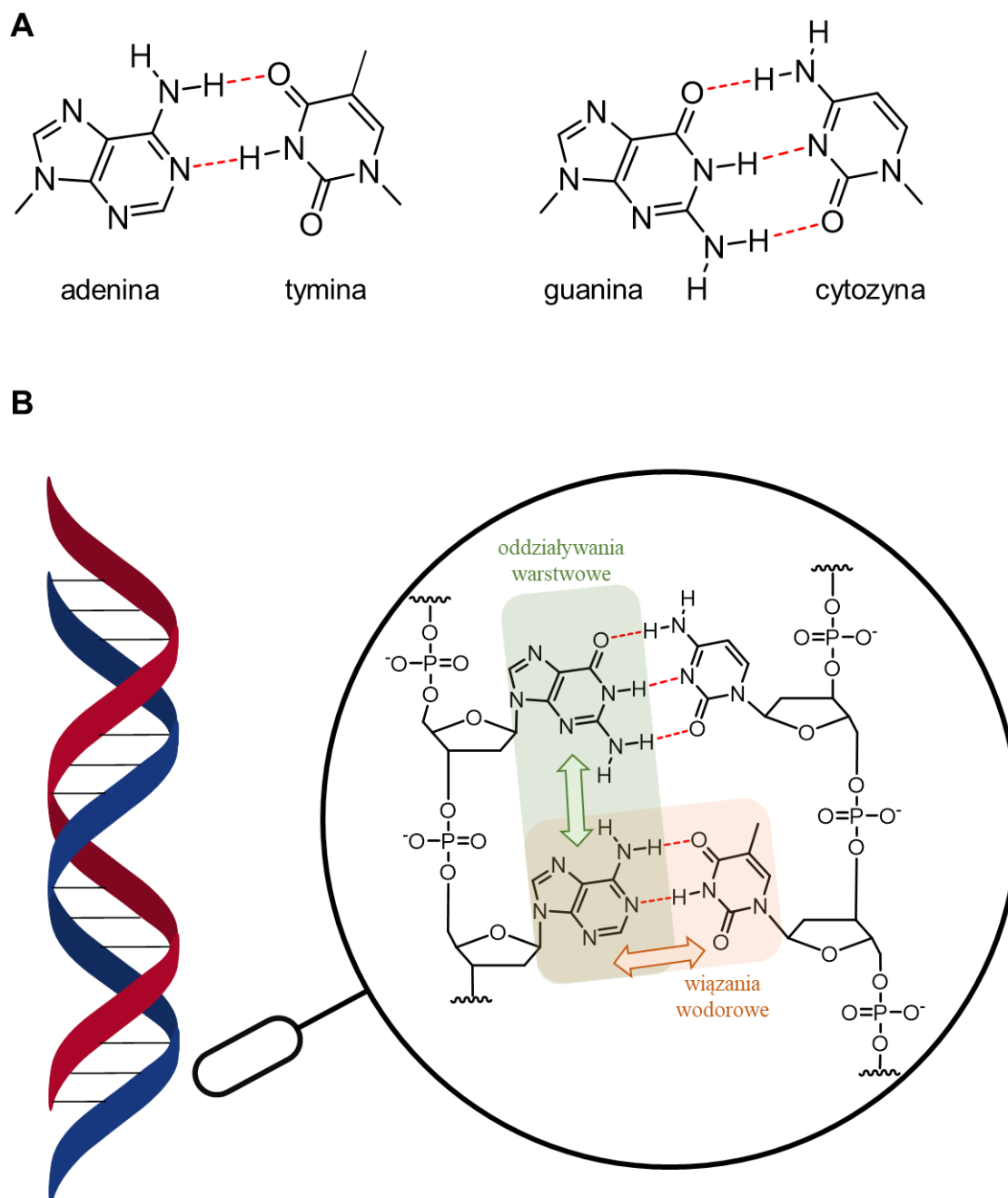
W poprzednim rozdziale wspomniano, że w cząsteczce DNA dwie komplementarne nici nukleotydowe stabilizowane są ze sobą wiązaniami wodorowymi. Oddziaływania te, mimo że należą do stosunkowo słabych (energii wiązania rzędu 1-5 kcal/mol, dla porównania energia typowego wiązania kowalencyjnego między dwoma atomami węgla wynosi ~85 kcal/mol, a wiązania węgiel - tlen aż 175 kcal/mol¹), są jednak niezwykle istotne w przypadku większości układów biologicznych – z ich udziałem zachodzą wszelkie reakcje enzymatyczne i biochemiczne w naturze, są one również odpowiedzialne np. za stabilizowanie struktur drugorzędowych białek czy podwójnej helisy DNA. Często mówi się, że wiązania wodorowe są fundamentalną siłą stabilizującą architekturę biomolekuł. Ich istotą jest oddziaływanie elektrostatyczne – powstają, kiedy atom wodoru związany kowalencyjnie z innym silnie elektroujemnym atomem (np. tlenem, azotem czy siarką) znajdzie się w niewielkiej odległości od innego atomu (najczęściej z innej cząsteczki), który posiada wolną parę elektronową. Oddziaływanie to możemy zapisać schematycznie D—H...A, gdzie D to donor – atom, z którym pierwotnie połączony był atom wodoru i który dostarcza go do nowego wiązania z akceptorem (A). Ze względu na silną elektroujemność donora, atom wodoru zyskuje częściowy ładunek dodatni (δ^+) i może oddziaływać z atomem, który posiada częściowy ładunek ujemny (δ^-). Charakterystyczny rozkład ładunku w tym oddziaływaniu sprawia, że posiada on elektryczny moment dipolowy, który skierowany jest od atomu akceptora do donora. Wiązania wodorowe odpowiadają za parowanie komplementarnych zasad azotowych, tworząc pary Watsona-Cricka i tym samym razem z oddziaływaniami elektrostatycznymi i hydrofobowymi stabilizują specyficzną strukturę dwuniciowej helisy DNA, tak jak to pokazano na Rys. 4. Podobnie sytuacja wygląda w przypadku RNA – kwas rybonukleinowy to cząsteczka dynamiczna i może przyjmować różnorakie struktury przestrzenne wyższego rzędu (drugo- i trzeciorzędowe) w zależności od warunków środowiska i oddziaływań z innymi cząsteczkami biologicznymi. Stąd też można wysnuć prosty wniosek, że istnieje korelacja między

¹ *Biochemistry*, 6th ed.; Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., W.H. Freeman, New York, 2006

strukturą RNA i jego funkcją, a utrzymanie prawidłowej struktury jest więc kluczowe do jego prawidłowego działania i katalizowania różnych reakcji. Na Rys. 5 przedstawiono przykładową strukturę mRNA kodującego ludzką hydrolazę Dcp2, która została przewidziana przy użyciu narzędzia RNA Fold w oprogramowaniu stworzonym przez grupę badaczy z Uniwersytetu Wiedeńskiego pod nazwą ViennaRNA. Oprogramowanie to działa w oparciu o algorytmy liczące minimalną energię swobodną i prawdopodobieństwo parowania zasad. Po prawej stronie znajduje się hipotetyczna struktura przestrzenna sekwencji mRNA o długości ok. 2000 nukleotydów. W czerwonej ramce natomiast został powiększony niewielki fragment całej cząsteczki, który świetnie obrazuje, jak różne motywy strukturalne może przyjąć pojedyncza nić RNA – na strukturę drugorzędową RNA składają się fragmenty dwuniciowe, różne pętle, wybrzuszenia czy charakterystyczne motywy typu spinka do włosów (z ang. *hairpin*) oraz możliwe kombinacje tych różnych wzorów. Za stabilizację tych motywów odpowiadają właśnie wiązania wodorowe, które występują nie tylko między dwiema zasadami azotowymi, ale również między zasadą a cukrowo-fosforanowym szkieletem cząsteczki. Ponadto, w cząsteczce RNA oprócz kanonicznych par Watsona-Cricka możemy również znaleźć dużo mniej stabilne pary pomiędzy guaniną a uracylem (z ang. *wobble base pair*), które również oddziałują ze sobą za pośrednictwem wiązań wodorowych [2,3].

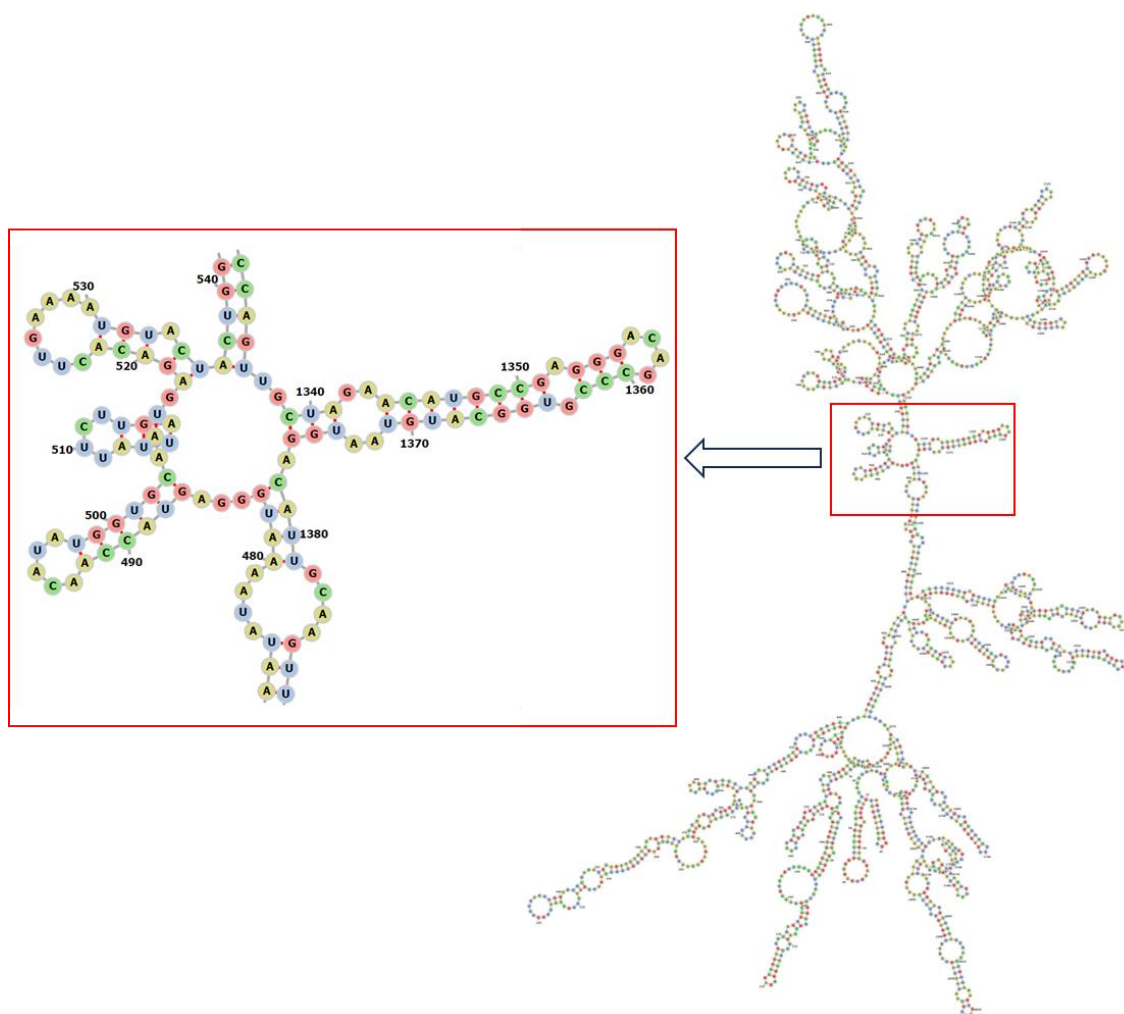
Zupełnie innym typem oddziaływań między dwiema zasadami azotowymi, które również biorą udział w stabilizowaniu zarówno podwójnej helisy DNA, jak i struktur drugo- i trzeciorzędowych RNA są oddziaływania warstwowe (inaczej: oddziaływania π - π lub *stackingowe*, od ang. π - π *stacking interaction*). Występują one pomiędzy płaskimi fragmentami cząsteczek, np. pierścieniami (tak jak to pokazano na Rys. 4B). Z fizycznego punktu widzenia są to niekowalencyjne oddziaływania, które powstają najczęściej pomiędzy układami wiązań π (powstałymi w wyniku bocznego nakładania się orbitali atomowych, np. w różnego rodzaju układach aromatycznych). Oddziaływania warstwowe są wypadkową trzech innych typów oddziaływań: elektrostatycznych, hydrofobowych oraz dyspersyjnych oddziaływań Londona, jednak wkład poszczególnych składowych może się zmieniać w zależności od środowiska oddziaływania, rozpuszczalnika, w którym dzieje się dany proces czy zmian strukturalnych czy konformacyjnych pomiędzy składnikami oddziaływania [4]. Wkład oddziaływań warstwowych w stabilizację struktur wyższego rzędu DNA i RNA zależy od sekwencji zasad nukleinowych – największą efektywnością charakteryzują się oddziaływania między purynami, a najmniejszą – między pirymidynami. Zostało to potwierdzone obliczeniami komputerowymi, w których oddziaływanie pomiędzy dwoma pierścieniami zasad guaninowych charakteryzuje się największą stabilnością

(energia około $-47,3$ kJ/mol) w przeciwieństwie do oddziaływania dwóch uracyli (energia $27,28$ kJ/mol)².



Rys. 4. Oddziaływania występujące między zasadami kwasów nukleinowych. A) Pary zasad Watsona-Cricka na przykładzie kanonicznych zasad azotowych budujących DNA. Czerwoną linią przerywaną zaznaczono wiązania wodorowe. **B)** Oddziaływania między zasadami azotowymi stabilizują podwójną helisę DNA – w pomarańczowym polu przedstawiono dwie zasady połączone wiązaniem wodorowym, w zielonym – dwie zasady oddziałujące ze sobą warstwowo.

² *Biofizyka molekularna: zjawiska, instrumenty, modelowanie*, wyd. 1; G. Ślósarek, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, **2011**



Rys. 5. Struktura przestrzenna cząsteczki RNA na przykładzie mRNA kodującego ludzki enzym dekapujący Dcp2. Sekwencja kodująca o długości ok. 2000 nukleotydów pobrana z bazy Europejskiego Archiwum Nukleotydów (ENA, sekwencja nukleotydowa: AY146650, dostęp: 10.11.2023) odpowiadająca ludzkiej hydrolazie Dcp2 o symbolu Q8IU60 w bazie Uniprot. Struktura drugorzędowa RNA została wyznaczona przy użyciu darmowego narzędzia RNAFold, które dokonuje predykcji struktury przestrzennej w oparciu o obliczoną minimalną energię swobodną (z ang. *MFE – minimal free energy*) oraz prawdopodobieństwo parowania zasad [5-7].

Ponadto, okazuje się, że oddziaływania warstwowe mają również wpływ na potencjał tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy dwiema ułożonymi warstwowo zasadami DNA lub RNA. Naukowcy sprawdzili oddziaływania między zasadami w dupleksach DNA-DNA oraz hybrydach DNA-RNA i doszli do wniosku, że odpowiednio ułożone względem siebie pierścienie aromatyczne zasad azotowych połączone oddziaływaniami *stackingowymi* potrafią zwiększać zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, wzmacniać siłę tych wiązań poprzez wzrost transferu ładunku pomiędzy dwoma partnerami wiązania, a także zwiększać liczbę miejsc wiązania cząsteczek wody, a co się z tym wiąże – tworzyć zupełnie nowe pary wodorowe [8].

Wiązania wodorowe i oddziaływania warstwowe to dwa typy interakcji niekowalencyjnych, które mają największy wpływ na stabilizowanie struktury i dynamikę kwasów nukleinowych [9], dlatego zostały one opisane w tym podrozdziale trochę szerzej. Do pozostałych zaliczamy jeszcze oddziaływania van der Waalsa, elektrostatyczne i hydrofobowe. Wszystkie stanowią komplet narzędzi, który pozwala opisać i scharakteryzować oddziaływania występujące w różnych układach biologicznych, m.in. pomiędzy kwasami nukleinowymi i białkami a ligandami. Ma to istotne znaczenie chociażby w przemyśle farmaceutycznym i projektowaniu nowych leków opartych np. na wiązaniu się małowcząsteczkowego inhibitora z białkowym celem terapeutycznym.

2.2 MRNA – INFORMACYJNY KWAS RYBONUKLEINOWY

mRNA (z ang. *messenger* RNA) to jednoniciowy informacyjny kwas rybonukleinowy, który bierze udział w procesie translacji, czyli biosyntezy białek. Stanowi on niejako matrycę, na której zapisana jest kolejność nukleotydów, a w konsekwencji aminokwasów w łańcuchu białkowym. Może mieć różną długość, w zależności od wielkości białka, które koduje i różny czas półtrwania, choć z reguły przyjmuje się, że mRNA jest cząsteczką nietrwałą – po wykonaniu swojego zadania ulega degradacji. U bakterii mRNA trwa od kilku sekund do ok. godziny. Natomiast w przypadku ssaków okres półtrwania przeciętnej cząsteczki mRNA waha się od kilku minut do nawet kilku dni [10,11].

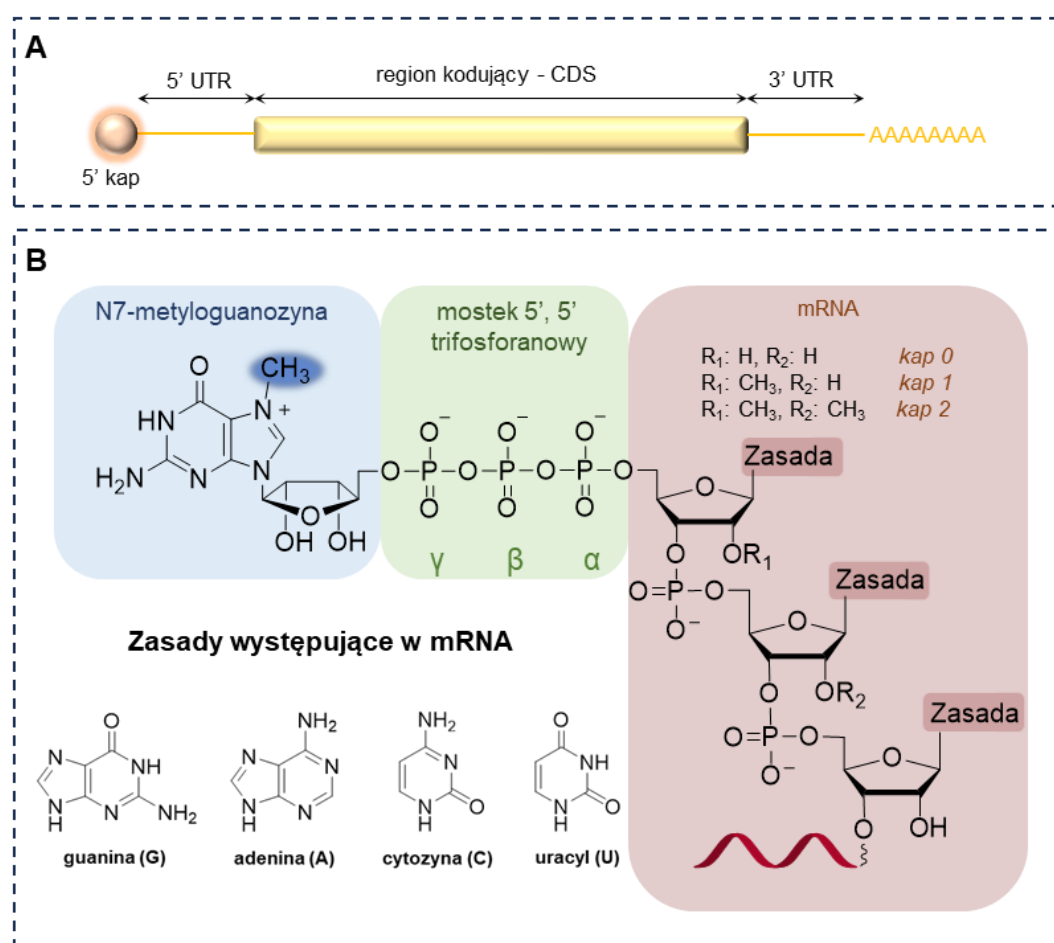
Pierwsze wzmianki o istnieniu tego typu RNA pojawiły się w 1961 r., kiedy to w *Nature* ukazały się dwa artykuły, w których opisano izolację informacyjnego RNA, nazwanego wtedy „niestabilnym kwasem nukleinowym/intermediatem” [12,13]. Mniej więcej w tym samym czasie dwóch francuskich naukowców, Jacques Monod i François Jacobo, opublikowało pracę przeglądową w *Journal of Molecular Biology*, w której sformułowali oni koncepcję „strukturalnego posłańca” (informacyjnego RNA) i przypisali mu udział w regulacji genów [14]. Wszystkie te prace przyczyniły się w znaczący sposób do zrozumienia, w jaki sposób informacja genetyczna zawarta w DNA prowadzi do powstania nowych białek.

2.2.1 BUDOWA I FUNKCJE MRNA

Pod względem budowy chemicznej mRNA nie różni się zasadniczo od swoich pozostałych krewnych z rodziny RNA. Składa się z czterech wymienionych już wcześniej zasad azotowych (C, G, A, U) połączonych ze sobą wiązaniem 3',5'-fosfodiestrowym. To, co wyróżnia mRNA to jego końce (Rys. 6A). Na końcu 3' znajduje się ciąg reszt adeninowych, nazywany ogonem poli(A). Do jego głównych funkcji zaliczamy

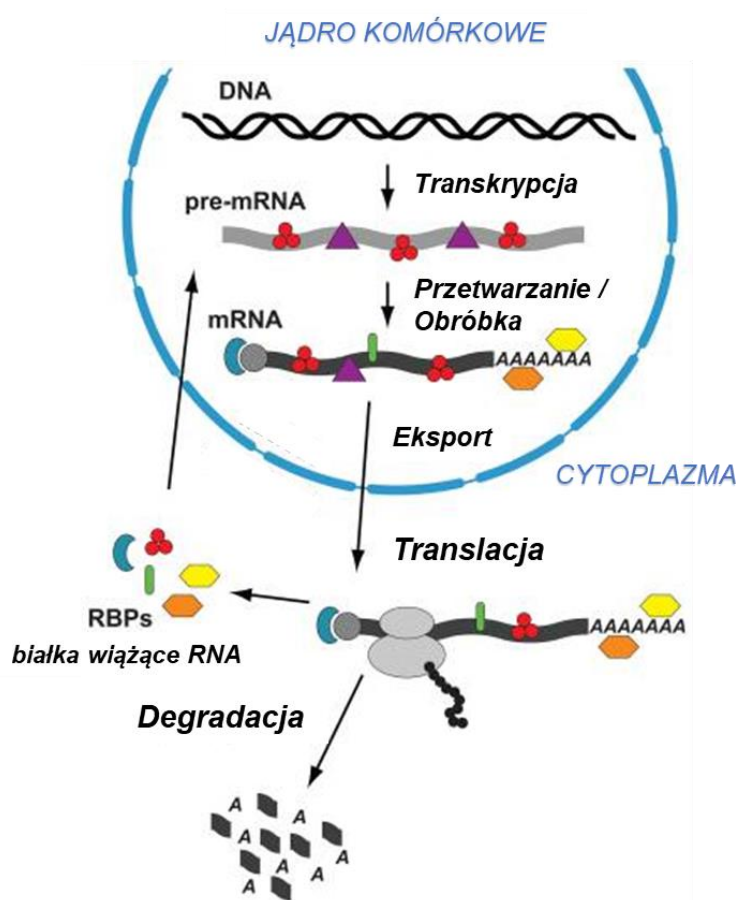
zwiększenie stabilności mRNA oraz jego ochronę przed przedwczesną degradacją od końca 3'. Natomiast na końcu 5' znajduje się struktura zwana „kapem” (od ang. *cap* - czapeczka). Składa się ona z unikalnej zasady – 7-metyloguanozyny, która jest połączona z pierwszą transkrybowaną zasadą łańcucha mRNA za pomocą mostka 5'-5' trifosforanowego. Taka modyfikacja końca 5' odbywa się już na wczesnym etapie transkrypcji. Jeśli transkrypt zawiera samą 7-metyloguanozynę, mamy do czynienia z kapem 0, jeśli występują dodatkowe metylacje na rybozach kolejnych transkrybowanych nukleotydów – z kapem 1 lub kapem 2 (Rys. 6B, różowe pole). Proces biosyntezy 5' kapu zostanie opisany szerzej w kolejnych podrozdziałach.

Budowa mRNA



Rys. 6. Budowa mRNA. **A)** Schematyczna budowa cząsteczki mRNA – struktura 5' kapu (7-metyloguanozyny), następnie mogący zawierać różne sekwencje sygnałowe rejon 5' niepodlegający translacji, 5' UTR (z ang. *UTR* – *untranslated region*), rejon kodujący sekwencję aminokwasów w cząsteczce białka, CDS (z ang. *CDS* – *coding sequence*), dalej znajduje się analogiczny jak w przypadku 5' końca rejon 3' niepodlegający translacji, 3' UTR oraz ogon poliadenylowy, poli(A); **B)** Chemiczna budowa końca 5' cząsteczki mRNA.

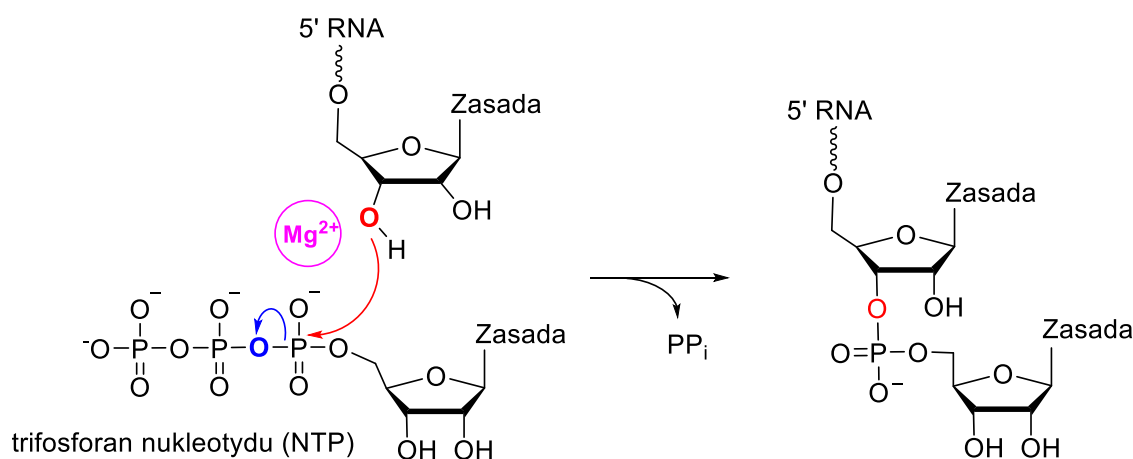
Mimo że procentowy udział mRNA wśród wszystkich klas RNA występujących w komórce jest stosunkowo mały (szacuje się, że nie przekracza on ~5% [15]) to jego rola jest kluczowa dla funkcjonowania całego organizmu. Główną funkcją mRNA jest przenoszenie informacji o sekwencji polipeptydów z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie znajduje się aparat translacyjny. Z tego względu mRNA często nazywa się matrycą do syntezy białek. Prześledzimy teraz cykl życia cząsteczki mRNA, na który składa się kilka etapów – od powstania i dojrzewania w jądrze komórkowym, przez eksport do cytoplazmy, gdzie odgrywa kluczową rolę w procesie translacji, aż po jego degradację (Rys. 7).



Rys. 7. Cykl życia mRNA. mRNA jest transkrybowane w jądrze komórkowym. Po procesie obróbki powstaje dojrzała cząsteczka mRNA, która jest transportowana do cytoplazmy, gdzie ulega translacji za pośrednictwem rybosomów. Po spełnieniu swojej roli mRNA jest degradowane. W każdy z wymienionych etapów zaangażowane są wyspecjalizowane białka i enzymy, które rozpoznają i wiążą się z cząsteczką mRNA. Rysunek zaczerpnięty z [16].

Proces tworzenia nowego łańcucha mRNA poprzez przepisanie informacji genetycznej wyrażonej w postaci sekwencji nukleotydowej z cząsteczki DNA na RNA nazywany jest transkrypcją i jest katalizowany przez enzym zwany polimerazą RNA (z ang. *RNAP* – **RNA polymerase**; u eukariotów jest to polimeraza RNA II – RNA Pol II). Można wyróżnić w nim trzy główne etapy: inicjację, elongację oraz terminację.

Inicjacja transkrypcji polega na tym, że polimeraza znajduje odpowiedni odcinek w łańcuchu DNA, zwany miejscem promotorowym lub promotorem (składa się on z tzw. kasety TATA oraz innych sekwencji położonych od strony końca 5'), który w specyficzny sposób wiąże enzym i sygnalizuje początek genu. Jest to dla enzymu znak do rozpoczęcia wydłużania łańcucha RNA, czyli do jego elongacji. Dzieje się to w ten sposób, że polimeraza lokalnie rozplata dwuniciową matrycę DNA, tworząc tzw. bąbel transkrypcyjny, przesuwa się wzdłuż niej i dobudowuje kolejne podjednostki do nowo syntetyzowanej nici RNA, tworząc pary typu Watsona-Cricka między komplementarnymi zasadami. Dołączanie kolejnych nukleotydów odbywa się poprzez nukleofilowy atak grupy 3' OH RNA na atom α trifosforanu rybonukleozydu, w wyniku czego zostaje uformowane wiązanie 3',5'-fosfodiesterowe i uwolniony pirofosforan (PP_i) (Rys. 8).



Rys. 8. Elongacja łańcucha RNA. Schemat przedstawia tworzenie się wiązania fosfodiesterowego pomiędzy kolejnymi dobudowywanymi nukleotydami nici RNA.

Elongacja trwa do momentu aż polimeraza napotka na swej drodze sygnał terminacji. Niestety u eukariotów wciąż nie jest to dobrze poznany proces. Jednym z takich sygnałów może być, podobnie jak u prokariotów, zawarty w matrycy DNA ciąg par GC, po którym następuje rejon bogaty w pary AT. Guanina paruje z cytozyną, tworząc stabilną strukturę spinki do włosów, a za nią znajduje się sekwencja kilku reszt urydynowych, oligo(U), gdzie transkrypcja ostatecznie kończy swój bieg. Jednak zdecydowana większość transkryptów eukariotycznych posiada na końcu 3' ogon poliadenylowy, poli(A), czyli ciąg reszt adeninowych o długości od kilkudziesięciu do nawet 200-300 nukleotydów. Nie jest on jednak kodowany na matrycy DNA. Po terminacji transkrypcji nowo powstały RNA jest rozcinany na końcu 3' przez specyficzną nukleazę, która rozpoznaje sekwencję nukleotydową: AAUAAA. W miejscu cięcia inny enzym, polimeraza poli(A), dobudowuje ciąg reszt adeninowych. Bezpośrednio po transkrypcji nie RNA ulega jeszcze redagowaniu (z ang. *RNA editing*). Jest to mechanizm, który polega na modyfikowaniu zawartości informacyjnej cząsteczki pre-mRNA, np. poprzez insercję

(wstawienie), delecję (usunięcie) czy też wymianę niektórych nukleotydów w sekwencji. Zmiany te mogą mieć wpływ na aktywność czy funkcjonalność takiego mRNA. Tak zmodyfikowany wstępny transkrypt (prekursor mRNA, tzw. pre-mRNA) zawiera jeszcze w swojej strukturze introny, czyli niekodujące sekwencje i musi zostać poddany dalszej obróbce. Dzieje się tak w procesie zwanym składaniem lub dojrzewaniem mRNA (z ang. *mRNA splicing*), w trakcie którego niekodujące fragmenty są wycinane, a eksony (fragmenty kodujące) składane, tworząc funkcjonalną cząsteczkę. W rzeczywistości transkrypcja i obróbka RNA (zarówno dodawanie kapu na końcu 5', poliadenylacja na końcu 3', jak i redagowanie czy składanie RNA) są mechanizmami sprzężonymi i mogą zachodzić jednocześnie, jeszcze przed zakończeniem poprzedniego etapu, np. synteza 5' kapu rozpoczyna się tuż po inicjacji procesu transkrypcji. W pełni dojrzały i funkcjonalny RNA po takiej obróbce musi zostać eksportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie odbywa się translacja, czyli biosynteza białka. Transport ten jest regulowany przez kilka różnych ścieżek sygnałowych i opiera się na złożonej sieci oddziaływań wielu różnych białek pomiędzy sobą. W konsekwencji możliwy jest eksport mRNA z jądra, który odbywa się za pośrednictwem jądrowych kompleksów porowych (z ang. *NPC – nuclear pore complex*), tworzących tunel przechodzący przez dwuwarstwową otoczkę jądrową. Wspomniano już wcześniej, iż obróbka potranskrypcyjna mRNA odbywa się jeszcze w trakcie trwania samej transkrypcji. I na tym samym etapie dochodzi również do rozpoznania nici pre-mRNA przez odpowiednie białka, co prowadzi do utworzenia kompleksu – informacyjnej rybonukleoproteiny (z ang. *mRNP – messenger ribonucleoprotein*). Wśród tych zasocjowanych białek znajdują się m.in. białka wiążące kap (z ang. *CBP – cap binding proteins*), inne białka wiążące RNA czy zaangażowane w proces składania mRNA, jak również i takie białka, które następnie pośredniczą w dostarczeniu mRNA do kompleksu porowego. Sugeruje to, że wszystkie te procesy są ze sobą ściśle powiązane i dzięki temu transportowane na zewnątrz są cząsteczki tylko w pełni dojrzałe i funkcjonalne [17-19]. Jeszcze w trakcie obróbki potranskrypcyjnej RNA tworzy się kompleks białek TREX (z ang. *transcription-export*), którego zadaniem jest związanie RNA i dostarczenie go do porów jądrowych. Tam angażowane są receptory transportu jądrowego, m.in. z grupy białek NXF (z ang. *nuclear export factors*) – u ludzi są to białka NXF1-NXT1 lub inaczej: TAP-p15 (białko NXF1 nazywane jest również TAP, a jego kofaktor NXT1 – p15, stąd nazwa kompleksu). Białka te oddziałują następnie z nukleoporynami bogatymi w powtórzenia FG (fenyloalanina-glicyna), z których zbudowana jest centralna część jądrowego kompleksu porowego i w ten sposób pośredniczą z eksporcie mRNP do cytozolu. Jest to najczęstsza ścieżka, choć oczywiście nie jedyna. Część endogennego mRNA oraz wirusowego RNA jest na przykład transportowana na zewnątrz jądra przy pomocy białek z rodziny eksportyn, które stanowią główny sposób transportu dla innych cząsteczek. W cytoplazmie mRNA wiąże

się z czynnikami inicjacji translacji (z ang. *IF* – *initiation factor*) i rekrutuje jednostki rybosomowe, aby rozpocząć biosyntezę białek.

2.2.2 STRUKTURA KOŃCA 5' MRNA (KAPU)

Wspomniano już wcześniej, że struktura końca 5' to pewnego rodzaju znamię, które odróżnia mRNA spośród innych typów RNA w komórce. Składa się ona z zasady – dodatnio naładowanej 7-metyloguanozyny – przyłączonej do pierwszego transkrybowanego nukleotydu poprzez mostek 5', 5'-trifosforanowy. Jest to połączenie dość unikalne i niespotykane w tego typu cząsteczkach i w konsekwencji, nadaje mRNA nowe właściwości. Przede wszystkim, obecność kapu chroni łańcuch mRNA przed rozpoznaniem i przedwczesną degradacją przez 5'-egzonukleazy. Dodatkowy ładunek w pozycji N7 guaniny również zmienia nieco właściwości samej zasady i umożliwia dodatkowe oddziaływania z białkami [20].

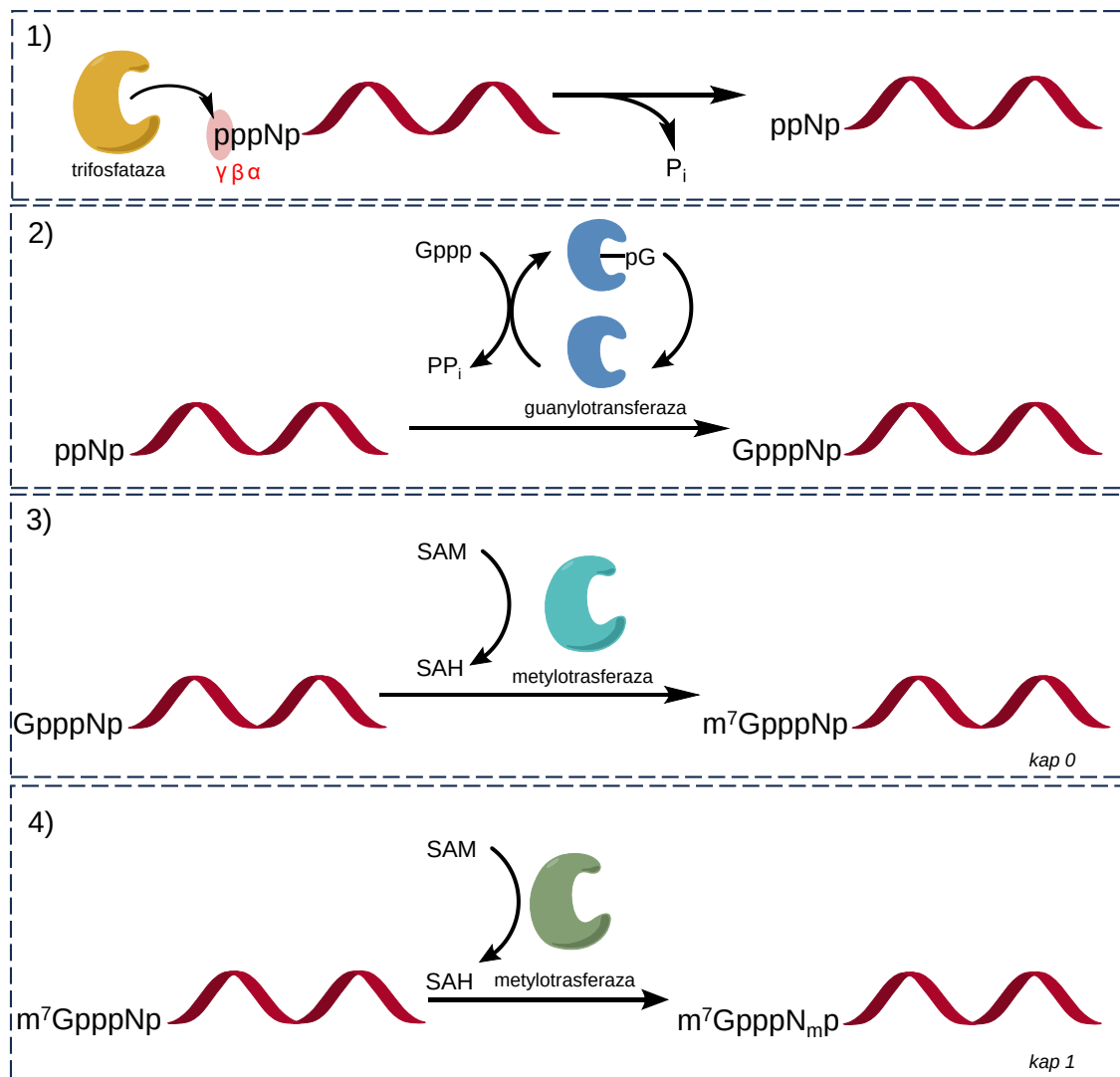
Pomimo dość ściśle określonej struktury, występuje pewne zróżnicowanie w obrębie końca 5' w różnych cząsteczkach i jest to związane głównie z obecnością dodatkowych grup metylowych, które mogą zostać wprowadzone do struktury kapu w procesie obróbki potranskrypcyjnej. Istnieją zarówno cząsteczki RNA o zaledwie jednej metylacji na nieprzetworzonym końcu 5' (metylacja fosforanu γ), jak w przypadku transkryptów ssaczych o nazwie U6 i 7SK (snRNA), jak i dużo bardziej skomplikowane struktury, jak np. $m^7Gpppm^{6,6}A_m pA_m pC_m pm^3U_m$, które występują np. u świrdowca (pasożyt) i które posiadają aż osiem dodatkowych metylacji [21]. Jeśli skupimy się jednak tylko na klasycznym kapie (czyli transkryptach z obecnością guanozyny na końcu 5') to o strukturze z jedną metylacją w pozycji N7 guanozyny mówimy, że jest to „kap 0” i jest to cecha charakterystyczna małej części eukariotycznego mRNA i większości cząsteczek wirusowego RNA. Jednak w bardzo wielu przypadkach RNA jest dalej modyfikowany poprzez dodatkowe metylacje, czy to w obrębie samej struktury 7-metyloguanozyny (tzw. kap TMG, czyli $m^{2,2,7}G$, struktura obecna w snRNA i snoRNA, cząsteczka sygnałowa odpowiedzialna za import do jądra komórkowego, co jest kluczowe w przypadku dostarczania terapeutycznych kwasów nukleinowych i białek), czy też kilku pierwszych transkrybowanych reszt nukleozydowych, jak to występuje w przypadku wyższych eukariotów. Mowa tu o dodatkowej metylacji w pozycji 2' rybozy (2'-O) pierwszego („kap 1”) i drugiego („kap 2”) nukleozydu. Badania pokazują, że w transkryptomie człowieka występuje tylko mRNA zawierający zarówno metylacje w pozycji N7-guanozyny, jak i 2'-O rybozy. Dodatkowo, około połowa transkryptów zawiera również grupę metylową w pozycji 2'-O drugiego transkrybowanego nukleozydu [22]. Poza metylacją grup hydroksylowych możliwe są również modyfikacje innych pozycji w obrębie zasady. Najbardziej rozpowszechniona jest metylacja pierwszej transkrybowanej adeniny w pozycji N6 [23,24].

2.2.2.1 BIOSYNTeza KAPU

Wprowadzenie struktury kapu na końcu 5' RNA jest pierwszą modyfikacją, jakiej ulega powstający transkrypt. Proces ten rozpoczyna się praktycznie od razu po inicjacji transkrypcji, kiedy nieć składa się już z około 25-30 nukleotydów [25,26]. To właśnie wtedy na końcu 5' transkryptu, na którym znajduje się niemodyfikowany trifosforan (5'ppp), następuje dodanie struktury kapu. Biosynteza kapu jest procesem dość złożonym (Rys. 9). Najpierw następuje hydroliza fosforanu γ na końcu 5' nowo powstałego pre-RNA przez trifosfatazę (z ang. *TPase* - **triphosphatase**), co prowadzi do powstania mRNA z difosforanem na końcu (pp-RNA). Następnie guanylotrasferaza (z ang. *GTase* – **guanyltransferase**) katalizuje transfer monofosforanu guanozyny (GMP) na koniec 5' pre-RNA poprzez utworzenie kowalencyjnego produktu pośredniego, lizyny-GMP, a w końcowym etapie dochodzi do wprowadzenia grupy metylowej w pozycji N7 guanozyny przez guanylo-N7-metylotransferazę (z ang. *N7-MTase* – **N7-methyltransferase**), co prowadzi do powstania „kapu 0”. Dodatkowo, inny enzym z rodziny metylotransferaz – specyficzna względem m⁷G CMTr1 (z ang. *cap methyltransferase*) metyluje grupę hydroksylową rybozy pierwszego transkrybowanego nukleotydu, tworząc „kap 1”. Źródłem grupy metylowej w przypadku obu tych reakcji jest SAM (S-adenozylometionina) – naturalna substancja chemiczna, pochodna metioniny i adenozyliny, która występuje w każdej komórce żywej i w głównej mierze pełni rolę właśnie donora grupy -CH₃ w reakcjach chemicznych, ulegając przekształceniu do SAH-u (S-adenozylhomocysteiny). Jak już wspomniano, obie te modyfikacje zachodzą ko-transkrypcyjnie, w jądrze komórkowym. Natomiast następne modyfikacje ryboz w kolejnych nukleotydach, tworzące kolejne struktury kapów („kap 2”, „3”...) zachodzą już w cytoplazmie.

Oczywiście, biosynteza kapu nie jest procesem idealnym i w trakcie szeregu tych reakcji mogą zdarzyć się błędy, które skutkują powstawaniem wadliwych transkryptów z nie w pełni prawidłowo uformowaną strukturą końca 5'. Takie transkrypty są нефunkcjonalne i muszą zostać usunięte. Okazuje się, że komórka jest sobie w stanie z nimi poradzić dzięki swojemu wewnętrznemu systemowi kontroli jakości [27,28]. W naszych komórkach występuje na przykład trójfunkcyjny enzym DXO/Dom3z, który odpowiada za specyficzny dekaping (usuwanie struktury kapu; z ang. *decapping*) transkryptów kapowanych, ale niemetylowanych (rozpoczynających się od GpppN), a więc wadliwych oraz hydrolizę powstającego w jego następstwie monofosforanu RNA od końca 5'. Badania pokazały, że inaktywacja (z ang. *knockout*) tego białka w komórkach prowadzi do błędów w składaniu kilku pierwszych intronów (*splicing*) oraz nieprawidłowości w procesie tworzenia ogona poli(A), co jest przesłanką świadczącą

o tym, że zarówno składanie RNA, jak i poliadenylacja są komórkowymi procesami zaangażowanymi w ten wewnętrzny nadzór jakości powstających transkryptów [28].



Rys. 9. Biosynteza kapu. Wprowadzenie struktury 7-metyloguanozyny na końcu 5' transkryptu RNA jest procesem wieloetapowym. W pierwszej kolejności enzym trifosfataza hydrolizuje fosforan γ na końcu nici RNA (1), a następnie guanylotransferaza przenosi GMP na koniec 5' pre-RNA (2). W ostatnim etapie metylotransferaza w obecności donora grupy metylowej (SAM) wprowadza metylację w pozycję N7 guaniny, tworząc strukturę „kapu 0” (3). Inny rodzaj metylotransferazy odpowiada za metylację grupy hydroksylowej rybozy pierwszego transkrybowanego nukleozydu, w wyniku czego powstaje „kap 1” (4).

2.2.2.2 FUNKCJE BIOLOGICZNE STRUKTURY KAPU

Okazuje się, że tak niewielka modyfikacja, jaką jest obecność kapu na końcu 5' transkryptu mRNA pełni w komórce szereg różnych zadań. Poza dość oczywistymi funkcjami jak zwiększenie stabilności cząsteczki mRNA poprzez ochronę końca 5' przed nukleazami i fosfatazami [27], kap jest odpowiedzialny również za wiele kluczowych procesów zachodzących w komórce. Możemy te procesy podzielić na dwie grupy – te, które mają miejsce jeszcze w jądrze komórkowym oraz te zachodzące już w cytoplazmie, po przetransportowaniu dojrzałego mRNA przez otoczkę jądrową do cytozolu.

W jądrze komórkowym m⁷G odgrywa kluczową rolę w prawidłowym i wydajnym mechanizmie składania pre-mRNA. Dzieje się tak poprzez oddziaływanie z jądrowym kompleksem wiążącym kap, CBC (z ang. *cap-binding complex*). Kompleks ten składa się z dwóch białek – CBP80 oraz CBP20, które rozpoznają i wiążą strukturę 7-metyloguanozyny jeszcze w trakcie trwania transkrypcji. Powstały kompleks kapu z CBC rekrutuje U4/U6·U5 snRNP (z ang. **s**mall **n**uclear **r**ibonucleoprotein; część *spliceosomu* – dużego kompleksu snRNA i białek biorącego udział w składaniu pre-mRNA) i inicjuje proces wycinania intronów i składania eksonów w funkcjonalną cząsteczkę mRNA [29]. Ponadto, CBC, a więc również i kap, pośredniczy w przetwarzaniu końca 3' pre-mRNA, co zostało potwierdzone przez Flaherty i wsp. [30] w eksperymencie, w którym związany z kapem CBC koimmunoprecypitował z czynnikami białkowymi związanymi z poliadenylacją. Ma on również swój udział w terminacji transkrypcji i degradacji RNA przez egzozom [31]. Kap odgrywa także istotną rolę w transporcie dojrzałego mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie przez interakcję CBC z różnymi czynnikami transportu, takimi jak np. REF (z ang. *RNA export factor*) oddziałuje z jądrowym kompleksem porowym i kieruje mRNA (co ważne, od strony końca 5') na zewnątrz jądra [32].

Tak jak wspomniano na początku podrozdziału, rola kapu nie kończy się w jądrze komórkowym. W cytoplazmie odgrywa on kluczową rolę w inicjacji procesu translacji oraz pseudo-cyrkularyzacji mRNA [27]. Od razu po transporcie, kap nadal związany jest z CBC, który rekrutuje do tego kompleksu translacyjne czynniki białkowe (z ang. *eIF* – *eukaryotic initiation factors*) – eIF4G oraz helikazę eIF4A, które rozpoznają i wiążą strukturę kapu i rozpoczynają proces tworzenia się „multi-kompleksu” odpowiedzialnego za biosyntezę białek. W dalszej kolejności angażowane są kolejne białka, takie jak czynniki inicjacji translacji zależne od CBP80/20 (z ang. *CTIF* – *CBP translation initiation factors*), eIF3g, eIF4III, Met-tRNAi oraz dwie podjednostki rybosomalne, które finalnie inicjują pierwszą rundę translacji (tzw. *pioneer round of translation*) [33-36]. Po jej zakończeniu dochodzi do rearanżacji kompleksu translacyjnego – importyna wiąże

CBC i następuje proces jego wymiany na inny białkowy czynnik inicjacyjny, eIF4E, który oddziałuje z kompleksem eIF4F i rozpoczyna właściwą translację (tzw. *steady-state translation*) [36,37]. W trakcie tego procesu związany z kapem czynnik eIF4G oddziałuje z białkiem wiążącym ogon poli(A), PABP1 (z ang. **poly(A) binding protein 1**), tworząc swojego rodzaju pętlę, nazywaną również strukturą pseudo-cyrkularnego mRNA. Postuluje się, że obecność takiej struktury zapewnia translację pełnej długości łańcucha i zwiększa wydajność pracy rybosomu [38-40].

Podsumowując, kap na końcu 5' mRNA ma ogromny wpływ na wiele różnych procesów komórkowych zachodzących praktycznie na każdym etapie cyklu życia mRNA. Począwszy od regulacji ekspresji genów poprzez proces składania mRNA, przez transport jądrowy już dojrzałego mRNA do cytoplazmy, a kończąc na biosyntezie białek w rybosomach, czyli głównym zadaniu informacyjnego RNA. W następnym podrozdziale opiszę jeszcze jeden proces, w którym kap odgrywa, ostatnią już w swoim krótkim życiu, ważną rolę, a mianowicie degradację mRNA.

2.2.3 MECHANIZMY DEGRADACJI MRNA

Dwoma integralnymi czynnikami warunkującymi stabilność cząsteczki informacyjnego RNA są wspomniane już wcześniej struktury: kap na końcu 5' łańcucha mRNA oraz ogon poli(A) na jego drugim końcu. Naruszenie którejkolwiek z nich jest sygnałem dla komórki, że powinna rozpocząć proces degradacji takiej cząsteczki. Cytoplazmatyczna maszyneria degradacyjna opiera się w głównej mierze na pięciu aktywnościach enzymatycznych, które odpowiadają za dekaping, degradację egzonukleolityczną RNA w kierunku 5'→3', deadenylację, degradację egzonukleolityczną 3'→5' oraz hydrolizę endonukleolityczną. Procesy te zostały dość dobrze poznane dzięki badaniom drożdży z rodziny *S.cerevisiae*. Możemy jednak założyć, że w analogiczny sposób odbywa się to u wyższych eukariotów, w tym ssaków. Świadczą o tym następujące obserwacje [41]:

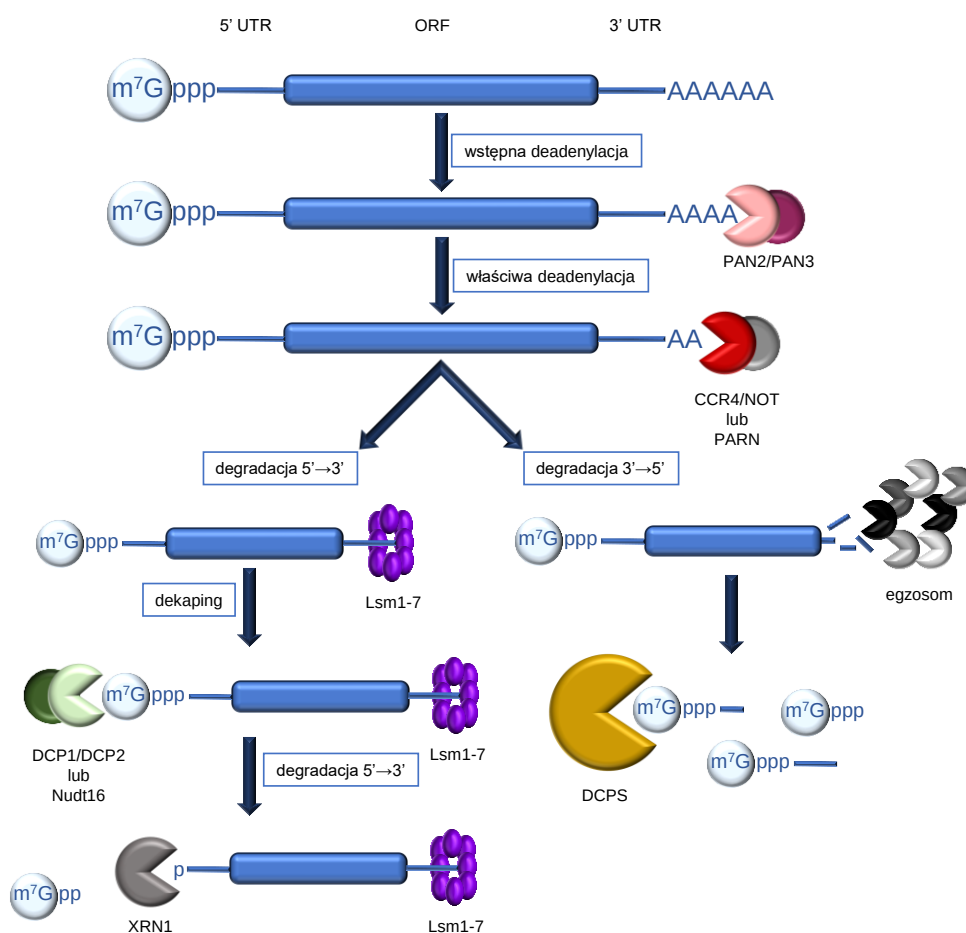
- potwierdzono badaniami *in vivo*, że pierwszym etapem rozpadu RNA jest skrócenie ogona poli(A);
- znaleziono homologii wszystkich drożdżowych enzymów katalizujących te procesy i potwierdzono ich aktywność;
- zidentyfikowano obecność 5' monofosforanu RNA jako produktu dekapingu dzięki metodzie opartej na cyrkularyzacji mRNA oraz analizie RT-PCR.

Eukariotyczne mRNA może ulegać rozpadowi na drodze dwóch różnych procesów – wyróżniamy degradację mRNA zależną i niezależną od deadenylacji, czyli usunięcia ogona poli(A) na końcu 3'. Drugi z nich występuje jednak rzadko i opiera się głównie na

endonukleolitycznym ataku lub dekapingu niezależnym od deadenytacji [42-44]. Zdecydowana większość transkryptów eukariotycznego mRNA ulega degradacji inicjowanej przez skrócenie ogona poliadenylowego (Rys. 10). Za proces ten odpowiadają enzymy zwane deadenylazami. Znanych jest kilka eukariotycznych deadenylaz, m.in.: kompleks PAN2-PAN3 (z ang. *PAN* - **poli(A) nuclease**), CCR4-NOT (z ang. *carbon catabolite repression* – **negative on TATA-less**) czy PARN (z ang. **poli(A)-specific ribonuclease**). Co ciekawe, okazuje się, że proces ten jest odwracalny. Jeśli komórka w odpowiednim czasie otrzyma sygnał naprawczy, następuje odbudowanie ogona poli(A) i taka cząsteczka wraca następnie do polisomu, gdzie może od nowa ulegać translacji i służyć do produkcji białka [45]. Kiedy jednak taki sygnał nie nadejdzie, następuje drugi i nieodwracalny już krok na ścieżce degradacji i cząsteczka mRNA zostaje zaatakowana bądź od końca 5', gdzie w procesie dekapingu usuwana jest reszta difosforanu 7-metyloguanozyny, co wywołuje dalszą degradację łańcucha nukleotydowego przez egzonukleazę XRN1 (z ang. *exoribonuclease 1*), bądź od niezabezpieczonego końca 3', gdzie kompleks egzozomu rozpoczyna degradację w kierunku końca 5'. Omówię teraz dokładnie te procesy.

Deadenylację rozpoczynającą rozkład RNA możemy podzielić na dwa etapy. W pierwszym następuje wstępne skrócenie ogona poli(A) przez kompleks PAN2-PAN3 do długości ok. kilkudziesięciu nukleotydów. Efektywność usuwania reszt adenyłowych jest zależna od opłaszczenia ogona przez cytoplazmatyczne białko PABP [46]. Reakcja ta jest kontynuowana następnie przez CCR4-NOT lub PARN. CCR4-NOT to duży kompleks złożony z dziewięciu białek, z których dwa (CCR4 oraz CAF1) posiadają domenę egzonukleolityczną. Z kolei PARN jest deadenylazą zależną od kapu. Jej aktywność jest większa, jeśli na końcu 5' cząsteczki mRNA jest obecny kap [47], a sam enzym jest hamowany przez białka wiążące 7-metyloguanozynę [48]. Aktywność wszystkich opisanych powyżej kompleksów białkowych jest dodatkowo zależna od obecności dwuwartościowych jonów magnezu, a degradacja ogona poli(A) zachodzi z uwolnieniem 5' AMP (monofosforanu adenozyne). Deadenyłacja skutkuje powstaniem niezabezpieczonego w żaden sposób końca 3', który jest podatny na hydrolizę przez kompleks egzozomu. Egzozomem nazywamy kompleks złożony z 10-12 podjednostek białkowych, z których 6 wykazuje podobieństwo do 3'-5' fosforolitycznych egzorybonukleaz (enzymów, które do reakcji hydrolizy końca 3' mRNA wykorzystują nieorganiczny fosforan), a kilka innych odgrywa pomocniczą rolę i należą do nich homologi 3'-5' hydrolitycznych egzorybonukleaz (enzymów, które w analogicznej reakcji wykorzystują cząsteczkę wody) i helikaz RNA (mających zdolność rozplatania drugorzędowych struktur RNA). Rezultatem działania egzozomu jest powstanie kapowanych oligomerów o długości od kilku do kilkunastu nukleotydów, które są metabolizowane przez enzym DcpS (enzym ten zostanie opisany dokładniej

w następnym podrozdziale). Dużo częściej spotykaną ścieżką degradacji jest jednak ta, w której po reakcji deadenytacji następuje hydroliza nici mRNA od końca 5' w kierunku końca 3' inicjowana przez dekaping, czyli usunięcie reszty 7-metyloguanozyny przez wyspecjalizowane w tym celu enzymy, takie jak kompleks Dcp1/Dcp2 czy białko Nudt16 (one również zostaną szczegółowo opisane w następnym podrozdziale). Hydroliza kapu jest na tyle kluczowym etapem, że w komórce istnieje kilka czynników białkowych, które wzmacniają efektywność tej reakcji. Do tej grupy należą między innymi białka z rodziny Lsm (podobne do białek spliceosomu Sm, z ang. *Like-Sm*), np. heptameryczny kompleks Lsm1-7, który wiąże zdeadenylowany 3' koniec RNA i stymuluje proces dekapingu [49,50], białko Edc3 (z ang. *enhancer of decapping 3*, znane również jako Lsm16), będące częścią kompleksu dekapującego Dcp1-Dcp2 [51], czy PABP wiążące koniec poli(A) [52].



Rys. 10. Proces degradacji mRNA. Degradacja mRNA inicjowana jest przez skrócenie ogona poli(A) przez wyspecjalizowane w tym celu enzymy, takie jak PAN2/PAN3, CCR4-NOT czy PARN. Po deadenytacji następuje właściwa degradacja na jednej z dwóch ścieżek – albo w kierunku 5'→3', albo 3'→5'. Rozpad mRNA 5'→3' rozpoczyna się usunięciem struktury kapu przez enzymy dekapujące (Dcp2, Nudt16), po którym niezabezpieczony koniec 5' jest hydrolizowany przez XRN1. Z kolei degradacja 3'→5' opiera się na szybkiej hydrolizie od końca 3' przez kompleks egzozomu. Powstałe na końcu krótkie fragmenty oligonukleotydowe zawierające kap są rozkładane przez enzym DcpS.

2.2.3.1 EUKARIOTYCZNE ENZYMY BIORĄCE UDZIAŁ W DEGRADACJI KOŃCA 5' MRNA

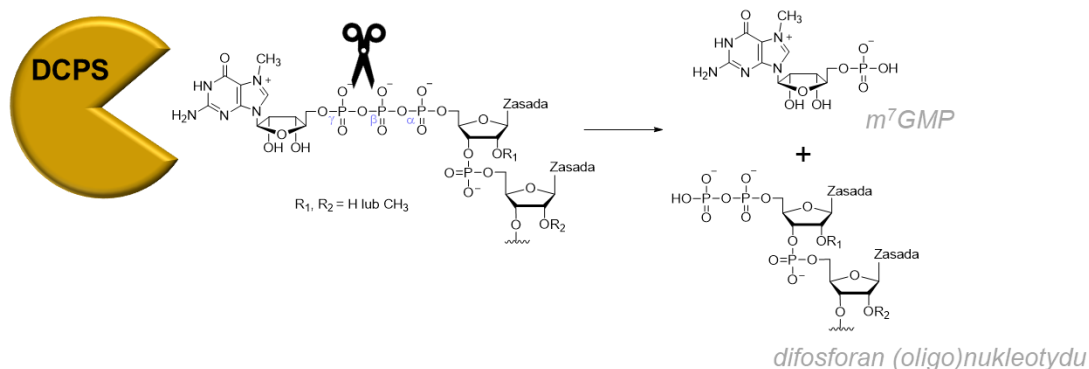
Jak wspomniano w jednym z poprzednich podrozdziałów, struktura kapu, czyli 7-metyloguanozyna połączona mostkiem trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem łańcucha, która jest obecna na końcu 5' eukariotycznego mRNA pełni funkcję ochronną. Zabezpiecza ona w ten sposób funkcjonalny transkrypt przed przedwczesną degradacją przez nukleazy. Istnieją jednak wyspecjalizowane enzymy, które rozpoznają kap w cząsteczce mRNA lub krótszego oligonukleotydu i hydrolizują go, inicjując w ten sposób dalszą degradację. Enzymy te należą do czterech różnych klas – hydrolaz z rodziny Nudix, białek z rodziny HIT, białek DXO oraz fosfataz podobnych do hydrolazy nukleotydów tetrafosforanów diadeninowych (z ang. *ApaH-like*; do tej pory zidentyfikowano tylko jeden enzym dekapujący z tej rodziny – ALPH1 występujący u pasożyta, *Trypanosoma brucei*) [53]. Enzymy te różnią się między sobą funkcją, strukturą, specyficznością substratową i przede wszystkim mechanizmem katalizy. Wspólnym mianownikiem jest jednak zdolność do rozpoznania i wiązania struktur zawierających 7-metyloguanozynę oraz hydrolizy wiązania pirofosforanowego. Uważa się, że enzymy z rodziny DXO biorą udział w wewnątrzkomórkowej kontroli jakości mRNA i są odpowiedzialne za degradację transkryptów bez lub też z nieprawidłowo wykształconym kapem, które są potencjalnie toksyczne dla komórki. Natomiast enzymy należące do rodziny białek HIT oraz Nudix odpowiadają za dekaping, który jest bezpośrednio związany z właściwym procesem degradacji mRNA. Do najważniejszych przedstawicieli tych białek należą DcpS i Dcp2.

DcpS

DcpS (z ang. *decapping scavenger*) to enzym odpowiedzialny za usuwanie krótkich, preferencyjnie kilkunukleotydowych fragmentów zawierających strukturę 7-metyloguanozyny, które powstają w procesie hydrolizy mRNA w kierunku 3'→5', po etapie deadenylacji i degradacji transkryptu przez kompleks egzozomu (Rys. 10). Fragmenty te mogą potencjalnie hamować inne białka zaangażowane w oddziaływanie z kapem, m.in. białko CBP20 (odpowiedzialne za *splicing* pierwszego intronu) [54] czy eIF4E (które bierze udział w inicjacji procesu translacji białka) [55]. DcpS zapobiega akumulowaniu się tych krótkich produktów degradacji mRNA, a przez to wpływa na utrzymanie prawidłowej homeostazy komórki. Możemy mu zatem przypisać również funkcję regulatorową w metabolizmie RNA.

DcpS jest dimerem i należy do pirofosfataz z rodziny białek triady histydynowej (z ang. *HIT* – **h**istidine **t**riad **p**roteins) [56]. Każdy monomer zawiera dwie domeny – N-kończową i C-kończową, które połączone są ze sobą miejscem aktywnym. Domena N-kończowa wiąże substrat nukleotydowy, natomiast domena C-kończowa zawiera zachowany ewolucyjnie specyficzny motyw HIT w sekwencji aminokwasowej – H-φ-H-φ-H-φφ (H oznacza histydynę, a φ - hydrofobową resztę aminokwasową), w którym centralna histydyna pełni rolę nukleofila w reakcji hydrolizy [57]. W wyniku hydrolizy zależnej od DcpS uwolniony zostaje 5'-monofosforan 7-metyloguanozyny (m⁷GMP) oraz drugi produkt, jakim jest 5'-difosforan nukleozydu lub krótkiego oligonukleotydu (Rys. 11). Enzym ten występuje zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie, choć aktywność DcpS u niższych eukariotów (takich jak *C.elegans* czy *S.cerevisiae*) jest ograniczona tylko do tej drugiej. Dodatkowo, w porównaniu do ssaczego DcpS nie posiada on sekwencji NLS (sygnału lokalizacji jądrowej, z ang. **n**uclear **l**ocalization **s**ignal) czy NES (sygnału eksportu jądrowego, z ang. **n**uclear **e**xport **s**ignal) odpowiedzialnych za transport cząsteczki między jądrem a cytoplazmą [54].

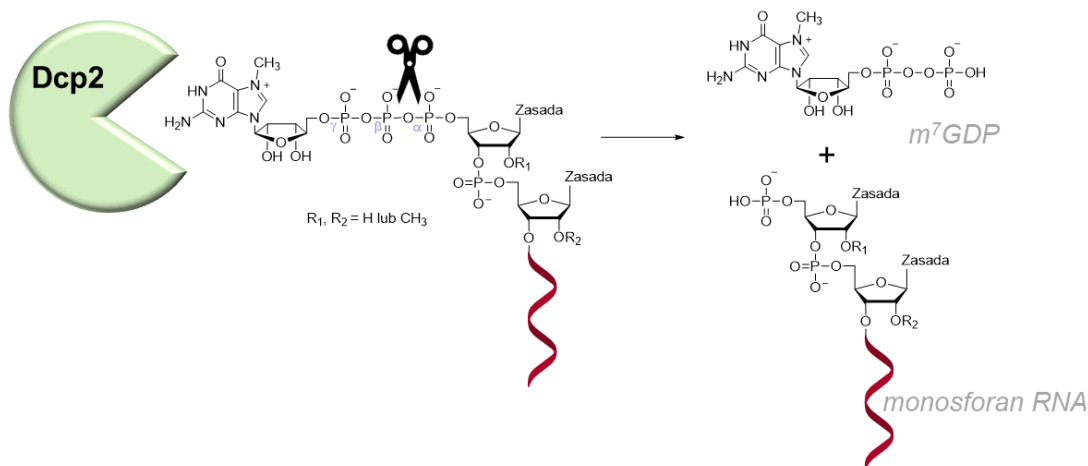
W literaturze możemy znaleźć również powiązania DcpS z różnymi stanami patologicznymi w organizmie człowieka. Mutacje występujące bezpośrednio w obrębie genu kodującego DcpS są stosunkowo rzadkie i skorelowane z występowaniem tak zwanego syndromu Al-Raqad, który charakteryzuje się upośledzeniem umysłowym oraz zaburzeniami w prawidłowym funkcjonowaniu wielu narządów [58-60]. Okazuje się jednak, że zahamowanie aktywności DcpS w sposób pośredni może przynieść korzyści w leczeniu innych chorób. Wykazano, że małowczątkowe inhibitory enzymu DcpS zwiększają przeżycie i poprawiają funkcje motoryczne u myszy cierpiących na rdzeniowy zanik mięśni (z ang. *SMA* – **s**pinal **m**uscular **a**trophy) [61,62], zastosowanie tego samego związku wykazało również efekt terapeutyczny w przypadku ostrej białaczki szpikowej (z ang. *AML* – **a**cute **m**yeloid **l**eukemia) w modelu mysim [63]. W tym roku pojawiły się również doniesienia, które powiązały inhibicję DcpS z indukcją ferroptozy (jest to rodzaj indukowanej śmierci komórki zależnej od jonów żelaza), która zmniejsza częstotliwość występowania przerzutów do wątroby w czerniaku błony naczyniowej oka [64].



Rys. 11. Hydroliza katalizowana przez enzym DcpS. Enzym ten specyficznie hydrolizuje dinukleotydy oraz krótkie oligonukleotydy zawierające strukturę kapu (7-metyloguanozyny), które są finalnym produktem degradacji mRNA od końca 3'. DcpS przecina wiązanie między fosforanami β i γ , uwalniając m^7GMP i difosforan reszty cząsteczki.

Dcp2

Dcp2 (z ang. *decapping enzyme 2*) jest hydrolazą należącą do rodziny białek Nudix (z ang. **n**ucleoside **d**iphosphate linked to other moiety, **X**) [65]. Jak sama nazwa wskazuje, hydrolizuje ona substraty zawierające difosforany nukleozydów i jest specyficzna względem guanozyny metylowanej w pozycji N7. Jest to główny enzym odpowiedzialny za usuwanie struktury kapu z eukariotycznego mRNA inicjującej dalszą degradację w kierunku końca 3' (Rys. 10). W trakcie tej reakcji zostaje uwolniony 5' difosforan 7-metyloguanozyny (m^7GDP) oraz 5' monofosforan RNA (5' pRNA), co schematycznie przedstawiono na Rys. 12. Aktywność enzymu Dcp2 jest ściśle regulowana przez skomplikowaną sieć oddziaływań z innymi białkami. Do najważniejszych z nich należy Dcp1, który pełni rolę aktywatora i jest niezbędny do pełnej funkcjonalności enzymu [66]. Ponadto, pełni on również rolę platformy, do której przyłączają się inne koaktywatory, które biorą udział w procesie usuwania struktury kapu z końca 5' mRNA. Te dwa białka tworzą razem trzon eukariotycznego kompleksu dekapującego. Istnieją jednakowoż również inne czynniki białkowe, które wchodzi w skład tego kompleksu, m.in. niewielkie białka z rodziny Edc (z ang. *enhancer of mRNA decapping*) [67-72], PNRC (z ang. **p**roline-rich **n**uclear **r**eceptor **c**oactivator) [73,74] czy Pat-Lsm [75-78], które dodatkowo zwiększają powinowactwo do substratu RNA i stymulują reakcję dekapingu, a w konsekwencji regulują stabilność komórkowego mRNA i ekspresję genów.

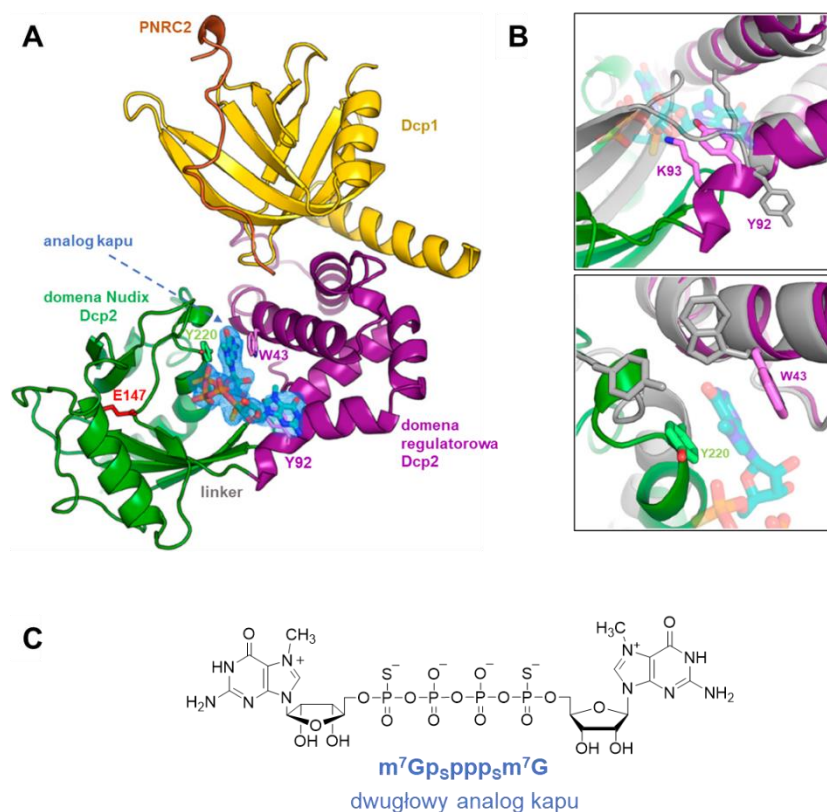


Rys. 12. Hydroliza katalizowana przez enzym Dcp2. Enzym ten specyficznie hydrolizuje RNA zawierające strukturę kapu (7-metyloguanozyny), inicjując dalszą degradację mRNA od końca 5' przez egzonukleazę XRN1. Dcp2 przecina wiązanie między fosforanami α i β , uwalniając m^7GDP i monosforan RNA.

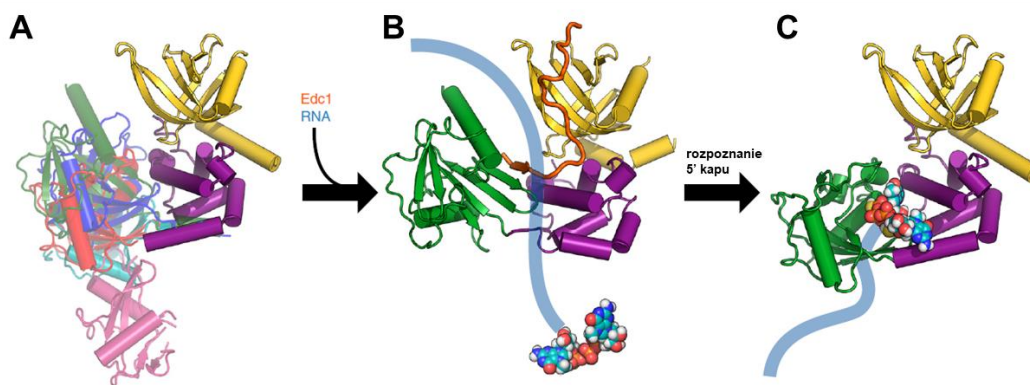
Pod względem budowy, Dcp2 posiada dwie domeny – zachowaną ewolucyjnie domenę regulatorową na swoim N-końcu, która odpowiada za wiązanie się z aktywatorem Dcp1 oraz domenę katalityczną, zawierającą w swojej sekwencji motyw Nudix (charakterystyczną sekwencję 23 aminokwasów $GX_5EX_5[UA]XREX_2EEXGU$, gdzie G – glicyna, E – kwas glutaminowy, A – alanina, R – arginina, natomiast U reprezentuje alifatyczną, hydrofobową resztę aminokwasową, a X - dowolny aminokwas), wiążącą łańcuch RNA i odpowiedzialną za reakcję hydrolizy kapu. Obie domeny połączone są krótkim linkerem, co tworzy tzw. region zawiasowy (ang. *hinge region*) i pozwala przyjmować kompleksowi Dcp2 różne konformacje [79]. Z kolei na nieustrukturyzowanym C-końcu, który może przyjmować różną długość, znajdują się motywy odpowiadające za oddziaływania z innymi białkami [66,80-83]. Obie domeny ściśle ze sobą współpracują w procesie rozpoznania i hydrolizy końca 5' mRNA. Badania pokazują, że choć to domena katalityczna odpowiada za reakcję usuwania kapu, to za jego rozpoznanie odpowiedzialne są obie, tworząc połączone miejsce aktywne złożone z reszt aminokwasowych obu domen. Z kolei miejsce wiązania 7-metyloguanozyny znajduje się już w obrębie domeny regulatorowej [84]. Wiele informacji na temat tego oddziaływania dostarczyły dane krystalograficzne. Mugridge i wsp. skryształizowali drożdżowy kompleks Dcp1-Dcp2 połączony z ludzkim białkiem PNRC2 (SpDcp1-Dcp2-HsPNRC2) w obecności dwugłowego siarkowego analogu kapu ($m^7Gpspppsm^7G$), który wykazuje ponad 20-krotne wyższe powinowactwo do Dcp2 niż naturalny kap [85] (Rys. 13). Związanie kapu wymusiło zmianę konformacji kompleksu dekapującego – nastąpiła reorientacja zachowanych ewolucyjnie reszt tyrozyny w pozycji 92 (Y92 lub tyrozyna-92) oraz lizyny-93 (K93), które odwracają się w kierunku wnętrza białka i wiążą jedną 7-metyloguanozynę należącą do kapu poprzez oddziaływania warstwowe

z pierścieniem m⁷G (Y92) i wiązania wodorowe z łańcuchem fosforanowym struktury kapu (Y92 oraz K93). Układ ten jest dodatkowo stabilizowany przez asparaginę w pozycji 88 (D88), która poprzez wiązania wodorowe z 7-metyloguanozyną naśladuje parowanie zasad Watsona-Cricka. Z kolei rotacja katalitycznej domeny Nudix pozwala na zaangażowanie dwóch aromatycznych reszt – tyrozyny-220 (Y220) i tryptofanu-43 (W43) w oddziaływanie warstwowe (*stackingowe*) z drugą zasadą m⁷G. Dodatkowo, następuje utworzenie wiązania wodorowego z resztą kwasu asparaginowego (D47), imitujące parę Watsona-Cricka. Oddziaływania te są kluczowe dla wiązania i hydrolizy struktury końca 5' – przykładowo, mutacja D47 powoduje ponad 80-krotne spowolnienie katalizy do poziomu, który *in vitro* obserwuje się dla całkowitego usunięcia domeny regulatorowej Dcp2 [84,85]. Podobne efekty obserwuje się dla mutacji W43. Reszty te odpowiadają również za aktywację Dcp1 i Edc1, co implikuje kluczową rolę tych białek w działaniu całego kompleksu. Y220 oraz K127 formują wiązania wodorowe z mostkiem fosforanowym kapu, podobnie jak E39 z grupą hydroksylową 2' pierścienia rybozy i ich mutacje mają umiarkowany wpływ na katalizę hydrolizy kapu. Taka konformacja kompleksu i ułożenie domen Dcp2 tworzy bogaty w reszty lizynowe i argininowe dodatnio naładowany tunel na powierzchni enzymu, który biegnie od helisy domeny Nudix, poprzez wnękę między obiema domenami Dcp2 aż do miejsca wiązania kapu.

Na podstawie tych obserwacji Mugridge i wsp. zaproponowali model początkowych etapów katalitycznego cyklu Dcp2 obejmujący związanie RNA i rozpoznanie struktury kapu na jego 5' końcu (Rys. 14). W modelu tym związanie się koaktywatorów, takich jak np. Edc1 z kompleksem Dcp1-Dcp2 promuje przyjęcie takiej konformacji kompleksu apo, która jest gotowa na związanie nici RNA (Rys. 14B). W kolejnym kroku następuje rozpoznanie struktury 7-metyloguanozyny, któremu towarzyszy odwrócenie domeny katalitycznej Nudix o 90° i uformowanie miejsca wiązania kapu (Rys. 14C). W takiej konformacji 7-metyloguanozyna jest wiązana przez opisaną wcześniej grupę aminokwasów Y92-K93, natomiast pierwszy transkrybowany nukleotyd nici mRNA następujący po mostku fosforanowym oddziałuje z grupą aminokwasów W43-Y220-D47. Jednakowoż, kluczowa dla reakcji usunięcia struktury kapu reszta kwasu glutaminowego w pozycji 147 (E147) jest zbyt daleko od miejsca wiązania substratu, aby przeprowadzić proces katalizy. Sugeruje to konieczność kolejnej rearanżacji kompleksu, czego jednak do tej pory nie udało się uchwycić w badaniach krystalograficznych.



Rys. 13. Rozpoznanie i wiązanie analogu struktury kapu przez enzym Dcp2. **A)** Struktura krystaliczna kompleksu dekapującego SpDcp1-Dcp2-HsPNRC2 w konformacji z dwugłowym analogiem kapu. Kolorem zostały zaznaczone reszty aminokwasowe, które biorą udział w wiązaniu struktury 7-metyloguanozyny: Y220, W43 oraz Y92; na czerwono zaznaczono katalityczną resztę kwasu glutaminowego, E147; **B)** Zbliżenie na kieszeń wiążącą kompleksu: reorientacja kluczowych reszt Y92 oraz K93 pod wpływem wiązania kapu (wyżej); zmiany konformacyjne aromatycznych reszt Y220 oraz W43 zaangażowanych w rozpoznanie kapu (niżej); **C)** Struktura analogu kapu, m⁷Gpspppsm⁷G, z modyfikacją siarkową użyta w badaniach krystalograficznych. (Rysunki z paneli A oraz B zaczerpnięto z [85], strukturę tę można również znaleźć w dostępnej on-line bazie danych PDB, symbol: 5KQ4).



Rys. 14. Przypuszczalny model katalizy enzymatycznej struktury końca 5' mRNA przez kompleks dekapujący. **A)** Możliwe konformacje kompleksu białek Dcp1-Dcp2 bez udziału substratów i koaktywatorów; **B)** Związanie koaktywatorów (np. Edc1) z kompleksem zmienia jego konformację na taką, która może wiązać łańcuch RNA; **C)** Reorientacja kompleksu pod wpływem rozpoznania struktury kapu - następuje odwrócenie domeny Nudix o 90° i odsłonięcie reszt aminokwasowych zaangażowanych w tworzenie miejsca wiązania kapu. (Rysunek zaczerpnięto z [85]).

Usuwanie kapu z końca 5' eukariotycznego mRNA jest procesem kluczowym i mającym wpływ na szereg różnych szlaków komórkowych, zaczynając od omawianej już w tej rozprawie degradacji mRNA przez udział w terminacji transkrypcji [86], degradacji cząsteczek długiego, niekodującego RNA [87], a kończąc na hydrolizie transkryptów zawierających nieoptymalne kodony, które obniżają stabilność takiego RNA [88]. Możemy więc w sposób pośredni powiązać aktywność Dcp2 z regulacją ekspresji genów. Nie dziwi zatem fakt, że jakiegokolwiek nieprawidłowości w funkcjonowaniu tego enzymu mogą przyczynić się do powstawania różnych chorób i stanów patologicznych. W 2012 roku ukazała się publikacja, w której wykazano, że w trakcie infekcji wirusowej obserwuje się podwyższony poziom Dcp2. Prowadzi to do obniżenia się poziomu transkrypcyjnego czynnika IRF-7 (z ang. *interferon regulatory factor 7*), który staje się głównym substratem Dcp2. Czynniki te należą do rodziny interferonów - szerokiej grupy cytokin, które biorą udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, więc obniżenie jego poziomu ma negatywny wpływ na odpowiedź przeciwwirusową organizmu na patogen [89]. Dwa lata później pojawiła się praca, w której powiązano aktywność Dcp2 z chorobami z grupy chorób nerwowo-mięśniowych, w których obserwuje się obniżony poziom funkcjonalnego U1 snRNA [90]. Jedną z takich chorób jest wspomniany już wcześniej rdzeniowy zanik mięśni (SMA) objawiający się utratą motoneuronów rdzenia kręgowego i związany z mutacjami genu SMN1. Postuluje się, że zahamowanie aktywności enzymów dekapujących, DcpS i/lub Dcp2, może zwiększyć liczbę transkryptów snRNA i przywrócić funkcję tych uszkodzonych neuronów. Nakreślony powyżej aspekt biologiczny pokazuje, że związki hamujące aktywność enzymu Dcp2 mogą wykazywać potencjalne działanie terapeutyczne. Stąd próby poszukiwania i projektowania nowych silnych inhibitorów tego enzymu mogą przynieść wymierne korzyści.

2.2.3.2 WIRUSOWE ENZYMY BIORĄCE UDZIAŁ W DEGRADACJI KOŃCA 5' mRNA

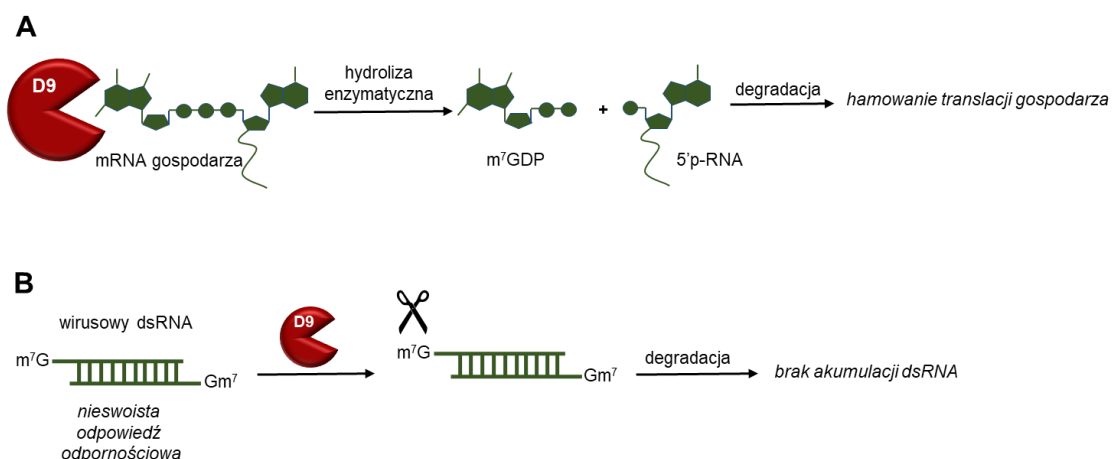
Dość długo wydawało się, że aktywność dekapująca mRNA jest zarezerwowana jedynie dla enzymów wyższych eukariotów, ponieważ to ich informacyjny RNA posiada tę charakterystyczną strukturę na końcu 5' łańcucha, jaką jest kap. Okazuje się jednak, że niektóre wirusy również wykazują ekspresję własnych enzymów, które rozpoznają 7-metyloguanozynę i hydrolizują koniec 5' mRNA. Wszystkie te wirusy należą do rodziny nukleocytoplazmatycznych dużych wirusów DNA (z ang. *NCLDV - nucleocytoplasmic large DNA viruses*). Nazywane są one czasami megawirusami ze względu na fakt, iż ich wirion (a więc pojedyncza, kompletna cząstka wirusowa) często osiąga rozmiary przekraczające 0,5 µm. Ponadto, charakteryzują się one dość długim genomem, w którym można znaleźć geny zaangażowane w naprawę

uszkodzonego DNA. Są to zatem najbardziej rozwinięci przedstawiciele rodziny wirusów. Posiadanie własnych enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę kapu jest częścią ich strategii przetrwania, której efektem jest hamowanie translacji komórkowej gospodarza i promowanie syntezy własnych białek wirusowych, a przez to uniknięcie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Do tej pory opisano cztery enzymy dekapujące kodowane przez wirusy: D9 i D10 z wirusa ospy krowiej, g5R z wirusa afrykańskiego pomoru świń oraz enzym L375 z Mimiwirusa [91-94]. Ich krótką charakterystykę i sposób działania przedstawię na przykładzie enzymu D9 z wirusa ospy krowiej.

D9

D9 to jeden z dwóch enzymów dekapujących, jakie posiada w swoim arsenale wirus ospy krowiej (inaczej: krowianki, z ang. *Vaccinia Virus*, VACV). Podobnie jak eukariotyczny enzym Dcp2 należy do hydrolaz z rodziny Nudix i posiada w swojej sekwencji charakterystyczny 23-aminokwasowy motyw katalityczny (tzw. motyw Nudix) odpowiedzialny za hydrolizę wiązania pirofosforanowego. Substratem dla tego enzymu jest kapowany mRNA (m^7GpppN -RNA, gdzie N to dowolny nukleotyd) o długości przekraczającej 30 nukleotydów [92], a w wyniku cięcia zostaje uwolniony m^7GDP oraz 5' monofosforan reszty cząsteczki RNA, który jest wystawiony na dalszą degradację przez egzonukleazy (Rys. 15A).

D9 jest odpowiedzialny nie tylko za usuwanie kapu z 5' końca mRNA gospodarza, ale i degradowanie własnego wirusowego dwuniciowego RNA, dsRNA, które jest wyzwalaczem wrodzonej (nieswoistej) odpowiedzi immunologicznej gospodarza na obecność patogenu (Rys. 15B). Powszechnie przyjmuje się, że struktury takie są generowane przez wirusowe polimerazy jako produkt pośredni replikacji genomu lub jako błędny produkt transkrypcji i jest to cecha wspólna większości wirusów [95], w tym wirusa krowianki [96,97].

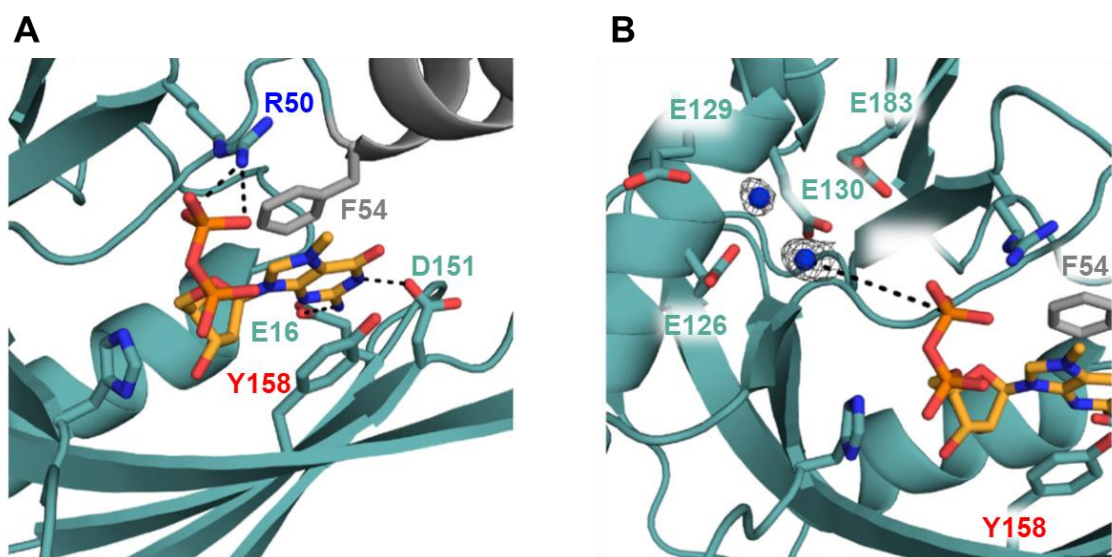


Rys. 15. Działanie wirusowych enzymów dekapujących na przykładzie enzymu D9 z wirusa ospy krowiej. **A)** D9 katalizuje hydrolizę kapowanego mRNA (gospodarza), uwalniając m⁷GDP oraz monofosforan reszty cząsteczki RNA, który ulega dalszej degradacji. Skutkuje to zahamowaniem syntezy nowych białek w komórce gospodarza. **B)** D9 zapobiega również akumulowaniu się struktur dwuniciowego wirusowego RNA, którego nagromadzenie w komórce wywołuje reakcję odpornościową organizmu gospodarza.

Aby zapewnić sobie stabilność własnego RNA oraz odpowiednią aktywność translacyjną w komórce gospodarza, VACV dodaje na końcu 5' swoich transkryptów 7-metyloguanozynę, wykorzystując w tym celu własny enzym kapujący, VCE (z ang. *Vaccinia virus capping enzyme*) [98-100]. Transkrypcja wirusowego mRNA odbywa się na trzech różnych etapach infekcji – w fazie wczesnej produkowane są transkrypty rozpoczynające się od m⁷GpppA_m lub m⁷GpppG_m, podczas gdy w fazie pośredniej i późnej powstają tylko RNA z kapem m⁷GpppA_m [101,102]. D9 ulega ekspresji na wczesnym etapie infekcji i wraz z enzymem D10 zapobiega akumulowaniu się struktur dsRNA, minimalizując w ten sposób komórkową odpowiedź antywirusową, w której pośredniczą białka PKR (zależna od dsRNA kinaza białkowa R, z ang. *protein kinase RNA-activated*) oraz OAS/RNaza L (odpowiednio: syntetaza 2'-5' oligoadenylowa, z ang. *2'-5'-oligoadenylate synthetase* oraz rybonukleaza L, z ang. *ribonuclease L*, RNase L) [98,103]. Co ciekawe, odpowiednio zmodyfikowany wirus krowianki pozbawiony genu kodującego D9 lub D10 jest bardziej immunogeny właśnie ze względu na akumulację dwuniciowego RNA i wykazuje naturalną preferencję do replikowania się w komórkach nowotworowych, co czyni z niego idealnego kandydata do zastosowania w terapii jako wirus onkolityczny [104].

Pomimo swoich podobieństw do eukariotycznego enzymu Dcp2, sposób rozpoznania 7-metyloguanozyny i wiązania RNA przez enzym D9 jest zasadniczo nieco inny. Nieco światła w tym aspekcie daje opublikowana niedawno struktura krystaliczna, w której D9 znajduje się w konformacji post-katalitycznej z jednym z produktów hydrolizy, m⁷GDP [105]. Enzym zbudowany jest z dwóch domen – zachowanej

ewolucyjnie domeny Nudix oraz domeny złożonej z trzech α helis. W przeciwieństwie do Dcp2, w której katalityczna domena Nudix i domeny regulatorowe są połączone ze sobą jedna po drugiej, w przypadku D9 domena z trzema helisami jest umieszczona wewnątrz domeny katalitycznej. Struktura 7-metyloguanozyny jest umiejscowiona w kieszeni wiążącej, która składa się z reszt aminokwasowych obu domen i jest stabilizowana przez oddziaływania warstwowe π - π między fenyloalaniną w pozycji 54 (F54) a tyrozyną-158 (Y158), tworząc tzw. oddziaływanie kanapkowe (Rys. 16A). Przypomina to raczej sposób rozpoznania struktury kapu przez inne białka wiążące kap, takie jak eIF4E [106] czy CBP20 [107], gdzie m⁷G jest „uwięziona” pomiędzy dwiema aromatycznymi resztami aminokwasowymi, aniżeli eukariotyczny Dcp2, w którym struktura kapu stabilizowana jest przez oddziaływanie *stackingowe* z pojedynczym aminokwasem aromatycznym – tryptofanem-43. Wykazano również, że to te dwa aminokwasy (F54 oraz Y158) odpowiadają za specyficzne rozpoznanie i wiązanie metylowanego kapu. Dodatkowo, konformację tę stabilizują również reszty kwasu asparaginowego-151 (D151) i kwasu glutaminowego-16 (E16), które tworzą wiązania wodorowe z pierścieniem guaninowym, a także arginina-50 (R50) oddziałująca w ten sam sposób z mostkiem fosforanowym. Za hydrolizę struktury kapu odpowiadają cztery zachowane ewolucyjnie reszty kwasu glutaminowego (E126, E129, E130 oraz E183), które znajdują się w obrębie helisy domeny katalitycznej Nudix (Rys. 16B). Niestety, dostępne struktury krystaliczne nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, w jaki dokładnie sposób przebiega związanie cząsteczki mRNA (lub w tym przypadku również dsRNA) i jej hydroliza.



Rys. 16. Rozpoznanie struktury kapu przez enzym D9. **A)** Zbliżenie na kieszeń wiążącą D9: 7-metyloguanozyna jest stabilizowana oddziaływaniem warstwowym z dwiema resztami aminokwasowymi: Y158 oraz F54, a wiązania wodorowe (przerywane linie) między D151, E16 i R50 a mostkiem fosforanowym i pierścieniem rybozy dodatkowo stabilizują pozycję kapu w miejscu wiązania. **B)** Post-katalityczna konformacja enzymu ze związanym produktem – zaznaczono cztery reszty kwasu glutaminowego (E126, E129, E130 oraz E183), które są odpowiedzialne za katalizę reakcji hydrolizy kapu. (Rysunki zaczerpnięto z [105], strukturę tę można również znaleźć w dostępnej on-line bazie danych PDB, symbol: 7SEZ)

Niedawno wykazano, że, oprócz kluczowej roli w inicjowaniu degradacji cząsteczek mRNA i dsRNA, wirusowe enzymy dekapujące stymulują również selektywną translację wirusowego mRNA [108]. Ten znaczący wpływ D9 i D10 na replikację wirusa sugeruje, że enzymy te mogą stać się ważnymi celami dla terapii przeciwwirusowych. Wnikliwe zbadanie tych enzymów może pomóc w wyjaśnieniu, w jaki sposób wirusy wykorzystują swoją maszynę do unikania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i wpływają na translację gospodarza. I chociaż wirus krowianki nie jest patogenny dla człowieka to reprezentuje on rodzinę dużych wirusów DNA, w tym wirusów odzwierzęcych, które mogą przenosić się na ludzi i być potencjalnie niebezpieczne. Obawy te wydają się być w dzisiejszych czasach całkiem realne, o czym dobitnie przekonała ludzkość pandemia COVID-19 spowodowana wirusem SARS-COV-2. Ponadto, w sierpniu 2024 roku Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. *World Health Organisation, WHO*) już po raz drugi w ciągu ostatnich dwóch lat wydała ostrzeżenie przed, blisko spokrewnionym z wirusem krowianki, wirusem małpiej ospy (z ang. *monkey pox virus, MPXV*), nazywając go „zagrożeniem dla zdrowia publicznego w skali globalnej”³.

³ Strona internetowa WHO (www.who.int), „WHO Director-General declares mpox outbreak a public health emergency of international concern”, <https://www.who.int/news/item/14-08-2024-who-director-general-declares-mpox-outbreak-a-public-health-emergency-of-international-concern> [dostęp: 14.08.2024]

2.2.4 ŚCIEŻKI KONTROLI JAKOŚCI RNA

We wcześniejszych rozdziałach wspomniano już, że degradacja mRNA jest kluczowym mechanizmem regulacji ekspresji genów i opisano najważniejsze ścieżki, na których mRNA ulega rozpadowi. U eukariotów występują jednak również bardziej specyficzne procesy degradacji mRNA, które pełnią funkcję mechanizmów kontroli (z ang. *mRNA surveillance pathways*). Ich głównym zadaniem jest identyfikowanie oraz eliminowanie wadliwych cząsteczek (pre)-mRNA [109]. Nieprawidłowości w takich transkryptach obejmują błędy w sekwencji nukleotydowej, obróbce potranskrypcyjnej czy strukturze drugorzędowej, czyli niewłaściwym zwijaniu się cząsteczek RNA. Trzy główne ścieżki kontroli jakości transkryptów mRNA obejmują: NMD (z ang. *nonsense-mediated mRNA decay*), NSD (z ang. *non-stop mRNA decay*) i NGD (z ang. *no-go mRNA decay*). Omówię teraz krótko te mechanizmy.

NMD to proces, który występuje u wszystkich eukariotów, a trzon jego kompleksu, składający się z białek UPF1, UPF2 oraz UPF3, jest silnie zachowany między gatunkami [110]. Głównym celem NMD jest identyfikacja i degradacja cząsteczek, które zawierają w swojej sekwencji przedwczesne kodony STOP (z ang. *PTCs* – *premature termination codons*) – są to takie trójki nukleotydów, które nie odpowiadają żadnemu aminokwasowi i są sygnałem do zakończenia translacji (UAG, UAA, UGA), ale występują w złym miejscu transkryptu. Mogą one powstawać w wyniku mutacji, przesunięcia ramki odczytu, niedokładności w procesie inicjacji translacji czy wydłużenia fragmentów 3'UTR. Jeśli takie transkrypty ulegałyby translacji, mogłyby produkować „wybrakowane” białka o niepełnej sekwencji i co się z tym wiąże, o nieprawidłowych funkcjach. W fizjologicznych warunkach prawidłowo umiejscowiony kodon STOP (u ssaków w obrębie 50 nukleotydów od ostatniego egzonu, ale istotna jest również odległość od ogona poli(A)) pozwala na oddziaływanie rybosomu z białkami obecnymi w regionie 3' UTR, m.in. PABP oraz oddziałujących z nim czynników eRF1 oraz eRF3 (z ang. *eukaryotic Release Factor* – eukariotyczny czynnik uwalniający nowo powstałe peptydy) i w ten sposób indukuje zakończenie procesu translacji i uwolnienie rybosomu.

Proces ten jest zaburzony w przypadku nieprawidłowych cząsteczek mRNA. Dochodzi wtedy do zahamowania aktywności kompleksu EJC (z ang. *exon junction complex*). Jest to białkowy kompleks, w którego skład wchodzi m.in. białko UPF3 i który przyłącza się do nici RNA po procesie *splicingu* w obrębie 20-24 nukleotydów od każdego połączenia egzonów (*exon junction*) i po wykonaniu swojego zadania jest następnie wypierany przez przesuwający się po nici rybosom. W przypadku, kiedy w cząsteczce mRNA występuje przedwczesny kodon STOP, kompleks ten jest zablokowany i zostaje wykryty przez różne mechanizmy kontroli jakości komórki i kierowany do degradacji (Rys. 17A). Nie jest to jednak uniwersalna ścieżka rozpoznawania cząsteczek mRNA o nieprawidłowej

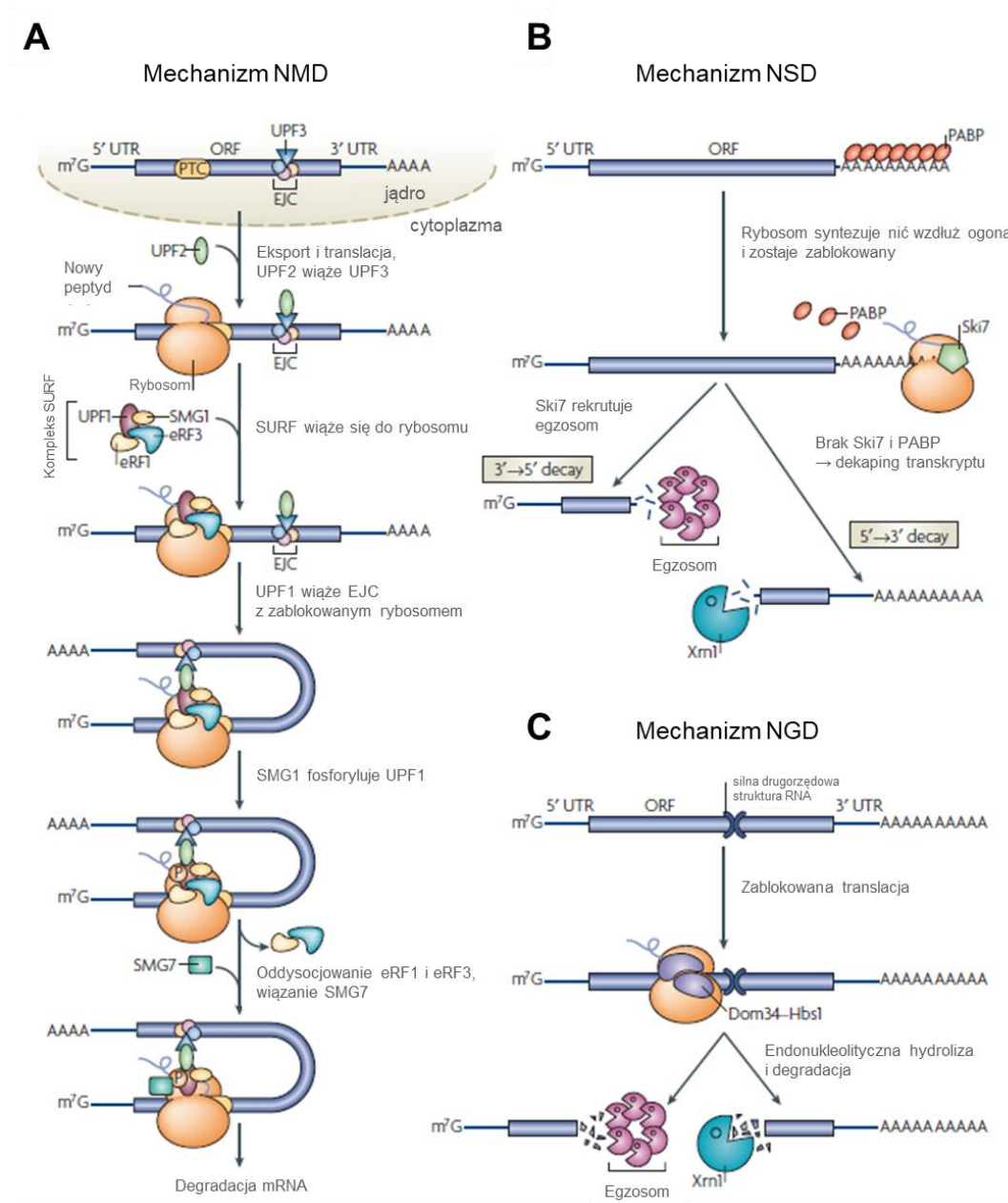
budowie u eukariotów. W przypadku mRNA niektórych gatunków zwierząt i drożdży (odpowiednio: *D.Melanogaster* i *S.Cerevisiae*) oraz ssaczych transkryptów (np. kodujących immunoglobulinę μ), rola kompleksu EJC jest pomijalna, natomiast ważniejszą rolę odgrywa odległość między kodonem STOP a ogonem poli(A) – jeśli jest on umiejscowiony przedwcześnie, odległość ta zwiększa się i powstała w ten sposób konformacja mRNA z białkami jest uznawana za nieprawidłową i degradowana.

NSD to z kolei z mechanizmów kontroli prawidłowości syntetyzowanych transkryptów mRNA. Substratami w tej ścieżce degradacji są cząsteczki, które nie zawierają kodonu terminacji translacji [45]. Może być to spowodowane pęknięciem nici w newralgicznym miejscu lub taki kodon STOP może być umiejscowiony poza ramką odczytu. Alternatywnym czynnikiem wyzwalającym tę ścieżkę degradacji jest przedwczesna poliadenylacja transkryptu lub nawet zupełny brak ogona poli(A).

Mechanizm ten przebiega według następującego schematu. Rybosom przesuwa się po nici, dobudowując kolejne aminokwasy do nowego powstającego polipetydu. Ponieważ nie napotyka na swojej drodze kodonu STOP, dociera do końca 3' UTR – miejsce A rybosomu, które w trakcie procesu translacji wiąże cząsteczki aminoacylo-tRNA z kolejnymi aminokwasami, jest puste i rybosom pozostaje zablokowany. Do tego miejsca przyłącza się następnie C-koniec adaptorowego białka Ski7, co powoduje uwolnienie i oddysocjowanie rybosomu, a białko Ski7 rekrutuje cytoplazmatyczny kompleks egzozomu oraz kompleks SKI (złożony z trzech białek – Ski2, Ski3 oraz Ski8). Wywołuje to deadenylację, a następnie szybką degradację transkryptu mRNA przez egzozom w kierunku 3'→5' (Rys. 17B) [111,112]. Istnieje również alternatywna ścieżka, w przypadku braku zaangażowania białka Ski7, która obejmuje degradację mRNA w kierunku 5'→3' i została ona zaobserwowana u drożdży [113].

Ostatnim mechanizmem kontroli jakości, który omówię jest mechanizm „No-go” (NGD). Jego zadaniem jest zapobieganie wiązaniu się czynników translacyjnych do wadliwych transkryptów. Jest to możliwe przez wykrywanie zablokowanych na nici mRNA rybosomów i reakcję hydrolizy endonukleolitycznej takich transkryptów. Powstałe w wyniku tej reakcji fragmenty są dalej degradowane przez egzozom oraz egzozonukleazę XRN1 (Rys. 17C) [114]. Ze wszystkich opisanych tu ścieżek kontroli jakości ta jest najmniej poznana, do tej pory nie udało się zidentyfikować chociażby endonukleaz, które biorą w niej udział. Wiadomo natomiast, że pierwsza hydroliza wymaga działania Dom34 oraz Hbs1, białek spokrewnionych z czynnikami eRF1 i eRF3, co sugeruje, że mogą one oddziaływać bezpośrednio z zablokowanym rybosomem. Co więcej, Hbs1 wykazuje również podobieństwo do białka Ski7, które ułatwia

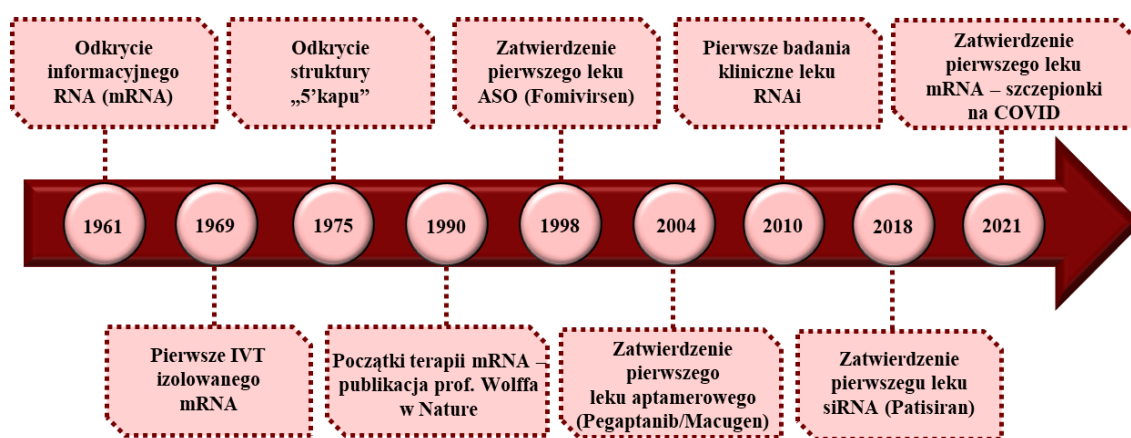
uwolnienie rybosomu z końca 3' w mechanizmie NSD, co pozwala przypuszczać, że Hbs1 pełni podobną funkcję.



Rys. 17. Eukariotyczne ścieżki kontroli jakości RNA. A) Mechanizm NMD. Komplex EJC połączony z nowo powstałym transkrypcją RNA jest transportowany do cytoplazmy. Rozpoczyna się translacja, która zostaje zatrzymana, kiedy rybosom napotyka przedwczesny kodon STOP (PTC). Następuje kaskada sygnałów (związana z przyłączeniem białkowego kompleksu SURF), która ostatecznie prowadzi do degradacji nieprawidłowej cząsteczki RNA. **B) Mechanizm NSD.** Translacja transkryptów pozbawionych kodonów STOP skutkuje zablokowaniem rybosomu na ogonie poli(A). Przyłączone białko Ski7 uwalnia rybosom, a następnie rekrutuje egzozom, który degraduje mRNA. W alternatywnej ścieżce zaobserwowanej u drożdży brak zaangażowania białek Ski7 oraz PABP skutkuje degradacją mRNA w kierunku 5'→3'. **C) Mechanizm NGD.** Zablokowanie rybosomu w otwartej ramce odczytu uniemożliwia związanie czynników translacyjnych. Przyłączone białka Dom34 oraz Hbs1 inicjują endonukleolityczną hydrolizę nici mRNA, a niezabezpieczone końce powstałych fragmentów ulegają degradacji przez egzozom i XRN1. Rysunek zaczerpnięty z [45].

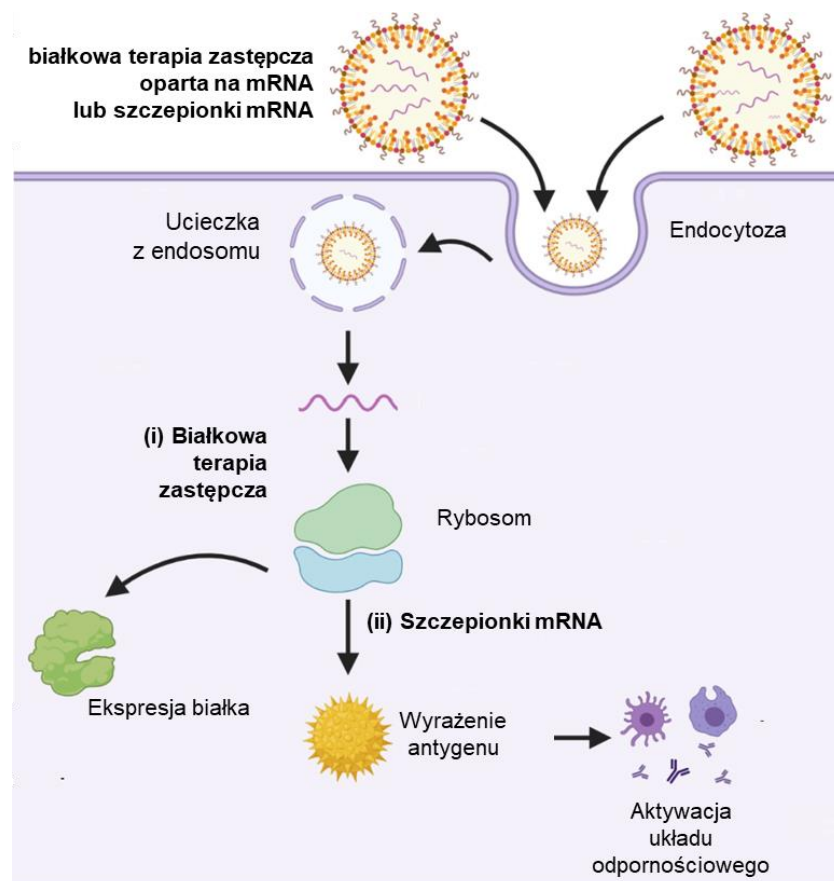
2.3 TERAPEUTYCZNE ZASTOSOWANIE MRNA

Idea zastosowania kwasów nukleinowych w terapii pojawiła się na początku lat 90 XX wieku. Za pioniera terapii genowej uznaje się Jona A. Wolffa z Uniwersytetu Wisconsin, który w swojej pracy opublikowanej w *Nature* po raz pierwszy zastosował syntetyczne mRNA oraz plazmidowe DNA i udowodnił, że ulega ono translacji w myszach, produkując pożądane białko [115]. Ze względu na mniejszą trwałość mRNA w porównaniu do jego dwuniciowego brata, obawy związane z jego immunogennością, w kolejnych latach szerzej rozwijano terapie oparte na DNA i innych rodzajach RNA (Rys. 18). Niemniej jednak, cały czas pojawiały się również prace, które były kolejnymi dowodami na działanie mRNA i pokazywały różnorodność jego zastosowania.



Rys. 18. Rozwój technologii terapeutycznych opartych na kwasach nukleinowych (na podstawie [116] oraz [117]).

mRNA – informacyjny RNA może znaleźć swoje zastosowanie w wielu gałęziach terapii – zarówno w leczeniu, jak i prewencji różnych chorób. Idea działania terapeutyków opartych na mRNA polega na dostarczeniu do komórki cząsteczki syntetycznego mRNA kodującego odpowiednie białko lub antygen, ale dokładny *modus operandi* różni się w zależności od konkretnego zastosowania (Rys. 19). W przypadku szczepionek wirusowych podanie mRNA kodującego jakiegoś wirusowe białko ma za zadanie imitować infekcję, a następnie wyindukować odpowiednią komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną [118]. Podobny schemat obserwujemy dla tzw. szczepionek onkologicznych. Głównym celem immunoterapii przeciwnowotworowej jest pobudzenie odporności przeciwnowotworowej gospodarza oraz modyfikację mikrośrodowiska guza, co prowadzi do jego zmniejszenia i wydłużenia przeżycia pacjentów [119]. Natomiast w przypadku leczenia różnych chorób na zasadzie białkowej terapii zastępczej (z ang. *protein replacement therapy*), terapeutyczny mRNA koduje białko, którego w komórce pacjenta brakuje lub którego funkcjonalność jest upośledzona, i zapewnia jego funkcjonalną translację [120].



Rys. 19. Zasada działania terapeutyków mRNA (rysunek na podstawie [121]).

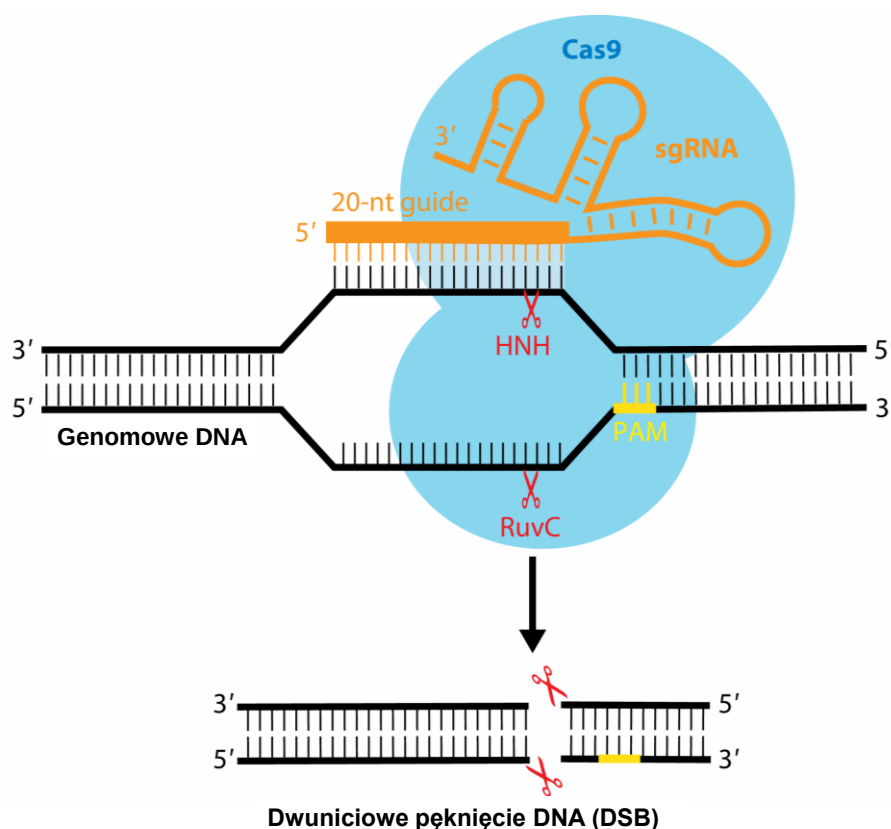
Technologia mRNA niesie za sobą wiele zalet. Do jednej z głównych możemy zaliczyć fakt, iż, w przeciwieństwie do DNA, syntetyczne mRNA nie musi być wprowadzone do wnętrza jądra komórkowego, żeby zachować swoją funkcjonalność i ulegać translacji. Co więcej, nie występuje tutaj integracja syntetycznego mRNA z genomem gospodarza, co eliminuje ryzyko niepożądanych mutacji i nieodwracalnych zmian w genomie, mogących prowadzić do stanów chorobowych, a co jest istotną wadą terapii opartych na DNA. Innym atutem zastosowania cząsteczki mRNA w terapii jest to, że ze względu na swoją „nietrwałość” jest ona aktywna tylko przez skończony czas oraz fakt, że jest całkowicie degradowana na drodze fizjologicznych szlaków metabolicznych i nie wytwarza szkodliwych czy toksycznych produktów przemiany materii. Dodatkowo, zastosowanie mRNA niweluje problemy z ewentualną obróbką potranslacyjną białek, ponieważ białko powstaje z wykorzystaniem komórkowego aparatu translacyjnego i podlega wszystkim naturalnym modyfikacjom, które zachodzą po tym procesie. Nie bez znaczenia są oczywiście również względy finansowe – produkcja wysokiej jakości mRNA jest stosunkowo tania i szybka w porównaniu do produkcji leków białkowych, które technologia mRNA mogłaby zastąpić. Wszystkie te czynniki sprawiają, że mRNA jest bardzo obiecującym kierunkiem we współczesnej medycynie. Niewątpliwie

pandemia wirusa SARS-COV-2 (z ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*; drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego), która wybuchła pod koniec 2019 roku znacznie przyspieszyła prace nad wdrożeniem technologii terapeutycznego mRNA do praktyki. Zaowocowało to zatwierdzeniem przez FDA (z ang. *Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków) w 2021 dwóch preparatów opartych na mRNA – szczepionek firmy Pfizer-BioNTech (BNT162b2/Comirnaty®) [122] oraz Moderna (mRNA-1273/Spikevax®) [123], które wykazały ponad 94% skuteczność w trzeciej fazie badań klinicznych.

Oczywiście, technologia mRNA nie jest bez wad i naukowcy rozwijający tę technikę muszą się mierzyć z szeregiem problemów. Stoją oni głównie przed dwoma wyzwaniami. Pierwszym jest stosunkowo krótki czas trwania cząsteczki mRNA, co może być interpretowane zarówno jako wada, jak i zaleta (co zostało wyjaśnione w poprzednim akapicie). Jednakowoż, w większości przypadków bardziej pożądane jest wydłużenie czasu życia terapeutycznego mRNA i nadanie mu odporności na degradację przez RNazy, które są obecne zarówno w przestrzeni pozakomórkowej, jak i wewnątrz komórki. Próbuje się to osiągnąć wprowadzając różnego rodzaju chemiczne modyfikacje do struktury mRNA. Drugim czynnikiem jest immunogenność „obcego” RNA, które jest rozpoznawane przez endosomalne i cytoplazmatyczne receptory nieswoistej odpowiedzi odpornościowej organizmu gospodarza oraz inne sensory kwasów nukleinowych, które są obecne w komórce. Innym dość istotnym wyzwaniem dla naukowców jest opracowanie wydajnej i skutecznej metody dostarczania RNA do komórki. Ze względu na swój ładunek wynikający z ujemnie naładowanego szkieletu fosforanowego, cząsteczka mRNA nie jest w stanie przekroczyć bariery w postaci dodatnio naładowanej błony komórkowej. Ważną kwestią jest również miejsce dostarczenia mRNA – pożądana byłaby możliwość wprowadzenia mRNA do określonych komórek lub tkanek. Obecnie najbardziej obiecującymi strategiami dostarczania mRNA do komórki wydają się nanocząstki lipidowe (z ang. *LNP – lipid nanoparticles*), polimery, replikony na wzór wirusowych replikonów czy peptydy [118].

Nieco inną, ale bardzo ciekawą strategią jest wykorzystanie mRNA w połączeniu ze stosowanym w biotechnologii systemem edycji genów CRISPR/Cas9. CRISPR (z ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) to krótkie, zgrupowane i powtarzające się regularnie palindromiczne sekwencje genetyczne obecne w genomie. Razem z białkami z rodziny Cas (z ang. *CRISPR associated protein*) tworzą one naturalny mechanizm nabytej odporności występujący u większości archeonów i wielu bakterii [124,125]. Polega on na integrowaniu z własnym genomem fragmentów obcego materiału genetycznego pochodzącego od patogenów, np. bakteriofagów czy wirusów, co w razie późniejszej ponownej infekcji umożliwia szybkie rozpoznanie i unieszkodliwienie intruza. Fragmenty te ulegają transkrypcji, tworząc niewielkie

cząsteczki crRNA (z ang. CRISPR RNA), które naprowadzają odpowiednie białka Cas na komplementarną sekwencję w egzogennych kwasach nukleinowych w wyniku czego dochodzi do dwuniciowych pęknięć w obcych cząsteczkach DNA lub RNA (z ang. *double-stranded break*, DSB) oraz ich wyciszenia (interferencji). Spośród kilkunastu wariantów tego systemu występujących u prokariotów, naukowcy zaproponowali jeden z nich, CRISPR/Cas typu II, jako kandydata na zastosowanie w inżynierii genetycznej [126]. Niewątpliwą zaletą tego wariantu jest fakt, że za hydrolizę odpowiada jedna tylko endonukleaza Cas9. Posiada ona dwie domeny nukleolityczne: HNH odpowiada za cięcie nici komplementarnej do sekwencji crRNA, natomiast RuvC – drugiej nici obcego materiału genetycznego. Udało się w ten sposób skonstruować narzędzie, które pozwala na bardzo precyzyjną edycję genomu danego organizmu. Było to osiągnięcie tak przełomowe, że zostało ono uhonorowane Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 2020 roku.

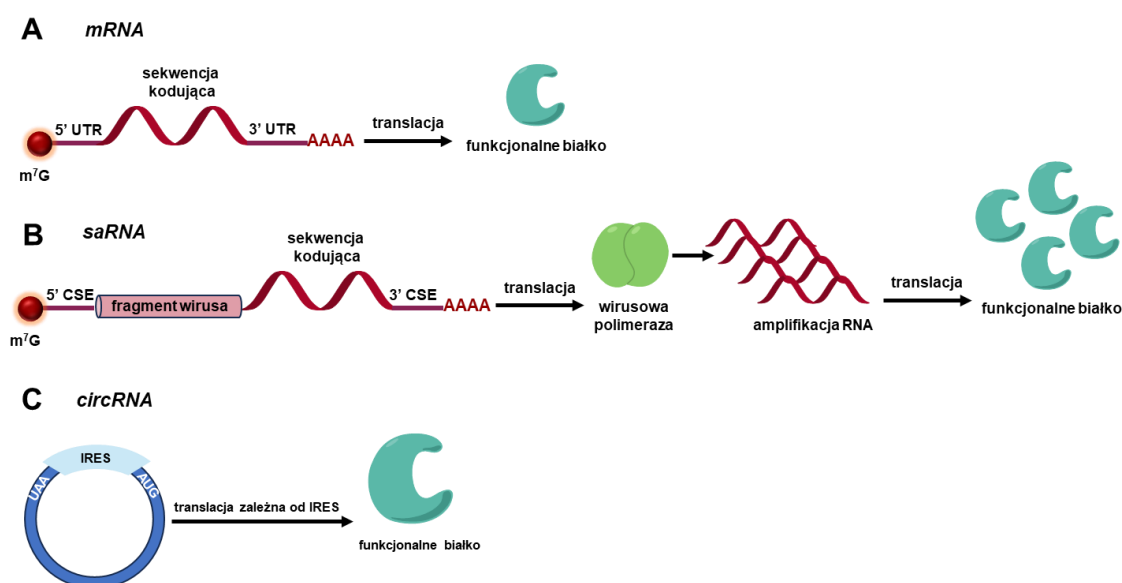


Rys. 20 Mechanizm działania systemu edycji genów CRISPR/Cas9. System CRISPR/Cas9 składa się z dwóch elementów - cząsteczki sgRNA (z ang. *single guide RNA*) oraz endonukleazy Cas9, które tworzą razem kompleks odpowiedzialny za rozpoznanie i degradację docelowego DNA (choć istnieje również możliwość hydrolizy RNA). sgRNA zawiera w swojej strukturze fragment komplementarny do docelowej sekwencji DNA na końcu 5' oraz fragment odpowiadający za wiązanie z Cas9 na końcu 3'. Za rozpoznanie i przyłączenie kompleksu CRISPR/Cas9 do DNA odpowiada trzynukleotydowy motyw PAM (z ang. *Protospacer Adjacent Motif*), następnie Cas9 rozplątuje dwuniciową helisę, umożliwiając hybrydyzację między sgRNA a DNA i przecina obie nici genomowego DNA, powodując dwuniciowe pęknięcia (DSB). Rysunek zaczerpnięto z [127].

Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia, które limitują jej szersze zastosowanie w medycynie. Jednym z nich jest sposób dostarczenia komponentów CRISPR/Cas9 do komórek, a w szczególności drugiego z nich. Cas9 może być dostarczony do komórek w formie DNA, mRNA lub białka. Wykorzystanie w tym celu mRNA eliminuje problemy związane z koniecznością dostarczenia go do jądra komórkowego i możliwością występowania niepożądanych mutacji jak w przypadku DNA, czy obawami związanymi z poważnymi reakcjami immunologicznymi, które mogą wywołać endotoksyny pochodzące z bakteryjnego białka, nie wspominając o konieczności dostarczenia do komórek tak dużego białka w niezmienionej formie. Do atutów mRNA należy również jego stosunkowo krótki czas trwania w komórce stanowiący naturalne ograniczenie nadekspresji endonukleazy, która w zbyt dużej ilości mogłaby powodować działania niepożądane, takie jak niespecyficzne cięcie genomu komórkowego. W połączeniu z nanocząstkami lipidowymi mRNA stanowią świetną i przede wszystkim bezpieczną alternatywę, która mogłaby rozwiązać wymienione tu ograniczenia.

Ostatnio dużą popularność w projektowaniu terapeutyków opartych na RNA zyskuje również podejście z wykorzystaniem tzw. samo-powielającego się RNA, saRNA (z ang. *self-amplifying RNA*), czy cyrkularnego RNA, circRNA (z ang. *circular RNA*) (Rys. 21). Stanowią one niejako alternatywę dla mRNA, eliminując jednocześnie część ograniczeń wynikających z krótkiego czasu życia cząsteczki mRNA w komórce. Pierwsza strategia łączy konwencjonalne mRNA kodujące odpowiedni antygen z dodatkowym fragmentem, pochodzącym z genomu alfawirusa (bądź innego z rodziny wirusów o dodatniej polarności RNA), który jest odpowiedzialny za ciągłą replikację materiału genetycznego wewnątrz komórki. Wynika z tego bardzo istotna zaleta – terapeutyki oparte na saRNA charakteryzują się zwiększoną i dłuższą ekspresją kodującego antygeny, co przekłada się na możliwość zastosowania niższej dawki niż w przypadku konwencjonalnego mRNA i wynikającej z tego bezpieczniejszej immunizacji [128]. Wyniki badań z ostatnich lat zdają się potwierdzać ten wysoki potencjał terapeutyków opartych na saRNA w leczeniu nowotworów czy chorób o podłożu wirusowym, pasożytniczym i bakteryjnym [129-133]. Z kolei cyrkularny RNA to nieco odmienne, ale równie ciekawe podejście terapeutyczne. Są to cząsteczki niekodującego RNA, których końce 5' oraz 3' są kowalencyjnie związane i tworzą strukturę pętli. Dzięki temu są odporne na działanie egzonukleaz i wykazują większą stabilność niż liniowe RNA [117]. Do tej pory w literaturze opisuje się głównie ich potencjalne zastosowanie jako „gąbki miRNA” (ang. *miRNA sponges*) – w swojej strukturze zawierają one miejsca wiązania miRNA, blokując tym samym ich oddziaływanie z docelową sekwencją mRNA [134,135]. Jednakże ostatnio zaczęły pojawiać się prace, w których podjęto próby zaimplementowania tej strategii do stworzenia cyrkularnego mRNA, które ulegałoby translacji wewnątrz komórki

na zasadzie niekanonicznej (niezależnej od kapu) translacji z wykorzystaniem sekwencji IRES (z ang. *internal ribosome entry site*; wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu) [136-139].



Rys. 21. Zasada działania terapeutyków mRNA, sarna oraz circRNA na przykładzie białkowej terapii zastępczej. A) Konwencjonalna cząsteczka mRNA zawierająca sekwencję kodującą określone białko ulega translacji za pośrednictwem rybosomów, produkując funkcjonalne białko. Swoją rolę pełni maksymalnie kilka godzin, a następnie jest degradowana. B) Cząsteczka saRNA oprócz sekwencji białkowej zawiera również fragment genomu wirusowego, który koduje białka wirusowe, tworzące kompleks polimerazy RNA zależnej od RNA, której zadaniem jest powielenie docelowych transkryptów. Ważną rolę odgrywają flankujące sekwencje CSE (z ang. *conserved sequence elements*), które są rozpoznawane przez polimerazę i inicjują amplifikację docelowego RNA, które następnie ulega translacji. W rezultacie dochodzi do zwiększonej produkcji docelowego białka w porównaniu do cząsteczki mRNA. C) Cząsteczka circRNA może ulegać w komórkach alternatywnej translacji niezależnej od obecności kapu z wykorzystaniem sekwencji IRES (z ang. *internal ribosome entry site*). Ze względu na kolistą formę jest bardziej stabilna niż cząsteczka mRNA – jej czas życia w komórce jest kilkukrotnie dłuższy, w wyniku czego jest w stanie dużo efektywniej produkować docelowe białko.

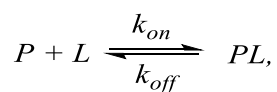
Coraz większa wiedza na temat kwasów rybonukleinowych i ich funkcji przyczyniła się do rozwoju wszystkich opisanych powyżej strategii terapeutycznych wykorzystujących cząsteczkę RNA. Terapie te w szczególności dają nadzieję chorym cierpiącym na choroby, na które współczesna medycyna nie jest w stanie znaleźć skutecznego leku. Leki oparte na RNA mogą bowiem oddziaływać na różne cele terapeutyczne: genom (DNA), transkrypty (RNA) czy białka, co pozwala na ich zastosowanie w naprawę szerokim spektrum jednostek chorobowych. A wciąż rosnąca liczba terapeutyków opartych na RNA w zaawansowanej fazie badań klinicznych ostatecznie świadczy o ich ogromnym potencjale terapeutycznym.

2.4 BADANIE ODDZIAŁYWAŃ W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

Według słownika języka polskiego PWN układ definiuje się jako „całość składającą się z powiązanych wzajemnie elementów”. Jeśli te wzajemne powiązania nazwiemy oddziaływaniami to płynnie przechodzimy do układów biologicznych. Układem biologicznym, chyba najbardziej złożonym i skomplikowanym jaki istnieje, jest organizm człowieka, ale układem biologicznym jest też białko z ligandem znajdujące się w buforze w kuwecie pomiarowej. I tak, badanie takich prostych oddziaływań dostarcza nam niezwykle cennych informacji na temat funkcjonowania wyższych struktur. Nie jest bowiem możliwe zrozumienie działania bardziej złożonych układów, takich jak komórki, narządy, czy wreszcie cały organizm bez zrozumienia istoty tych fundamentalnych oddziaływań jakie zachodzą na poziomie makromolekuł czy nawet pojedynczych atomów.

2.4.1 SPOSOBY OPISYWANIA ODDZIAŁYWAŃ BIAŁKO-LIGAND

Białka pełnią w organizmie szereg różnych funkcji – stanowią rusztowanie komórek i tkanek, transportują składniki w krwioobiegu, biorą udział w reakcjach biochemicznych, pełnią rolę przekaźników sygnałowych czy chronią organizm przed patogenami. Stąd niezwykle ważnym rodzajem oddziaływań są interakcje, jakie występują między białkami a innymi (makro)molekułami. Szczególnie istotne z perspektywy projektowania nowych leków są oddziaływania białek z małocząsteczkowymi ligandami i próba poznania ich mechanizmów biochemicznych. Z fizycznego punktu widzenia możemy opisać te oddziaływania za pomocą odpowiednich wielkości fizycznych. Dynamikę wiązania się ze sobą dwóch molekuł w stanie wolnym – białka (P) i liganda (L) - możemy opisać w ten sposób:



gdzie PL oznacza kompleks białka z ligandem, a k_{on} oraz k_{off} to stałe szybkości odpowiednio asocjacji (wiązania) i dysocjacji („odwiązania”, czyli rozpadu) kompleksu. W stanie równowagi szybkość tworzenia się kompleksu jest równa szybkości jego rozpadu, a parametry te wyraża się jako iloczyn stężeń odpowiednich składników kompleksu i odpowiadających im stałych szybkości:

$$k_{on}[P][L] = k_{off}[PL],$$

gdzie kwadratowe nawiasy reprezentują stężenia odpowiednich składników tworzących kompleks w stanie równowagi: $[P]$ – stężenie wolnego białka, $[L]$ – stężenie wolnego liganda, $[PL]$ – stężenie kompleksu białko-ligand. To już bezpośrednio prowadzi

do wprowadzenia wielkości fizycznej jaką jest stała asocjacji (wiązania), K_{AS} , która charakteryzuje powinowactwo liganda do białka i jest wyrażona wzorem:

$$K_{AS} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[P][L]}{[PL]} = K_D^{-1},$$

gdzie K_D to stała dysocjacji kompleksu. Im większa wartość K_{AS} (i mniejsza K_D), tym silniejsze oddziaływanie między białkiem a ligandem.

W kontekście identyfikowania nowych leków za pomocą różnego typu testów laboratoryjnych możemy wyróżnić jeszcze dwa parametry, które stosuje się do określenia kompleksu białko-ligand. Mowa tu o parametrach EC_{50}/IC_{50} , które charakteryzują aktywność farmakologiczną (biologiczną) danego liganda względem celu terapeutycznego (w tym przypadku białka). EC_{50} (z ang. *half maximal effective concentration* – połowa maksymalnego stężenia efektywnego) to stężenie liganda, które indukuje określoną odpowiedź biologiczną w 50%. Z kolei parametr IC_{50} (z ang. *half maximal inhibitory concentration* – połowa maksymalnego stężenia inhibitora) odnosi się *stricte* do układów enzym-inhibitor i oznacza takie stężenie związku, które hamuje aktywność tegoż enzymu o połowę.

2.4.2 METODY BADAŃ ODDZIAŁYWAŃ BIAŁKO-LIGAND

W poprzednim podrozdziale przedstawiono parametry, przy użyciu których w sposób ilościowy można opisać oddziaływania pomiędzy białkiem a ligandem. Natomiast w tym rozdziale zaprezentowane zostaną wybrane metody biofizyczne, przy użyciu których można je skwantyfikować. Metody te charakteryzują oddziaływania pod kątem różnych właściwości i mechanizmów fizykochemicznych.

Za pomocą technik kalorymetrycznych takich jak izometryczna kalorymetria miareczkowa [140] (ITC, z ang. *isothermal titration calorimetry*) czy skaningowa kalorymetria różnicowa [141] (DSC, z ang. *differential scanning calorimetry*) możemy z powodzeniem badać oddziaływania białek z innymi molekułami, a na podstawie uzyskanych danych termodynamicznych możliwe jest wyznaczenie, np. molowej entalpii (ΔH) czy entropii wiązania (ΔS) białka z ligandem. Obie techniki bazują na pomiarze efektów cieplnych, które zachodzą pod wpływem tworzenia się kompleksu białko-ligand. Są więc bardzo uniwersalne i mogą być wykorzystane do badania większości reakcji. W eksperymencie ITC miareczkuje się białko (analit) porcjami liganda (titrant) w określonych odstępach czasu, co skutkuje uwolnieniem lub pochłonięciem ciepła, które jest mierzone. Z kolei DSC to technika, w której mierzy się zmiany cieplne zachodzące w badanym układzie przy kontrolowanym wzroście (lub spadku) temperatury.

Inne metody charakteryzują zmiany strukturalne, jakie zachodzą pod wpływem połączenia się dwóch wolnych molekuł w jeden kompleks - do takich zaliczamy np. spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego [142] (NMR, z ang. *nuclear magnetic resonance*), mikroskopię krioelektronową [143] (cryo-EM, z ang. *cryogenic electron microscopy*), czy krystalografię rentgenowską [144] (z ang. *X-ray crystallography*). Ostatnia z nich praktycznie zdominowała biologię strukturalną na kilkadziesiąt lat, począwszy od połowy XX wieku, kiedy to po raz pierwszy określono doświadczalnie struktury białek, mioglobiny i hemoglobiny [145,146]. Krystalografia rentgenowska polega na badaniu kryształów białek lub kompleksów białko-ligand za pomocą dyfrakcji promieni X. Pozwala ona określić strukturę takiego oddziaływania na poziomie atomowym. Znacznym ograniczeniem tej metody jest jednak konieczność otrzymania stabilnego monokryształu badanego kompleksu, co dla niektórych białek nie zawsze jest możliwe. Spektroskopia NMR eliminuje ten problem, umożliwiając badanie kompleksów białkowych w roztworze. Wykorzystuje ona właściwości magnetyczne jąder atomowym o niezerowym spinie, takich jak ^1H , ^{13}C czy ^{19}F , i pozwala wyznaczyć ich położenie względem siebie. Wymaga ona jednak dość dużych stężeń badanych białek, muszą one też być stabilne, gdyż pomiary potrafią trwać kilka godzin. Dodatkowo, metoda ta nadaje się najlepiej do badania niewielkich białek, do 20 kDa. Jeszcze inne podejście stosuje się w metodzie cryo-EM, gdzie badaną próbkę zamraża się w pełni uwodnionym stanie w temperaturze -180°C (zazwyczaj w ciekłym etanie), a następnie obrazuje ją przy użyciu mikroskopii elektronowej. Dzięki tej technice można analizować próbki w ich naturalnym stanie, a także monitorować dynamikę oddziaływań między częściami.

Jeszcze inne metody skupiają się na określeniu kinetyki wiązania kompleksu białko-ligand – tu pomocna może okazać się technika powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, z ang. *surface plasmon resonance*). Wykorzystuje się w niej zjawisko indukowanego światłem wzbudzenia oscylacji elektronów przewodzących (tzw. plazmonów) w metalowej płytce – warunkiem wystąpienia SPR jest odpowiednia energia fali elektromagnetycznej padającej na płytkę, która jest równa energii drgań oscylacyjnych plazmonów oraz odpowiedni kąt padania światła (tzw. kąt rezonansowy, kąt SPR), dla którego występuje obserwowalne tłumienie mocy sygnału odbitego. Okazuje się, że nawet niewielkie zmiany na powierzchni płytki - sensora skutkują mierzalną zmianą współczynnika załamania światła, co zostało wykorzystane do pomiaru oddziaływań receptorów z ligandami [147].

Warto również wspomnieć o szeregu różnych metod bazujących na pomiarach intensywności fluorescencji. Jedną z nich jest miareczkowanie fluorescencyjne zsynchronizowane czasowo (z ang. *time synchronized fluorescence quenching titration*, tsFQT). Wykorzystuje się w niej naturalną fluorescencję białka wynikającą z obecności

reszt tryptofanowych, tyrozynowych oraz fenyloalaninowych oraz monitorowanie jej wygaszania na skutek wiązania z ligandem. Pomiar polega na dodawaniu w określonych odstępach czasu małych porcji liganda do białka (lub na odwrót) i pomiarze emisji fluorescencji białka. Metoda ta pozwala na wyznaczenie wartości stałych asocjacji tworzących się kompleksów białek z ich ligandami i z powodzeniem stosowana jest do badania oddziaływań białek rozpoznających strukturę kapu, jak eIF4E [148] czy DcpS [149]. Innym przykładem techniki biofizycznej opartej na pomiarze zmian fluorescencji jest termoforeza mikroskalowa (z ang. *microscale thermophoresis*, MST). Daje ona możliwość monitorowania ukierunkowanego ruchu molekuł w mikroskopowym gradiencie temperaturowym (zjawisko termoforezy). Gdy badana cząsteczka wyznakowana fluorescencyjnie (np. białko) łączy się z inną cząsteczką (np. ligandem), zmieniają się jej właściwości – może to być rozmiar, ładunek czy np. entropia solwacyjna cząsteczki/kompleksu – wpływa to na jej ruch termoforetyczny, co powoduje mierzalne zmiany sygnału fluorescencji. MST to metoda bardzo czuła, pozwalająca wyznaczyć stałą dysocjacji tworzącego się kompleksu w dużym zakresie stężeń. Zużywa również małe ilości materiału i pozwala badać nie tylko oddziaływania między białkiem a małocząsteczkowym ligandem [150,151], ale nadaje się również do analizowania różnych typów interakcji takich jak białko-białko [152] czy białko-kwas nukleinowy [153].

Wszystkie opisane powyżej metody idealnie nadają się badania oddziaływań między białkiem a ligandem (przez pojęcie liganda rozumie się każdą molekułę, która wiąże się, w tym przypadku, z białkiem – może to być zarówno substrat, aktywator, jak i inhibitor). Pozwalają one w sposób bardziej dokładny przeanalizować i zrozumieć daną interakcję, nawet na poziomie molekularnym. Jednak w przypadku poszukiwania inhibitorów danego enzymu, szuka się raczej metod, które umożliwią monitorowanie reakcji enzymatycznej, np. zmianę kinetyki reakcji na skutek związania się enzymu z inhibitorem.

Przykładem takiej metody może być znakowanie radioaktywne, które jest często stosowane do badania aktywności enzymów dekapujących i identyfikacji ich inhibitorów [56,92,154-156]. Znakowaniu izotopem fosforu-32, ^{32}P , poddaje się substrat badanego enzymu (a dokładniej fosforan przy $m^7\text{G}$ w cząsteczce RNA lub analogu kapu, np. $m^7\text{GpppG}$) i inkubuje z enzymem. Pobierając niewielkie porcje reakcji w określonych punktach czasowych, możliwe jest śledzenie postępu degradacji substratu w czasie. Wykorzystuje się w tym celu chromatografię cienkowarstwową, TLC (z ang. *thin layer chromatography*) na płytkach celulozowych modyfikowanych polietylenoiminą, PEI (z ang. *polyethylenimine*) lub elektroforezę w żelu poliakrylamidowym, PAGE (z ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*), a następnie obrazowanie płytki lub utrwalonego żelu z rozwiniętymi produktami reakcji metodą autoradiografii. W ten

sposób można również badać wpływ różnych związków na postęp hydrolizy substratu i tym samym identyfikować inhibitory enzymu.

Inną techniką wykorzystywaną do śledzenia postępu reakcji enzymatycznej jest wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC (z ang. *high-performance liquid chromatography*) [157,158]. Testowane próbki zawierające zarówno substraty, jak i produkty, nanoszone są na kolumnę chromatograficzną w strumieniu ciekłej fazy ruchomej i oddziałują ze złożem kolumny, ulegając separacji ze względu na różnice w hydrofobowości, po czym są wmywane gradientem odpowiedniego buforu. W przypadku analizowania związków pochodzenia nukleotydowego stosuje się układ, w którym faza stacjonarna (złożenie kolumny) jest mniej polarna niż faza ruchoma i nazywamy ją zwyczajowo wysokosprawną chromatografią cieczową w układzie faz odwróconych, RP-HPLC (z ang. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) [159]. Substancje eluują wtedy z kolumny w kolejności od najbardziej polarnych (najmniej hydrofobowych), a ich detekcja odbywa się przez rejestrowanie promieniowania przechodzącego przez próbkę (pomiar absorpcji) lub emitowanego z niej (pomiar fluorescencji). W ten sposób można obserwować postęp reakcji enzymatycznej w czasie – zmniejszanie się intensywności sygnału pochodzącego od substratu i wzrost sygnału pochodzącego od produktu/produktów oraz wpływ innych związków na kinetykę reakcji.

Opisane powyżej metody mają jednak szereg ograniczeń. Po pierwsze, nie pozwalają one śledzić przebiegu reakcji enzymatycznej w czasie rzeczywistym. Monitorowanie reakcji odbywa się już *post factum*. Po drugie, są one dość czasochłonne i małoprzepustowe – możliwe jest analizowanie tylko jednej lub maksymalnie kilku reakcji w jednym czasie. Przystosowanie ich do formatu wysokoprzepustowego jest często niemożliwe, a na pewno nietrywialne. Zastosowanie w tym celu technik opartych na zjawisku fluorescencji wydaje się eliminować te niedogodności. Wspomniano już o zastosowaniu metod fluorescencyjnych do badania oddziaływań typu białko-ligand. Stosuje się je również do wizualizacji obiektów biologicznych i lokalizacji cząsteczek w komórkach. Śmiało można stwierdzić, że stanowią one niezwykle cenne narzędzie w rozumieniu procesów biologicznych zachodzących w komórkach. Mnogość dostępnych znaczników fluorescencyjnych o różnych parametrach i mechanizmach działania pozwala na ich zastosowanie właściwie w dowolnym układzie pomiarowym, co znajduje odzwierciedlenie w licznych pracach naukowych opisujących zastosowanie fluorescencji w biologii molekularnej.

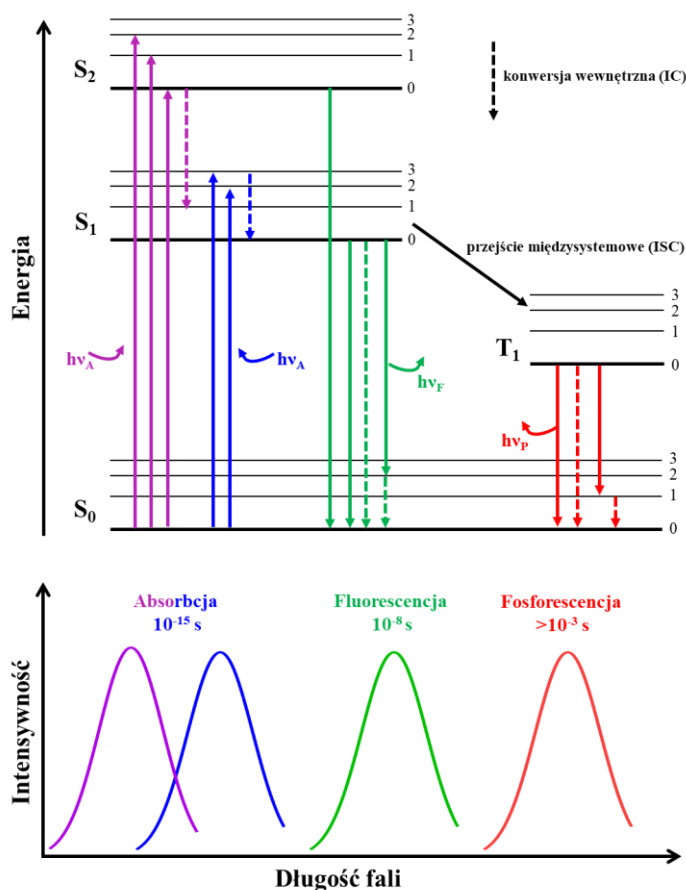
2.5. METODYKA BADAŃ

Tematem niniejszej rozprawy doktorskiej jest wykorzystanie metod biofizycznych do identyfikacji i charakterystyki inhibitorów dwóch enzymów zaangażowanych w degradację końca 5' mRNA. W poniższym podrozdziale zostaną zatem omówione podstawy teoretyczne technik, które są istotne z punktu widzenia tej rozprawy.

2.5.1. METODY SPEKTROSKOPOWE OPARTE NA POMIARZE INTENSYWNOŚCI FLUORESCENCJI (FLINT)

Spektroskopia emisyjna jest jednym z podstawowych narzędzi badawczych układów biologicznych, chociażby ze względu na swoją wysoką czułość i selektywność. Opiera się ona na zjawisku fotoluminescencji, które polega na emisji fotonów przez wzbudzone atomy lub cząsteczki, co jest związane z przejściem promienistym elektronów z jednego ze stanów wzbudzonych ($S_1, S_2, \dots$) do stanu podstawowego (S_0) lub do niższego stanu wzbudzonego (wszystkie procesy zachodzące między absorpcją a emisją światła świetnie ilustruje diagram Jabłońskiego, Rys. 22).

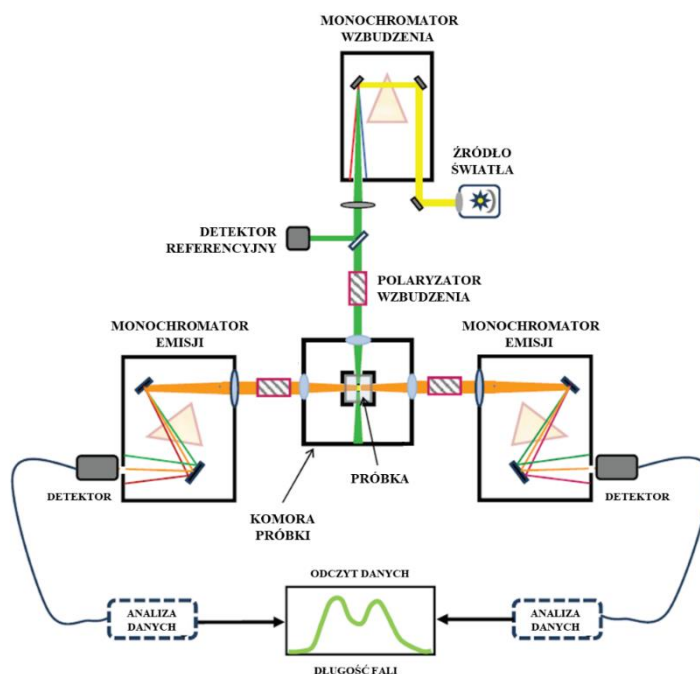
Ze względu na naturę stanu wzbudzonego oraz czas trwania luminescencji możemy ją podzielić na fosforescencję (średnie czasy życia $>10^{-3}$ s), dla której stan wzbudzony jest trypletowy (T_1), co oznacza, że występują w nim niesparowane elektrony (o tej samej orientacji spinu co elektron w stanie podstawowym) oraz fluorescencję (czasy życia rzędu 10^{-8} s), gdzie emisja zachodzi ze wzbudzonego stanu singletowego (S), na którym spiny elektronów są sparowane ze spinami elektronów w stanie podstawowym. I to właśnie fluorescencja jest często wykorzystywana w badaniach oddziaływań białko–ligand. Warto również wspomnieć, że energia promieniowania emitowanego jest zawsze niższa od energii promieniowania zaabsorbowanego – cząsteczka traci część energii w wyniku przejść bezpromienistych, np. konwersji wewnętrznej (z ang. *IC* – *internal conversion*). Skutkuje to przesunięciem widma emisji fluorescencji w kierunku fal dłuższych, a różnica między długościami fal w maksimum absorpcji i emisji nazywane jest przesunięciem Stokesa i silnie zależy od polarności środowiska. Ponadto, reguła Kashy mówi, że dla większości związków kształt widma emisyjnego jest niezależny od długości fali wzbudzenia.



Rys. 22. Diagram Jabłońskiego ilustruje procesy fotofizyczne zachodzące w cząsteczkach. Molekuły absorbują promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu UV/VIS (strzałki fioletowe i niebieskie), co powoduje wzbudzenie elektronów do wyższych poziomów energetycznych i zmianę konfiguracji elektronicznej cząsteczki - elektrony przechodzą ze stanu podstawowego S_0 do jednego ze stanów wzbudzonych (S_1 , S_2). Stany S_0 , S_1 , S_2 , T_1 posiadają dodatkowo szereg poziomów oscylacyjnych (wibracyjnych), które oznaczono 0, 1, 2, itd. Nadwyżka energii jest następnie emitowana w postaci fluorescencji (zielone strzałki) lub fosforescencji (czerwone strzałki). Strzałki narysowane linią przerywaną oznaczają przejścia bezpromieniste (bez emisji promieniowania) nazywane konwersją wewnętrzną (**IC**; przejście pomiędzy stanami o jednakowej krotności spinu) – proces ten często poprzedza emisję promieniowania, która zachodzi z najniższego energetycznego poziomu wibracyjnego (pogrubiona linia przy każdym z poziomów S_1 , S_2). Z kolei jeśli elektron przechodzi z poziomu singletowego S_1 do pierwszego stanu trypletowego T_1 to mamy do czynienia z bezpromienistym przejściem międzysystemowym (następuje zmiana krotności spinu, z ang. **ISC** – *intersystem crossing*). Emisję ze stanu trypletowego T_1 nazywamy fosforescencją.

Do pomiaru fluorescencji oraz rejestracji widm wzbudzenia (ekscytacyjnych) i emisyjnych molekuł służy spektrofluorymetr (jego uproszczony schemat przedstawiono na Rys. 23). Urządzenie takie składa się ze źródła światła, monochromatorów, systemu optycznego oraz detektora i odpowiedniego systemu konwertującego sygnał z detektora na odpowiednie widmo, które obserwujemy na wyświetlaczu monitora. Generatorem promieniowania wzbudzającego próbkę może być laser, dioda LED lub lampa (zazwyczaj używana jest ksenonowa lampa łukowa, wysokociśnieniowa lampa rtęciowa czy lampy wolframowo-halogenowe). Zastosowanie w tym celu lasera eliminuje konieczność używania monochromatorów czy filtrów w układzie pomiarowym. Jest to związane z charakterystyką działania lasera, który emituje promieniowanie w bardzo

wąskim przedziale długości fali, co oczywiście może też być ograniczeniem. Następnie światło jest kierowane do monochromatora. Jest to przyrząd optyczny złożony z pryzmatów lub układu siatek dyfrakcyjnych, którego zadaniem jest rozszczepienie padającego światła i wyselekcjonowanie z niemonochromatycznego widma wiązki światła wzbudzającego o określonej długości fali. Dalej wiązka jest transmitowana przez układ optyczny do komory próbki, gdzie następuje wzbudzenie badanej substancji. Wzbudzone molekuly próbki, wracając do stanu równowagi, oddają nadmiar energii w postaci fluorescencji, która jest emitowana we wszystkich kierunkach i rejestrowana przez detektor. Jednak zanim światło emitowane przez próbkę trafi do detektora, jest analizowane przez monochromator emisyjny, który skanuje wybrany zakres długości fal z całego widma emitowanego przez próbkę i kieruje ją dalej. Monochromatory emisyjne i detektory we fluorymetrach są umiejscowione zazwyczaj pod kątem 90° względem światła wzbudzającego. Zastosowanie takiej geometrii pozwala wyeliminować wpływ promieniowania przechodzącego przez próbkę na rejestrowane widmo. Rolę detektora najczęściej pełni fotopowielacz – następuje w nim zamiana impulsów świetlnych (fotonów) na impulsy elektryczne, które są następnie powielane na dynodach fotopowielacza. Powstający prąd jest wprost proporcjonalny do intensywności światła emitowanego wpadającego do fotopowielacza i jest dalej charakteryzowany ilościowo przez odpowiedni układ elektryczny.



Rys. 23. Schemat budowy spektrofluorymetru (zaczepnięto z *Practical Fluorescence Spectroscopy*⁴).

⁴ *Practical Fluorescence Spectroscopy*, Gryczynski Z. K., Gryczynski I., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2020

Jednym z prostszych podejść stosowanych do charakterystyki wiązania się białek z małowcząsteczkowymi ligandami są techniki oparte na pomiarze zmian intensywności fluorescencji (FLINT, z ang. *fluorescence intensity*), w których wykorzystuje się sondy molekularne wyznakowane odpowiednim znacznikiem fluorescencyjnym [160-162]. Zmiany fluorescencji zachodzą podczas takiej interakcji pod wpływem pojawiania się lub zanikania oddziaływań wygaszających między znacznikiem a pozostałą częścią sondy. Zjawisko to często wykorzystywane jest do opracowywania sond opartych na strukturze nukleotydów, np. do badania oddziaływań z białkami rozpoznającymi strukturę końca 5' mRNA (kapu) [163-166]. Sondy takie zbudowane są zazwyczaj z dwóch elementów połączonych linkerem – jeden odpowiada za selektywne oddziaływanie z inną molekułą, a drugi jest źródłem mierzalnego sygnału (znacznik fluorescencyjny). Do najważniejszych cech charakteryzujących idealną sondę należą:

- wysokie powinowactwo do celu molekularnego (np. badanego enzymu) – parametrem opisującym tę cechę może być wielkość fizyczna - stała asocjacji lub dysocjacji (K_{AS}/K_D) albo parametry kinetyczne reakcji sondy z celem;
- wysoka specyficzność względem celu molekularnego, która pozwala wyeliminować niespecyficzne oddziaływania z przypadkowymi celami, nie będącymi w obszarze naszych zainteresowań;
- wysoki stosunek sygnału do szumu (S/N, z ang. *signal to noise ratio*) – parametr ten opisuje różnicę między sygnałem właściwym a tłem pomiaru, który jest niepożądany. Im wyższa wartość, tym lepsza sonda;
- wysoka czułość, która pozwala identyfikować dużo niższe stężenia badanych substancji.

2.5.2. TECHNIKI ELEKTROFORETYCZNE NA PRZYKŁADZIE ELEKTROFOREZY W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM (PAGE)

Techniki elektroforetyczne są często używane w biologii molekularnej do rozdzielania, identyfikowania i oczyszczania głównie kwasów nukleinowych i białek, a separacja naładowanych makrocząsteczek odbywa się podczas ich migracji w odpowiednim nośniku pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Prędkość poruszania się badanej molekuly jest zależna od wielu czynników – kształtu i wielkości danej cząsteczki, jej ładunku, a także oporów ruchu środowiska. Możemy ją wyrazić wzorem:

$$v = E \cdot qf = E \cdot \mu_{ef},$$

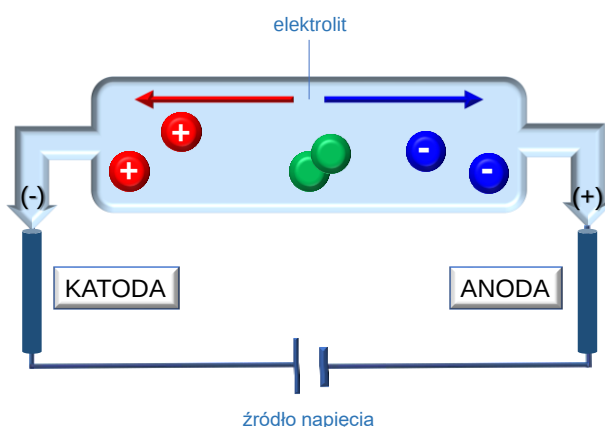
gdzie E oznacza natężenie pola elektrycznego, q to ładunek cząsteczki, a f to współczynnik tarcia, który jest zależny od wspomnianych już wcześniej właściwości

molekuły (jej kształtu, wielkości, etc.). Iloczyn qf nazywany jest ruchliwością elektroforetyczną cząsteczki (μ_{ef}) i jest on stały w określonych warunkach elektroforezy. Jest to wielkość charakterystyczna dla danego analitu, zależna od jego ładunku (q) i promienia (R), ale również właściwości ośrodka, w którym przeprowadzana jest analiza – pH (szczególnie istotne w przypadku analizy białek i peptydów), siły jonowej, lepkości (η) czy wielkości porów nośnika i możemy ją wtedy przedstawić za pomocą następującej zależności:

$$\mu_{eff} = \frac{q}{6\pi R\eta}.$$

Dobierając odpowiednio powyższe czynniki (tj. manipulując składem buforu – ośrodka lub nośnika), możemy wpływać na zmianę ruchliwości analizowanych cząsteczek, np. zwiększenie stężenia i siły jonowej buforu spowoduje zmniejszenie ruchliwości jonów, etc.

Najprostszy układ elektroforetyczny składa się z dwóch elektrod – dodatniej anody oraz ujemnej katody, które połączone są ośrodkiem przewodzącym, zwanym elektrolitem (Rys. 24). Przyłożenie natężenia powoduje ruch jonów, pochodzących zarówno od badanych próbek, jak i elektrolitu. W trakcie tego procesu zachodzą tak naprawdę dwa zjawiska fizyczne – elektroforeza oraz elektroliza. Elektroliza polega na odkładaniu się pod wpływem przyłożonego prądu jonów pochodzących z roztworu elektrolitu na elektrodach, co może wpływać na zwiększenie się oporności elektrolitu podczas rozdzielania. Można to opisać ilościowo, korzystając z praw elektrolizy Faradaya. Natomiast elektroforeza to zjawisko elektrokinetyczne zachodzące w elektrolizie, czyli faktyczny ruch naładowanych cząstek w kierunku elektrod o przeciwnym ładunku elektrycznym, w trakcie którego następuje rozdzielanie analizowanych makromolekuł.



Rys. 24. Zasada działania elektroforezy.

Rozdziały elektroforetyczne można prowadzić bezpośrednio w roztworze elektrolitu, jednak taka analiza charakteryzuje się dość niską rozdzielczością. Z tego powodu stosuje

się inne nośniki, które stabilizują elektrolit i zapewniają dużo lepszą rozdzielczość, a zastosowanie porowatych nośników o odpowiednim usieciowaniu pozwala dodatkowo na lepszy rozdział analizowanych makrocząsteczek przez ich frakcjonowanie na zasadzie sita molekularnego. Wybór odpowiedniego nośnika jest szczególnie istotny w przypadku analizy kwasów nukleinowych. Ze względu na obecność grup fosforanowych kwasy nukleinowe, w tym RNA, są cząsteczkami naładowanymi ujemnie. Ponadto, ponieważ każdej zasadzie odpowiada jedna reszta fosforanowa, stosunek ładunku do masy jest zasadniczo niezależny od rozmiaru czy postaci cząsteczki (jedno- czy dwuniciowa, liniowa czy cyrkularna). Przekłada się to na wyjątkową łatwość jaką wykazują kwasy nukleinowe w migrowaniu w polu elektrycznym w kierunku dodatnio naładowanej anody. Dlatego w celu wysokorozdzielczej separacji i analizy różnych cząsteczek kwasów nukleinowych niezbędny jest dodatkowy czynnik różnicujący, co jest osiąganę poprzez prowadzenie elektroforezy w odpowiednim usieciowanym ośrodku – żelu (np. agarozowym lub poliakrylamidowym). Dzięki temu, oprócz migracji ze względu tylko na ładunek ujemny, obserwujemy różnice w szybkości przemieszczania się molekuł ze względu na ich wielkość – małe cząsteczki będą migrowały w żelu szybciej, a duże wolniej. Żele agarozowe znajdują zastosowanie w analizie głównie dużych fragmentów kwasów nukleinowych (o długości do około 30 000 par zasad), natomiast poliakrylamid świetnie sprawdza się w przypadku krótszych cząsteczek o długości do 2000 par zasad, ale równie dobrze można z jego użyciem analizować również oligonukleotydy o długości kilkunastu nukleotydów. Technika elektroforetyczna wykorzystująca do rozdziałów żele poliakrylamidowe jest nazywana w skrócie PAGE (rozwińcie skrótu to nazwa techniki w języku angielskim). Do wspomnianych już wcześniej zalet wynikających ze stosowania żelu poliakrylamidowego jako nośnika (stabilność, rozdzielczość, lepsza separacja) należy dodać również dobre właściwości optyczne, obojętność elektryczną (obecność dodatkowych naładowanych grup sprzyja powstawaniu niekontrolowanych oddziaływań z analizowanymi makrojonami, co mogłoby wpłynąć na zmianę prędkości ich migracji oraz elektroendoosmozie, która polega na przemieszczaniu się sprotonowanych cząsteczek wody w kierunku ujemnej elektrody – oba te procesy negatywnie wpływają na rozdzielczość metody) oraz możliwość dobrania odpowiedniej gęstości sieciowania oraz wielkości porów. Żele poliakrylamidowe przygotowuje się łącząc roztwór monomerów akrylamidu z substancją sieciującą, jaką najczęściej stanowi bisakrylamid (N,N'-metylenobisakrylamid). Reakcja polimeryzacji jest następnie inicjowana przez nadsiarczan amonu (APS, z ang. *ammonium persulfate*) w obecności katalizatora, N,N,N',N'-tetrametylenodiaminy (TEMED). Niewątpliwą zaletą żeli poliakrylamidowych jest fakt, że manipulując stosunkiem akrylamidu do bisakrylamidu można wpływać na gęstość usieciowania i rozmiar porów takiego żelu, dobierając odpowiednie parametry do wielkości analizowanych próbek.

Badania własne

3. OPRACOWANIE WYSOKOPRZEPUSTOWEJ METODY OPARTEJ NA FLUORESCENCJI DO POSZUKIWANIA INHIBITORÓW ENZYMÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ W DEGRADACJI KOŃCA 5' mRNA

3.1 PRZEDMIOT I CEL BADAŃ

Celem projektu doktorskiego było opracowanie nowej metody, która umożliwiłaby monitorowanie aktywności enzymów związanych z metabolizmem końca 5' mRNA. Mowa o dwóch enzymach odpowiedzialnych za rozpoznanie i hydrolizę struktury kapu – wirusowym enzymie D9 oraz ludzkim enzymie DCP2, który stanowi część większego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2. Usunięcie kapu stanowi preludium do dalszej degradacji łańcucha mRNA, która zatrzymuje ekspresję genu. Enzymy te zostały więc wybrane ze względu na ich kluczową rolę w funkcjonowaniu i metabolizmie mRNA, co czyni je ważnymi celami molekularnymi w różnych terapiach.

Enzym D9 pochodzi z wirusa krowianki należącego do rodziny dużych wirusów DNA (z ang. *NCLDV*), w tym wielu wirusów odzwierzęcych. Mogą one stanowić potencjalne zagrożenie dla człowieka, co pokazała ostatnia pandemia koronawirusa, której skutki obecne są do dzisiaj. D9 jest więc idealnym przykładem modelowego enzymu, na którym można badać aktywność wirusowych enzymów dekapujących. A w świetle dostępnych badań, mówiących o istotnej roli w stymulacji replikacji wirusa w organizmie gospodarza [108], identyfikacja inhibitorów hamujących działanie tych enzymów może wspomóc opracowywanie nowych terapii przeciwwirusowych.

Z kolei ludzki enzym DCP2 zidentyfikowany jako główny enzym biorący udział w degradacji mRNA w kierunku 5'→3' jest odpowiedzialny nie tylko za inicjację degradacji komórkowych, ale również egzogennie dostarczonych cząsteczek mRNA, wliczając w to terapeutyczne mRNA. Z tego powodu, związki hamujące aktywność DCP2 mogą znaleźć zastosowanie jako narzędzia biofizyczne w badaniu cyklu życia i aktywności cząsteczek mRNA, np. poprzez selektywną regulację ścieżki degradacji 5'→3'. Ponadto, poszukiwanie inhibitorów DCP2 jest również korzystne w kontekście

modulowania odpowiedzi immunologicznej organizmu[89] czy leczenia schorzeń z grupy chorób mięśniowo-nerwowych [167].

Projekt doktorski można zatem podzielić na dwie części i tak też zostaną opisane wyniki otrzymane w ramach jego realizacji. Część pierwsza obejmuje badania nad wirusowym enzymem dekapującym D9, a druga dotyczy ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2. Łączącym je mianownikiem jest jednak wspólny cel – opracowanie metody, która pozwoli badać każdy z tych enzymów oraz w sposób efektywny poszukiwać ich inhibitorów. Jest to szczególnie ciekawe, ponieważ w literaturze nie ma wielu informacji na ten temat. Zaprezentowane wyniki będą zatem pierwszym fragmentem wypełniającym tę lukę. Plan pracy obu części, który został w sposób graficzny przedstawiony na Rys. 2, w dużej mierze pokrywał się i obejmował:

- opracowanie metody opartej o pomiar intensywności fluorescencji (FLINT) do badania aktywności enzymów dekapujących;
- optymalizację warunków i walidację metody;
- przystosowanie stworzonej metody do formatu wysokoprzepustowego (HTS), co pozwoliłoby wykorzystać ją do badań przesiewowych bibliotek małowymiarowych związków, wśród których znajdowały się inhibitory wcześniej wymienionych enzymów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym;
- dalszą ewaluację zidentyfikowanych inhibitorów poprzez wyznaczenie parametru IC_{50} ;
- potwierdzenie uzyskanych rezultatów inną, niezależną metodą na krótkim substracie RNA.

Wszystkie wyniki zaprezentowane w dalszych częściach tej rozprawy doktorskiej zostały wykonane przez Autorkę niniejszej rozprawy, za wyjątkiem screeningu komercyjnej biblioteki związków LOPAC^{®1280} względem enzymu D9, który został wykonany w ramach pracowni magisterskiej przez mgr Jagodę Beatę Starek, nad którą Autorka sprawowała opiekę w laboratorium oraz badań krystalograficznych enzymu D9, które zostały wykonane przez dr Jessicę Peters z laboratorium prof. Grossa z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco. Sondy fluorescencyjne użyte w prezentowanych badaniach zostały udostępnione Autorce do testów przez dr Renatę Kasprzyk i pochodziły z jej zbiorów, za wyjątkiem sond oznaczonych symbolami **1b** oraz **1c**, które zostały zsyntezowane samodzielnie przez Autorkę - **1b** na podstawie publikacji *Kasprzyk i wsp.* [163], natomiast związek **1c** został opisany w publikacji Autorki [168]. Z kolei związki do badań inhibitorowych pochodziły z kolekcji Laboratorium Chemii Biologicznej CeNT UW oraz Laboratorium Chemii Biofizycznej Wydziału Fizyki UW, chyba że w tekście zaznaczono inaczej.

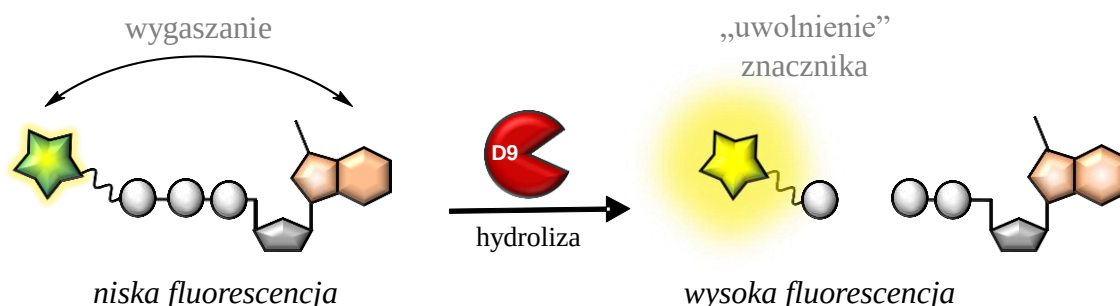
3.2 BADANIA WIRUSOWEGO ENZYMU D9

Celem pierwszej części projektu doktorskiego było opracowanie wysokoprzepustowej fluorescencyjnej metody do badania inhibicji wirusowego enzymu dekapującego D9. Do tej pory niewiele było wiadomo na temat wymagań strukturalnych związków, które hamowałyby aktywność D9. Dotychczasowe badania inhibitorowe opierały się na użyciu izotopowo znakowanych substratów RNA, co wiąże się ze stosunkowo wysokimi kosztami, ale przede wszystkim niską przepustowością badań [92]. Istniała więc realna potrzeba opracowania nowej, efektywnej metody, która w głównej mierze umożliwiłaby badanie aktywności enzymu D9 oraz, w dalszej perspektywie, poszukiwanie jego inhibitorów. Aby osiągnąć ten cel, zdecydowano się na zastosowanie metody opartej na pomiarze intensywności fluorescencji (FLINT) z wykorzystaniem sondy typu *turn-on* [163].

3.2.1 OPTIMALIZACJA STRUKTURY SONDY

Pierwszym i niezwykle istotnym krokiem było wytypowanie sondy fluorescencyjnej o najbardziej optymalnej strukturze do tego typu badań. W podrozdziale 2.4.2 wspomniano już, że związek taki składa się z połączonych za pomocą linkera dwóch części, z których jedna odpowiada za powinowactwo do białkowego obiektu badań, a druga (w tym przypadku znacznik fluorescencyjny) generuje mierzalny sygnał analityczny. Naturalnym substratem dekapującego enzymu D9 są cząsteczki RNA posiadające na końcu 5' strukturę kapu. Zatem ze względu na wysoką specyficzność substratową D9 względem 7-metyloguanozyny, zdecydowano się najpierw przetestować związki zawierające w swojej strukturze właśnie m⁷G. Dzięki zachowaniu takiego fragmentu fizjologicznego oddziaływania, możliwe było uzyskanie wysokiego powinowactwa sondy do celu molekularnego, co jest kluczowe w poszukiwaniu silnych inhibitorów badanego enzymu. Ponadto, w literaturze możemy znaleźć przykłady pokazujące, że zasady azotowe (w tym 7-metyloguanozyna) działają jak „wygaszacze” bogatych w elektrony znaczników fluorescencyjnych, co zaowocowało ich wykorzystaniem w projektowaniu wspomnianych już wcześniej sond typu *turn-on* pochodzenia nukleotydowego. Następną równie istotną kwestią było wybranie odpowiedniego fluorofora. Zdecydowano się przetestować trzy różne znaczniki fluorescencyjne – piren (Py), perylen (Pe) i dipirometen boru (BODIPY-FL). Zasada działania takiej sondy jest następująca (Rys. 25) – w postaci niezhydrolizowanej fluorescencja znacznika jest wygaszana przez 7-metyloguanozynę, a efekt ten wynika z oddziaływania warstwowego (*stacking* π - π) pomiędzy zasadą azotową a fluoroforem, natomiast pod wpływem hydrolizy sondy przez enzym następuje oddalenie fragmentu zawierającego znacznik, co w sposób mierzalny obserwuje się w postaci wzrostu

intensywności fluorescencji. Wybór znacznika jest więc w głównej mierze uwarunkowany występowaniem silnych oddziaływań wygaszających pomiędzy fluoroforem a zasadą.

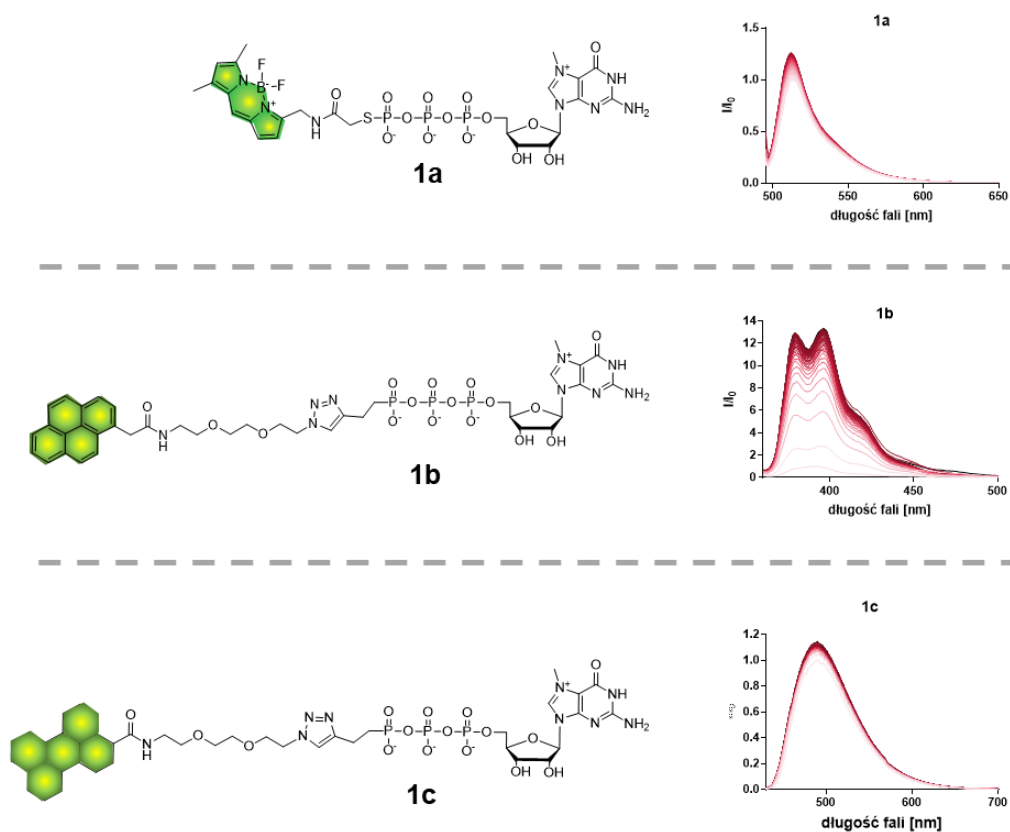


Rys. 25. Zasada działania sondy FLINT typu *turn-on*. Pod wpływem hydrolizy sondy przez enzym następuje zanik oddziaływań wygaszających pomiędzy znacznikiem a zasadą azotową, co skutkuje powrotem mierzalnego sygnału analitycznego w postaci intensywności fluorescencji.

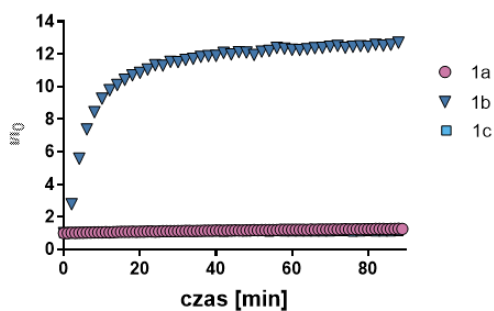
Uwzględniając wszystkie powyższe czynniki, wybrano wstępnie trzy fluorescencyjne znakowane nukleotydy jako potencjalne sondy dla enzymu D9. W celu wytypowania najlepszego z nich sprawdzono, jak zmienia się intensywność fluorescencji na skutek ich hydrolizy enzymatycznej katalizowanej przez D9. Związki w stężeniu 100 nM inkubowano z 50 nM enzymu i rejestrowano widma emisyjne w stałych odstępach czasu aż do całkowitego zaniku zmian fluorescencji (Rys. 26). Jedynie w przypadku sondy znakowanej pirenem, **1b**, można było zaobserwować znaczną zmianę intensywności fluorescencji - stosunek fluorescencji po pełnej hydrolizie (I) do wartości fluorescencji w czasie $t=0$ (I_0) wyniósł ~ 14 , podczas gdy dla dwóch pozostałych związków stosunek ten był niewiele większy od jedności (Rys. 26B). Porównanie względnej kinetyki hydrolizy testowanych sond (Rys. 26C) pokazało, że sondy **1a** oraz **1b** uległy całkowitej hydrolizie w ciągu 40 minut reakcji, natomiast dla związku **1c** proces ten był znacznie wolniejszy i niekompletny nawet po 90 minutach trwania całego pomiaru. Potwierdziło to, że tylko sonda **1b** wykazywała odpowiednie parametry do dalszego rozwoju wysokoprzepustowej metody FLINT.

A

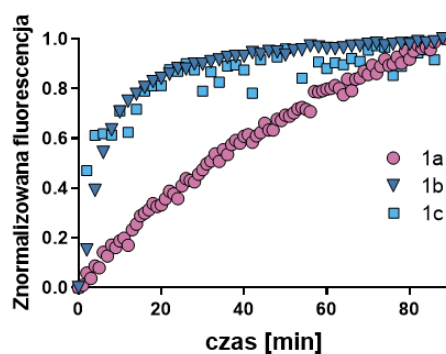
Struktura sondy



B



C

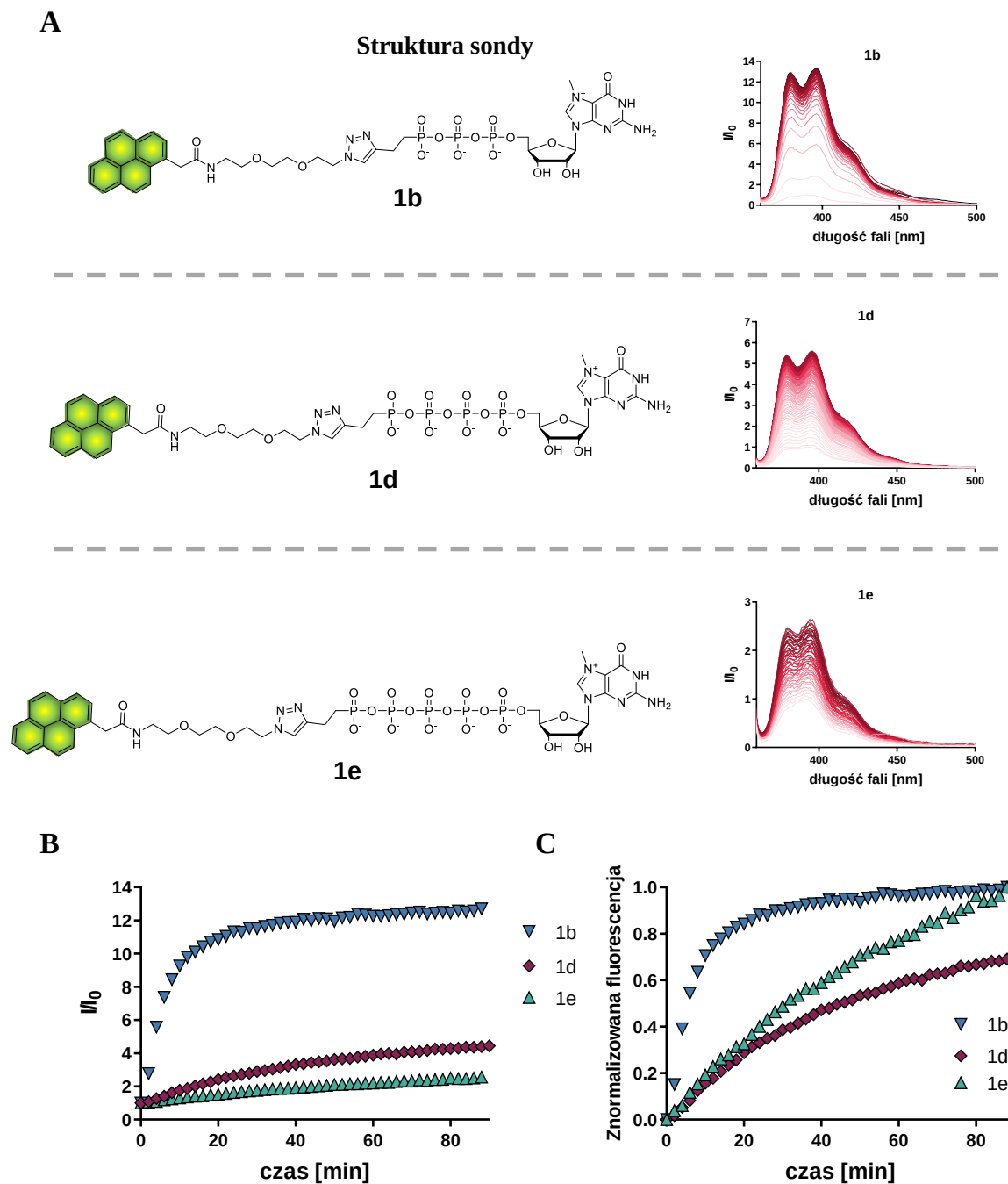


Rys. 26. Wstępna selekcja sondy do badania aktywności enzymu D9. A) Po lewej stronie zaprezentowane zostały struktury sond fluorescencyjnych użytych do badania enzymu D9; z prawej strony znajdują się odpowiadające im zależności zmiany intensywności fluorescencji w czasie. **B) Porównanie zmian intensywności fluorescencji pod wpływem hydrolizy katalizowanej przez D9.** Zmiany monitorowano w maksimum emisji każdej sondy. **C) Względna kinetyka hydrolizy sond.** Aby porównać względną podatność sond na degradację przez D9, dane intensywności fluorescencji dla każdej z nich przedstawione w panelu B zostały znormalizowane do wartości w punkcie czasowym $t=90$ min. Warunki eksperymentu: sondy **1a - 1c** (100 nM) inkubowano w obecności enzymu D9 (50 nM) w 10 mM Tris-HCl pH 7,5 z dodatkiem 100 mM KOAc, 2 mM $MgCl_2$ oraz 0,5 mM $MnCl_2$. Widma emisji fluorescencji rejestrowano z zachowaniem 1-minutowego interwału czasowego przy długości fal wzbudzenia i maksimum emisji: **1a** – 490 nm / 512 nm, **1b** – 345 nm / 378 nm, **1c** – 420 nm / 489 nm.

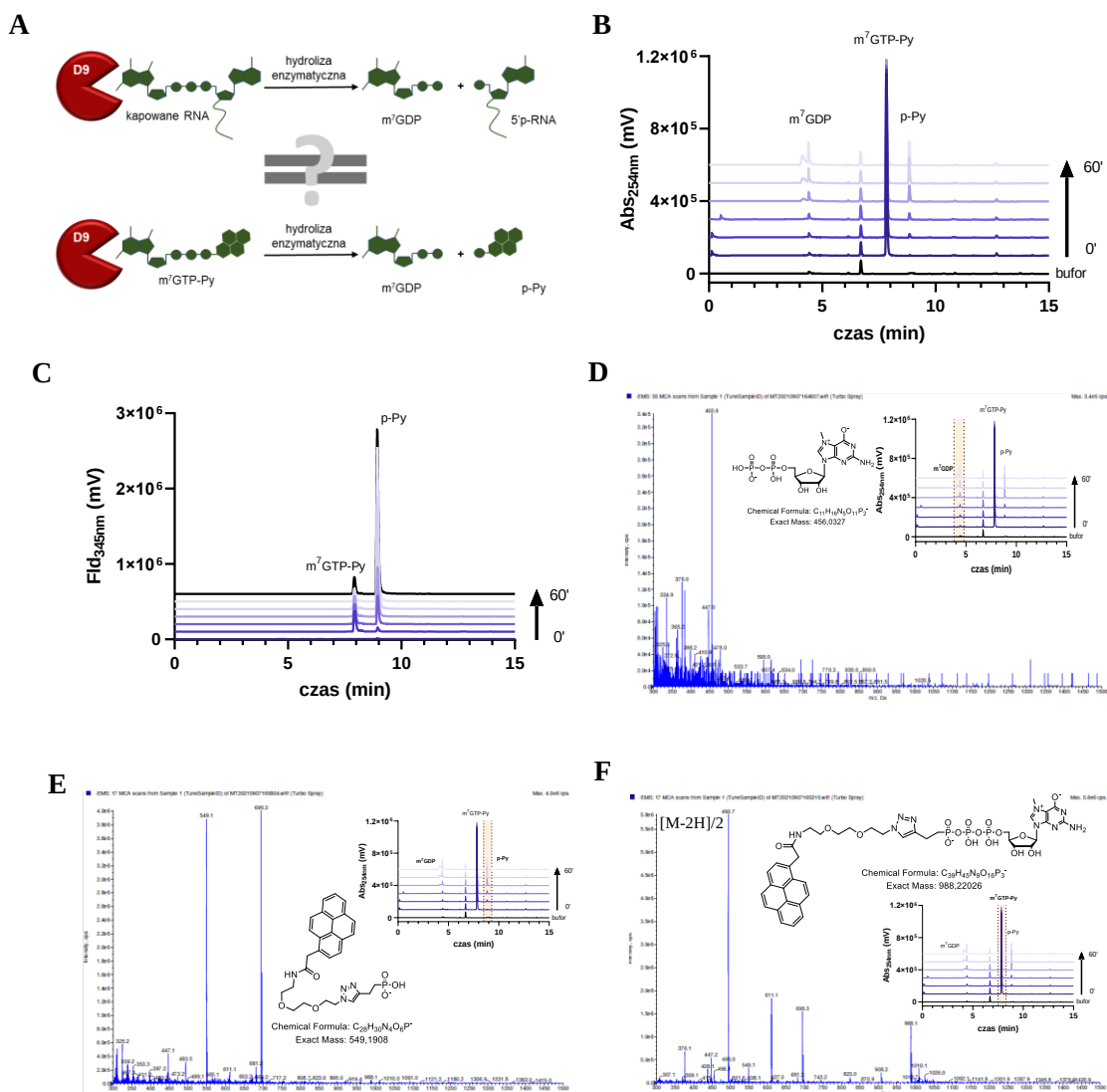
Ponadto, dla wytypowanego znacznika postanowiono również sprawdzić wpływ długości łańcucha polifosforanowego na przebieg hydrolizy katalizowanej przez D9. W tym celu wykonano dodatkowy analogiczny eksperyment dla dwóch sond pirenowych, ale z wydłużonym mostkiem – tetra- i pentaosforanowym (Rys. 27). Zaobserwowano znaczne różnice w wydajności działania sond – odpowiedź układu zmniejszała się wraz z długością oligofosforanu (ponad 14-, 4- i 3-krotne wzmocnienie sygnału fluorescencji odpowiednio dla tri-, tetra- oraz pentaosforanu, Rys. 27B); trifosforan był również najszybciej hydrolizowanym substratem (Rys. 27C). Podsumowując, jedynie dla analogu kapu z przyłączonym znacznikiem pirenowym obserwowano oddziaływania wygaszające, które skutkowały ponad 14-krotnym wzrostem sygnału fluorescencyjnego w trakcie hydrolizy związku katalizowanej przez enzym D9. Porównanie wpływu długości łańcucha polifosforanowego oraz kinetyki hydrolizy testowanych związków na właściwości sondy wykazały, że wraz z wydłużaniem mostka odpowiedź układu maleje, a jednocześnie zmniejsza się też powinowactwo do D9. Bazując na tych spostrzeżeniach, do dalszych badań wybrano znakowany pirenem analog trifosforanu 7-metyloguanozyny, $m^7\text{GTP-Py}$ (**1b**), jako sondę o najbardziej optymalnych właściwościach substratowych i emisyjnych.

Ponieważ $m^7\text{GTP-Py}$ różni się strukturalnie od naturalnych substratów D9 (cząsteczek długiego, kapowanego RNA), sprawdzono, czy mechanizm hydrolizy pozostał podobny (Rys. 28A). W tym celu przeprowadzono hydrolizę enzymatyczną sondy w stężeniu 100 μM w obecności 25 nM enzymu D9, a postęp reakcji monitorowano wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie odwróconych faz, RP-HPLC, z detekcją spektrofotometryczną oraz fluorescencyjną. Rejestrowano profile HPLC, obserwując zanik sygnału absorpcji przy długości fali 254 nm pochodzącego od nukleotydowej sondy oraz pojawianie się sygnału od produktu degradacji, $m^7\text{Gpp}$, o innym czasie retencji oraz wzrost sygnału fluorescencji generowanego przez uwolniony znacznik pirenowy, p-Py (przy długości fali wzbudzenia 345 nm i emisji 378 nm). Dodatkowo, odpowiednie frakcje zawierające produkty hydrolizy sondy zidentyfikowano przy użyciu spektrometrii mas (Rys. 28D-F). Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że wirusowy enzym D9 degraduje sondę pirenową, $m^7\text{GTP-Py}$, hydrolizując wiązanie między fosforanami α/β i uwalniając difosforan 7-metyloguanozyny, $m^7\text{GDP}$, oraz monofosforan reszty cząsteczki, tj. działa dokładnie z taką samą regioselektywnością, jaka występuje w przypadku naturalnych substratów tego enzymu w postaci kapowanego RNA. Umożliwiło to kolejny krok, jakim było wykorzystanie tej sondy do opracowania metody HTS, która pozwoli w sposób jakościowy identyfikować potencjalne inhibitory enzymu D9 w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych dużych bibliotek związków, jak i w sposób ilościowy badać

i porównywać ich potencjał inhibitorowy przez wyznaczenie parametrów oddziaływania związku z białkiem, np. parametru IC_{50} .



Rys. 27. Wpływ długości łańcucha fosforanowego na właściwości sondy pirenowej. A) Struktury sond wraz z odpowiadającymi im zależnościami zmiany intensywności fluorescencji w czasie. **B) Porównanie zmian intensywności fluorescencji pod wpływem hydrolizy katalizowanej przez D9.** Zmiany monitorowano w maksimum emisji sondy. **C) Względna kinetyka hydrolizy sond.** Aby porównać względną podatność sond na degradację przez D9, dane intensywności fluorescencji dla każdej z nich przedstawione w panelu B zostały znormalizowane do wartości w punkcie czasowym $t=90$ min. Warunki eksperymentu: sondy **1b**, **1d**, **1e** (100 nM) inkubowano w obecności enzymu D9 (50 nM) w 10 mM Tris-HCl pH 7,5 z dodatkiem 100 mM KOAc, 2 mM $MgCl_2$ oraz 0,5 mM $MnCl_2$. Widma emisji fluorescencji rejestrowano z zachowaniem 1-minutowego interwału czasowego przy długości fali wzbudzenia i maksimum emisji: 345 nm / 378 nm.



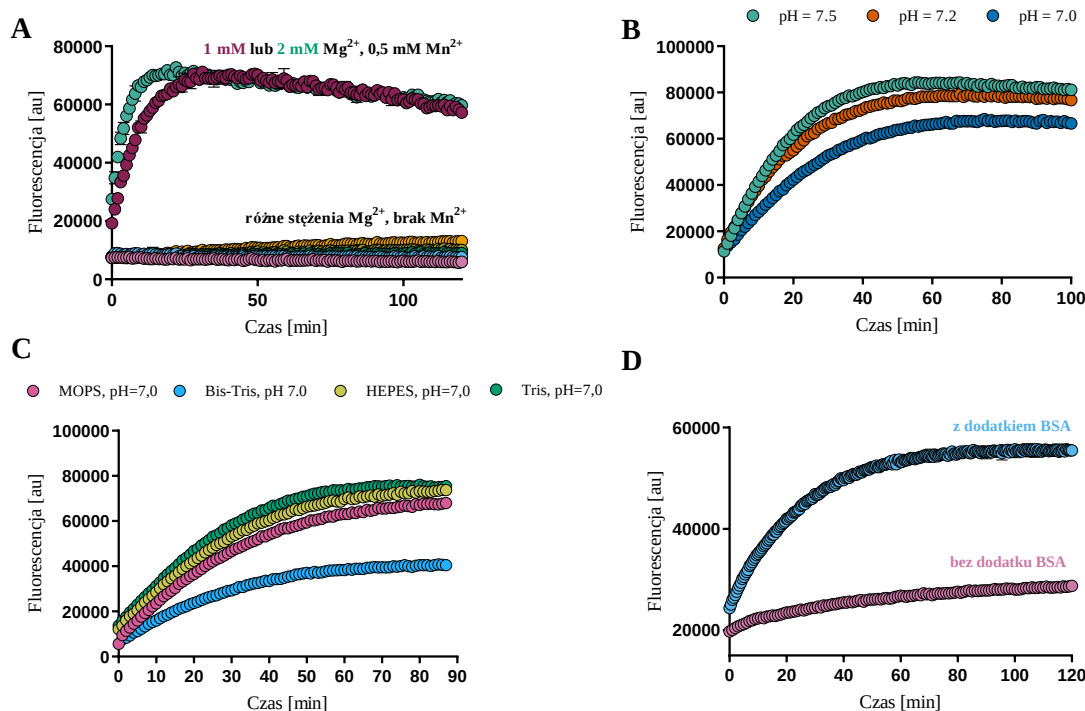
Rys. 28. Monitorowanie hydrolizy sondy $m^7\text{GTP-Py}$ (1b**) katalizowanej przez dekapujący enzym D9 metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej RP HPLC (**B**, **C**) oraz identyfikacja produktów przy użyciu spektrometrii mas LC-MS (**D**, **E**, **F**). **A**) Celem eksperymentu było sprawdzenie, czy regioselektywność degradacji sondy fluorescencyjnej jest taka sama jak w przypadku naturalnych substratów D9. W tym celu inkubowano $100\ \mu\text{M}$ sondy **1b** w obecności $25\ \text{nM}$ enzymu w $10\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7,5 zawierającym $100\ \text{mM}$ KOAc, $2\ \text{mM}$ DTT, $2\ \text{mM}$ MgCl_2 oraz $0,3\ \text{mM}$ MnCl_2 w 30°C i monitorowano postęp reakcji enzymatycznej przy użyciu HPLC w układzie odwróconych faz – w określonych punktach czasowych próbkę reakcji zatrzymywano termicznie, zwirowywano oraz nastrzykiwano na kolumnę. Rejestrowano widmo absorpcji (**B**) i fluorescencji (**C**). Produkty hydrolizy zostały dodatkowo zanalizowane przy użyciu spektrometrii mas w celu określenia masy i zidentyfikowania produktu (**D**, **E**, **F**).**

3.2.2 OPTIMALIZACJA WARUNKÓW REAKCJI

Opracowywana metoda w swoim zamyśle stanowiła kompetycyjny test kinetyczny, w którym testowany związek konkuruje z sondą o miejsce w kieszeni wiążącej enzymu, a identyfikacja potencjalnych inhibitorów następuje w sposób pośredni i opiera się na badaniu ich wpływu na kinetykę reakcji hydrolizy enzymatycznej

m⁷GTP-Py, która jest substratem D9. Z tego względu dość kluczową kwestią było dobranie odpowiednich warunków eksperymentu w taki sposób, żeby monitorowana reakcja nie zachodziła ani zbyt szybko (uniemożliwiłoby to ilościową ocenę właściwości inhibitorowych badanych związków), ani zbyt wolno (pomiar powinien trwać w skończonym i racjonalnym czasie, pozwalającym na wydajne i szybkie badania przesiewowe). Na szybkość katalizowanej reakcji, czyli aktywność enzymu ma wpływ szereg różnych czynników fizykochemicznych. Wśród nich znajdują się m.in. pH, temperatura, skład buforu reakcyjnego, obecność jonów metali czy stężenie substratu. Proces opracowywania metody HTS rozpoczęto zatem od sprawdzenia wyżej wymienionych czynników. Na Rys. 29 przedstawiono wybrane wyniki z procesu optymalizacji, które doprowadziły do wybrania najbardziej optymalnych warunków hydrolizy sondy pirenowej katalizowanej przez enzym D9. Sprawdzone m.in.: jaka jest różnica między wyjściowym poziomem fluorescencji wolnej sondy a tym obserwowanym po dodaniu enzymu i rozpoczęciu pomiaru oraz o ile wzrasta sygnał fluorescencji w trakcie reakcji hydrolizy, tak, żeby okno pomiarowe było jak największe. W literaturze można znaleźć informację, że do pełnej aktywności hydrolitycznej enzym D9 wymaga obecności kofaktorów, których rolę pełnią zazwyczaj jony manganu lub magnezu. We wstępnych eksperymentach spektroskopowych, bazując na danych literaturowych, zastosowano oba te kofaktory jednocześnie. Proces optymalizacji metody wysokoprzepustowej rozpoczęto więc od sprawdzenia, czy jest to konieczne oraz jakie stężenia są najkorzystniejsze dla aktywności enzymu (Rys. 29A). Bardzo istotną kwestią był również wybór odpowiedniego buforu reakcyjnego – parametry takie jak czynnik buforujący, siła jonowa czy pH mogą mieć znaczący wpływ na szybkość katalizowanej reakcji. Zaobserwowano, że zastosowanie niższego pH buforu pozytywnie wpływa na wydłużenie liniowości reakcji w pierwszych minutach po dodaniu enzymu (Rys. 29B) i w dalszej kolejności rozwijano takie właśnie warunki. Wstępne eksperymenty były wykonywane w buforze Tris, jednak pH poniżej wartości 7,5 znajdują się już poniżej dolnej granicy efektywnego buforowania tego roztworu. Z tego powodu sprawdzono również inne czynniki buforujące, które znajdują zastosowanie w biochemii i biologii molekularnej (Rys. 29C). Analizując otrzymane wyniki, od razu odrzucono bufor oparty o Bis-Tris, ponieważ w tym buforze aktywność enzymu była znacząco mniejsza, prawdopodobnie ze względu na kompleksowanie przez niego jonów magnezu i manganu, które są niezbędne do odpowiedniej aktywności białka. Wśród pozostałych buforów udało się jednak znaleźć kilka takich warunków, dla których można było obserwować liniową zależność przez kilkanaście pierwszych minut reakcji. Ostatnią elementem, jaki sprawdzono, był wpływ dodatków w mieszaninie reakcyjnej (Rys. 29D). W literaturze często można znaleźć informację, że dodanie BSA (surowicza albumina wołowa, z ang. *bovine serum albumin*) lub detergentu pomaga zapobiegać przywieraniu badanego białka do powierzchni probówek (ścianek probówek typu Eppendorf czy dołków

na płytce 96-dołkowej), w których wykonuje się eksperymenty, co dodatkowo stabilizuje je, szczególnie jeśli stosowane są one w niskich stężeniach. Dodatkowo, BSA jest często używana jako białko stabilizujące, które minimalizuje niespecyficzne wiązania między składnikami mieszaniny reakcyjnej.



Rys. 29. Optymalizacja metody badawczej – wybrane wyniki. **A)** Wpływ obecności jonów magnezu i manganu na aktywność D9. **B)** Wpływ pH bufora reakcyjnego na przebieg reakcji enzymatycznej. **C)** Wpływ czynnika buforującego na hydrolizę katalizowaną przez D9. **D)** Wpływ obecności BSA na jakość rejestrowanego sygnału.

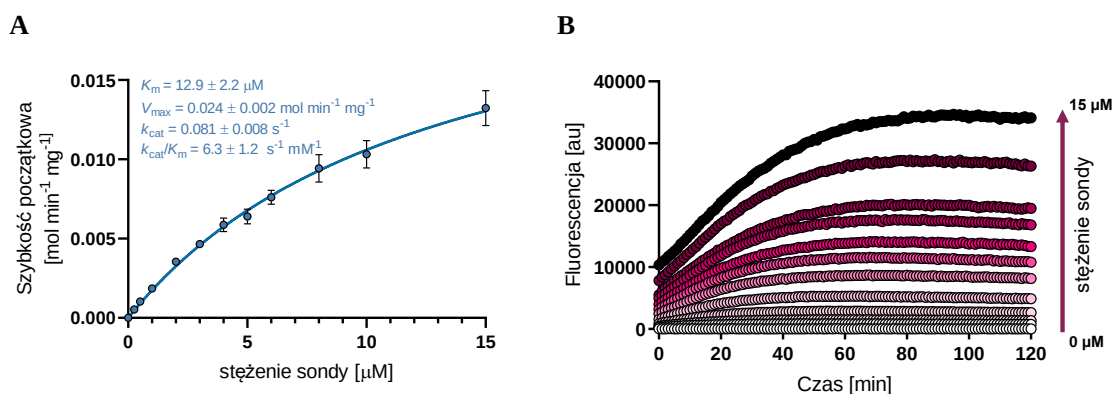
Proces optymalizacji doprowadził do następujących wniosków:

- Jony manganu (Mn^{2+}) w minimalnym stężeniu 0,3 mM okazały się być konieczne do wydajnej aktywności enzymu D9.
- Ostatecznie do dalszych eksperymentów wybrano bufor MOPS o pH 7,0 z dwóch powodów. Po pierwsze, jest to związek o podobnych właściwościach i budowie do HEPESu, który jest bardzo często stosowany jako bufor w badaniach biologicznych, i pH 7,0 jest w środku używalnego zakresu pH tego buforu. Po drugie, MOPS jest analogiem strukturalnym MESu, który z kolei jest podstawą buforu, w którym enzym D9 jest przechowywany i w którym wykazuje on wysoką stabilność.
- Dodatek BSA w mieszaninie reakcyjnej jako białka stabilizującego znacznie polepszył jakość i odtwarzalność wyników oraz zredukował możliwość tworzenia niespecyficznych oddziaływań.

3.2.3 WYZNACZENIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH HYDROLIZY SONDY KATALIZOWANEJ PRZEZ ENZYM D9

W następnej kolejności zbadano kinetykę reakcji hydrolizy sondy $m^7\text{GTP-Py}$ przez enzym D9 oraz wyznaczono parametry kinetyczne tej reakcji, co stanowiło kolejny krok w procesie optymalizacji warunków metody. W tym celu przeprowadzono eksperyment, w którym inkubowano enzym (5 nM) z różnymi stężeniami substratu – sondy pirenowej (0-15 μM), jednocześnie rejestrując intensywność fluorescencji w czasie. Na podstawie otrzymanych danych dla każdego stężenia $m^7\text{GTP-Py}$ wyznaczono szybkość początkową reakcji enzymatycznej, co przedstawiono na Rys. 30. Analizując przebieg reakcji hydrolizy sondy w funkcji jej wzrastającego stężenia, stwierdzono, że można opisać go przy użyciu klasycznego mechanizmu Michaelisa-Menten. W modelu tym obserwuje się początkowo znaczny liniowy wzrost szybkości reakcji wraz ze zwiększaniem się stężenia substratu. Następnie zależność ta „wypłaszcza się” – dalsze dodawanie substratu generuje coraz mniejsze zmiany w szybkości hydrolizy aż do osiągnięcia tzw. prędkości maksymalnej, V_{max} , w której następuje całkowite wysycenie enzymu substratem. Dopasowanie modelu Michaelisa-Menten do danych eksperymentalnych pozwoliło na wyznaczenie parametrów kinetycznych – stałej Michaelisa, K_M , wspomnianej już prędkości maksymalnej, V_{max} , liczby obrotów enzymu (inaczej: stałej katalitycznej enzymu, czyli liczbie moli substratu, która przereagowała w przeliczeniu na jeden mol enzymu w ciągu 1 sekundy), k_{cat} oraz tzw. katalitycznej skuteczności (wydajności) enzymu, k_{cat}/K_M . Wartość K_M sondy $m^7\text{GTP-Py}$ wyniosła $12,9 \pm 2,2 \mu\text{M}$, a k_{cat}/K_M $6,3 \pm 1,2 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Z punktu widzenia optymalizacji metody opartej na pomiarze kinetyki hydrolizy sondy dąży się do najbardziej optymalnych warunków, w których stężenie substratu będzie zbliżone do wartości K_M – pozwala to na skuteczną identyfikację różnych typów inhibitorów – kompetycyjnych, niekompetycyjnych i allosterycznych [169]. Z drugiej jednak strony, czasami zużycie substratu jest czynnikiem limitującym (np. drogi związek, trudna synteza) i istnieje konieczność ograniczenia jego ilości w *assay*’u, jednak nadal przy zachowaniu stężenia zbliżonego do K_M i wystarczająco długiej liniowości przebiegu reakcji w jej początkowej fazie.

Bazując na otrzymanych wynikach analizy kinetycznej reakcji hydrolizy, zachowano wybrane wcześniej stężenie sondy pirenowej do dalszych badań (3 μM) i ostatecznie potwierdzono najbardziej optymalne warunki prowadzenia eksperymentów przy użyciu opracowanej metody HTS (Tabela 1). Wybrane warunki gwarantowały wystarczająco silny sygnał fluorescencji, właściwą kinetykę reakcji, wysoką stabilność białka oraz dobrą powtarzalność otrzymywanych wyników.



Rys. 30. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy sondy $m^7\text{GTP-Py}$ przez enzym D9. **A)** Wykres przedstawia wyznaczone wartości szybkości początkowych reakcji enzymatycznej degradacji sondy pirenowej w funkcji stężenia substratu. Do danych eksperymentalnych dopasowano klasyczny model Michaelisa-Menten i wyznaczono parametry kinetyczne reakcji hydrolizy: K_M , V_{max} , k_{cat} oraz k_{cat}/K_M . Warunki eksperymentu: 5 nM enzymu D9 inkubowano z różnym stężeniem $m^7\text{GTP-Py}$ (0-15 μM) w 10 mM MOPS-HCl pH 7,0, zawierającym 100 mM KOAc, 2 mM MgCl_2 , 0,3 mM MnCl_2 , 2 mM DTT oraz 0,1% BSA. Zaprezentowane dane reprezentują wartości średnie ($\pm \text{SEM}$) obliczone dla trzech niezależnych powtórzeń. **B)** Przykładowe przebiegi reakcji dla różnych stężeń substratu - sondy.

Tabela 1. Zoptymalizowane warunki metody HTS do badania enzymu D9.

Stężenie sondy	3 μM
Stężenie enzymu	5 nM
Bufor reakcyjny	10 mM MOPS-HCl pH 7,0, zawierający 100 mM KOAc, 2 mM MgCl_2 , 0,3 mM MnCl_2 , 2 mM DTT oraz 0,1% BSA
Długość fali wzbudzenia/emisji sondy	345 nm / 378 nm
Temperatura pomiaru	30°C
Pre-inkubacja	15 min, 300 rpm

3.2.4 WALIDACJA METODY

Aby móc zaimplementować zoptymalizowaną metodę do wysokoprzepustowych badań przesiewowych, konieczne jest jej zweryfikowanie, co stanowi niejako kontrolę jakości zaprojektowanej przez nas procedury. Ma to na celu udowodnienie, że stosowana metoda generuje powtarzalne i rzetelne wyniki. Ocena jakości testów przesiewowych stosowanych w procesie odkrywania nowych leków (z ang. *drug discovery*) różni się znacząco od standardowej procedury walidacji metod analitycznych.

W przypadku testów przesiewowych stosuje się zazwyczaj ich ewaluację statystyczną i opiera się ona w głównej mierze na wyznaczeniu kilku parametrów obejmujących

średnią (M , z ang. *mean*) oraz odchylenie standardowe (SD , z ang. *standard deviation*) dla sygnału i tła oraz różne kombinacje tych wartości. Istnieje kilka czynników, które występują w literaturze w kontekście oceny metod HTS, takich jak stosunek sygnału do tła (S/B , z ang. *signal to background ratio*), współczynnik zmienności (CV , z ang. *coefficient of variation*) czy stosunek sygnału do szumu (S/N , z ang. *signal to noise*). Wszystkie wymienione tu parametry niosły jednak za sobą pewne niedoskonałości. Istniała więc potrzeba usystematyzowania tej kwestii. Stało się to pod koniec lat 90 ubiegłego wieku, kiedy to *Zhang i wsp.* opublikowali pracę, w której zaproponowali nowy parametr Z' do walidacji wysokoprzepustowych testów przesiewowych [170], łączący zalety wcześniej wymienionych współczynników i od tamtej pory jest on stosowany jako standardowa miara jakości testów HTS.

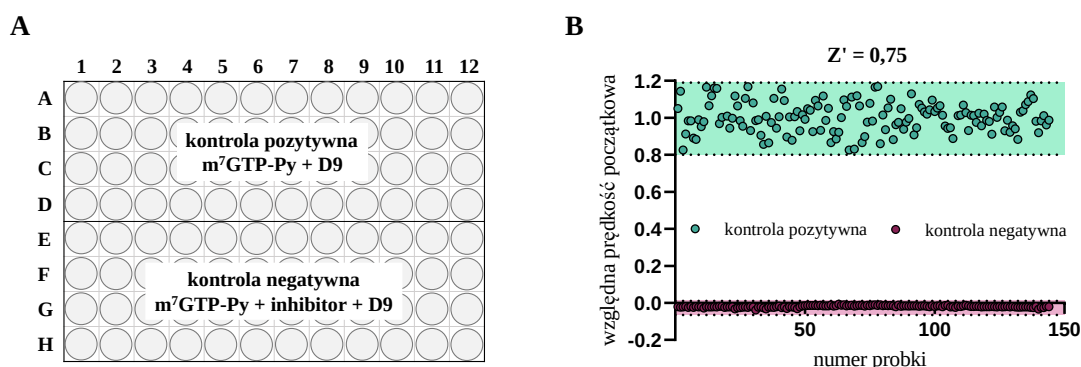
Parametr ten wiąże ze sobą pojęcie okna pomiarowego, czyli miary separacji sygnałów pochodzących od kontroli pozytywnej oraz negatywnej, ze zmiennością mierzonego sygnału i można wyrazić go za pomocą wzoru:

$$Z' = 1 - \frac{3(SD_{pos} + SD_{neg})}{|M_{pos} - M_{neg}|},$$

gdzie: SD_{pos} / SD_{neg} to odchylenie standardowe kontroli pozytywnej / negatywnej, a M_{pos} / M_{neg} to wartości średnie sygnału kontroli pozytywnej / negatywnej. Współczynnik Z' jest bezwymiarowy i teoretycznie może przyjmować wartości mniejsze bądź równe jedności ($-\infty < Z' \leq 1$), choć dla testów HTS ma on sens fizyczny w przedziale od 0 do 1. Ogólnie przyjęta reguła mówi, że wartość parametru równa jedności odpowiada testowi idealnemu, a kryterium wysokoprzepustowości dla testu jest spełnione przy wartościach Z' większych od 0,5.

Pod względem technicznym eksperyment w celu wyznaczenia parametru Z' wyglądał następująco: przygotowano kilka płytek 96-dołkowych, których połowa wypełniona jest kontrolami pozytywnymi, a druga połowa - kontrolami negatywnymi (Rys. 31A). Jako kontrolę pozytywną rozumiemy maksymalny możliwy do uzyskania sygnał, w tym przypadku była to reakcja 3 μM sondy m^7GTP -Py z 5 nM enzymu D9. Natomiast kontrola negatywna, czyli najniższy możliwy sygnał stanowiący tło pomiaru, to analogiczna reakcja, ale w całości zahamowana przez inhibitor (w tym celu został użyty m^7GTP w stężeniu 100 μM). Następnie rejestrowano zmiany intensywności fluorescencji w czasie 144 próbek z każdej grupy, dla każdej z nich wyznaczono względną prędkość początkową reakcji, co przedstawiono na Rys. 31B, oraz obliczono wartości średnie i odchylenia standardowe (

Tabela 2) niezbędne do wyznaczenia parametru statystycznego. Obliczony w ten sposób współczynnik Z' wyniósł 0,75, co pozwala zastosować tę metodę w wysokoprzepustowych badaniach HTS.



Rys. 31. Ocena jakościowa kompetycyjnego testu kinetycznego służącego do poszukiwania inhibitorów enzymu D9 - wyznaczanie parametru Z' . A) Schemat płytki eksperymentalnej. Kontrola pozytywna: 3 μ M m⁷GTP-Py, 5 nM D9; kontrola negatywna: 3 μ M m⁷GTP-Py, 5 nM D9 w obecności inhibitora – 100 μ M m⁷GTP; B) Graficzne przedstawienie oceny jakościowej metody.

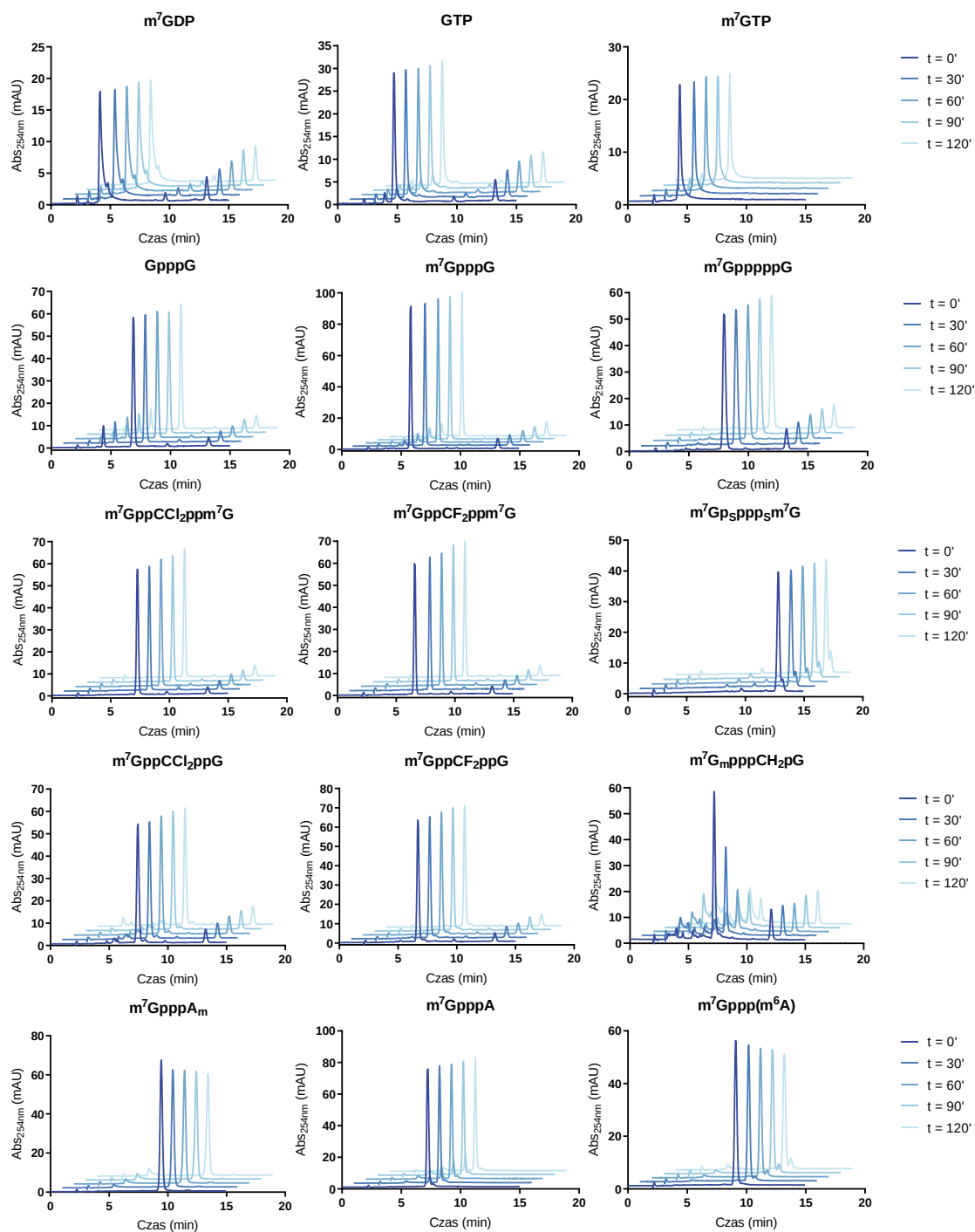
Tabela 2. Wartości średnich oraz odchyleń standardowych dla kontroli pozytywnej i negatywnej.

	kontrola pozytywna	kontrola negatywna
średnia, M	1,002	-0,020
odchylenie standardowe, SD	0,081	0,005

3.2.5 BADANIA INHIBITOROWE BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW NUKLEOTYDOWYCH

Po zweryfikowaniu jakości zaprojektowanej metody, została ona wykorzystana do scharakteryzowania niewielkiej biblioteki związków pochodzenia nukleotydowego. Celem tego eksperymentu było określenie preferencji strukturalnych enzymu względem związków hamujących jego aktywność. Biblioteka została skompletowana ze związków Laboratorium Chemii Biologicznej i Laboratorium Chemii Biofizycznej otrzymanych na przestrzeni kilku lat i składała się z 48 niemodyfikowanych mono-, di- i trinukleotydów oraz ich analogów. Dodatkowo, eksperyment ten był dodatkową formą weryfikacji poprawności działania metody przed bardziej wysokoprzepustowymi badaniami przesiewowymi. Ponieważ testowane związki strukturalnie przypominają fragment naturalnych substratów enzymu D9, sprawdzono podatność wybranych nukleotydów na hydrolizę przez D9 przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC). W tym celu wybrano zestaw 15 związków o różnych modyfikacjach i inkubowano z enzymem przez 2 godziny. Warunki inkubacji zostały nieco zmienione (skład buforu, stężenia testowanego związku i enzymu), aby były kompatybilne

z wybraną metodą analizy. W określonych punktach czasowych reakcji enzymatycznej (w 30, 60, 90 oraz 120 minucie), pobierano próbkę, reakcję zatrzymywano przez termiczną dezaktywację enzymu i analizowano za pomocą RP-HPLC. Większość związków nie ulegało hydrolizie w tych warunkach, a inne hydrolizowały w bardzo nieznacznym stopniu podczas początkowych 30 min reakcji enzymatycznej (Rys. 32, Tabela 3), co umożliwiło zbadanie ich własności inhibitorowych opracowaną metodą.

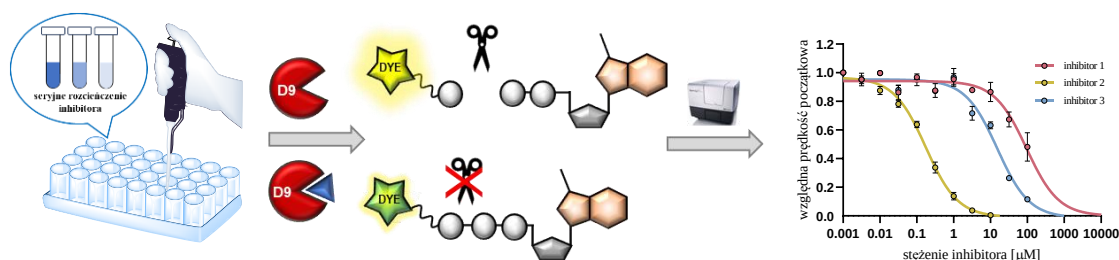


Rys. 32. Chromatogramy przedstawiające podatność na hydrolizę przez enzym D9 wybranych analogów kapu.

Tabela 3. Podatność badanych związków na hydrolizę przez enzym D9. „Niehydrolizowany” oznacza, że procent przereagowania substratu po 30 minutach trwania reakcji nie przekroczył 5%.

Badany związek	Podatność na hydrolizę przez D9 (% przereagowania substratu po 30 min reakcji)
m⁷GDP	niehydrolizowany
GTP	niehydrolizowany
m⁷GTP	niehydrolizowany
GpppG	niehydrolizowany
m⁷GpppG	niehydrolizowany
m⁷GppppG	niehydrolizowany
m⁷GppCCl₂ppG	niehydrolizowany
m⁷GppCCl₂pp(m⁷G)	niehydrolizowany
m⁷GppCF₂ppG	niehydrolizowany
m⁷GppCF₂pp(m⁷G)	niehydrolizowany
m⁷Gpsppps(m⁷G)	niehydrolizowany
m⁷G_mpppCH₂pG	hydrolizowany (58%)
m⁷GpppA	hydrolizowany (7%)
m⁷GpppA_m	niehydrolizowany
m⁷Gppp(m⁶A)	niehydrolizowany

Schemat działania metody przedstawiono na Rys. 33 i wyglądał on następująco – na płytce 96-dołkowej przygotowano seryjne rozcieńczenia potencjalnych inhibitorów (zastosowano rozcieńczenia w skali półlogarytmicznej, gdzie każde kolejne stężenie badanego związku było 3,16 razy mniejsze od poprzedniego, startując od stężenia 100 μ M aż do stężenia 3,16 nM) w buforze reakcyjnym i w obecności sondy m⁷GTP-Py, a następnie dodawano enzymu D9. Rejestrowany rosnący sygnał fluorescencji w czasie analizowano, wyznaczając wartości prędkości początkowych dla pierwszych 10 minut trwania reakcji hydrolizy sondy dla każdego stężenia inhibitora. Unormowane do prędkości reakcji bez inhibitora dane przedstawiono na wykresie w funkcji stężenia inhibitora. Korzystając z programu GraphPad Prism do danych eksperymentalnych dopasowano odpowiedni model inhibicji i wyznaczono wartości parametru *IC*₅₀, czyli stężenia hamującego, dla którego szybkość reakcji hydrolizy sondy pirenowej przez enzym jest dwukrotnie mniejsza niż szybkość pod nieobecność inhibitora. W ten sposób wyznaczono wartości parametru *IC*₅₀ dla wszystkich związków z biblioteki nukleotydowej (Rys. 34, Tabela 4).



Rys. 33. Schemat metody FLINT do ewaluacji potencjalnych inhibitorów. Właściwości inhibitorowe związków wyselekcjonowanych z wysokoprzepustowych badań przesiewowych są następnie dokładniej charakteryzowane poprzez wyznaczenie parametru IC_{50} .

Wyznaczone wartości IC_{50} wahały się od 0,077 μM do ponad 100 μM . Najsilniejsze inhibitory enzymu D9 (IC_{50} poniżej 1 μM , Rys. 34B-C) zidentyfikowano wśród mononukleotydów zawierających $m^7\text{G}$ oraz trzy lub więcej grup fosforanowych, co wskazuje, że zarówno dodatnio naładowana 7-metyloguanozyna, jak i ujemnie naładowany mostek fosforanowy są wymagane do silnego oddziaływania z białkiem. Dinukleotydowe analogi kapu z reguły wykazywały słabsze właściwości inhibitorowe (IC_{50} od 2,6 do 46 μM), ale stosunkowo silną inhibicję obserwowano dla kilku dinukleotydowych 5',5'-tetrafosforanów, w tym $m^7\text{G}_{\text{mppp}}\text{CH}_2\text{pG}$ ($IC_{50} = 2,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$) oraz $m^7\text{G}_{\text{psppps}}m^7\text{G}$ D3 ($IC_{50} = 3,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$); ten ostatni został wcześniej zidentyfikowany jako inhibitor drożdżowego enzymu dekapującego SpDcp1/Dcp2 [156]. Najsilniej działającym związkiem w grupie trinukleotydów był $m^7\text{G}_{\text{mppp}}\text{G}_{\text{mp}}\text{G}$ z wartością IC_{50} wynoszącą $\sim 4 \mu\text{M}$. Co ciekawe, zarówno w grupie dinukleotydów, jak i trinukleotydów, dodatkowa metylacja w pozycji 2'-O rybozy 7-metyloguanozyny wyraźnie zwiększała właściwości inhibitorowe, co sugeruje, że modyfikacja w tym miejscu rybozy może zwiększać powinowactwo do D9. Jednocześnie związek $m^7\text{G}_{\text{mppp}}\text{G}_{\text{mp}}\text{G}$ wykazywał również największą podatność na hydrolizę przez D9 (Rys. 32), co również potwierdza hipotezę, że jest to efekt związany z silnym wiązaniem się z białkiem.

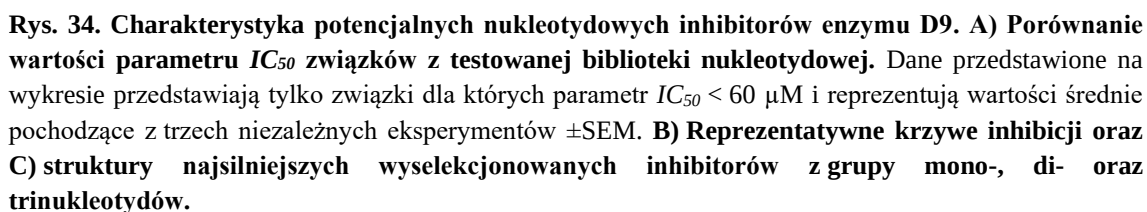


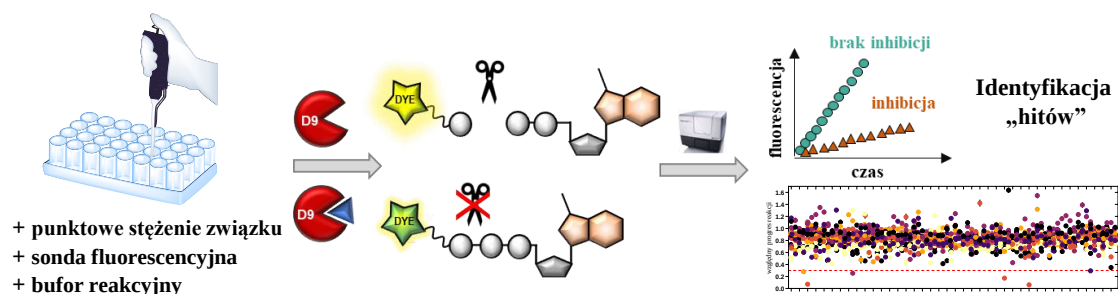
Tabela 4. Zestawienie wartości parametru IC_{50} serii nukleotydowych inhibitorów enzymu D9. Przedstawione dane są wartościami średnimi z trzech niezależnych eksperymentów $\pm$ SEM.

Lp.	Związek	IC_{50} [μ M]	Lp.	Związek	IC_{50} [μ M]
mononukleotydy			dinukleotydy		
1.	m ⁷ GMP	b.d (>>100)	24.	m ⁷ GppCCl ₂ ppm ⁷ G	28,8 $\pm$ 4,1
2.	m ⁷ GDP	14,2 $\pm$ 2,4	25.	m ⁷ GppCCppG	24,4 $\pm$ 4,0
3.	m ⁷ GDP α S D1	8,3 $\pm$ 1,7	26.	m ⁷ GppppppG	13,9 $\pm$ 2,5
4.	m ⁷ GDP α S D2	7,6 $\pm$ 1,2	27.	m ⁷ GpppA	33,0 $\pm$ 5,9
5.	m ⁷ GTP	0,77 $\pm$ 0,06	28.	GpppA	b.d
6.	GTP	15,4 $\pm$ 2,7	29.	m ⁷ GpppA _m	19,8 $\pm$ 3,6
7.	m ⁷ GTP α S	0,64 $\pm$ 0,06	30.	m ⁷ Gppp(m ⁶ A)	31,5 $\pm$ 5,9
8.	m ⁷ GpCH ₂ pp	0,58 $\pm$ 0,06	31.	Gpp-triazole-m ⁷ G	b.d
9.	m ⁷ GppCH ₂ p	1,1 $\pm$ 0,1	32.	Gppp-triazole-m ⁷ G	35,0 $\pm$ 5,3
10.	m ⁷ GpppCH ₂ p	0,077 $\pm$	33.	Gppp-SCH ₂ -triazole-m ⁷ G	b.d
dinukleotydy			34.	m ⁷ Gpp-triazole-G	17,5 $\pm$ 2,6
11.	m ⁷ GpppG	11,3 $\pm$ 1,9	35.	m ⁷ Gpp-SCH ₂ -triazole-G	46,0 $\pm$ 6,8
12.	GpppG	b.d (>>100)	36.	Gpp-SCH ₂ -triazole-m ⁷ G	b.d
13.	m ^{7,3'} O GpppG	10,6 $\pm$ 1,1	37.	m ⁷ Gppp-SCH ₂ -triazole-G	24,9 $\pm$ 4,8
14.	m ⁷ Gppp ^{6S} G	14,1 $\pm$ 1,7	38.	ApppA	b.d
15.	m ⁷ G _m ppp ^{6S} G	7,2 $\pm$ 1,1	39.	Ap _s ppsA	b.d
16.	m ⁷ G _N pppG	32,1 $\pm$ 5,9	trinukleotydy		
17.	m ⁷ GpCH ₂ ppG	16,8 $\pm$ 3,3	40.	m ⁷ GpppApG	11,3 $\pm$ 2,0
18.	m ⁷ Gpppm ⁷ G	14,3 $\pm$ 2,1	41.	m ⁷ Gppp(m ⁶ A)pG	16,9 $\pm$ 3,2
19.	m ⁷ Gp _s ppp _s m ⁷ G	3,6 $\pm$ 0,4	42.	m ⁷ Gppp (m ⁶ A _m)pG	17,4 $\pm$ 3,0
20.	m ⁷ G _m pppCH ₂ pG	2,6 $\pm$ 0,4	43.	m ⁷ GpppA _m pG	20,4 $\pm$ 3,4
21.	m ⁷ GppCF ₂ ppG	16,7 $\pm$ 3,1	44.	m ⁷ GppCH ₂ pApG	27,4 $\pm$ 6,2
22.	m ⁷ GppCCl ₂ ppG	41,4 $\pm$ 6,6	45.	m ⁷ GpppG _m pG	12,0 $\pm$ 2,4
23.	m ⁷ GppCF ₂ ppm ⁷ G	14,7 $\pm$ 2,6	46.	m ⁷ G _m pppG _m pG	3,9 $\pm$ 0,5

b.d – brak danych (parametru IC_{50} nie wyznaczano ze względu na słabe właściwości inhibitorowe danego związku, $IC_{50}>>100$)

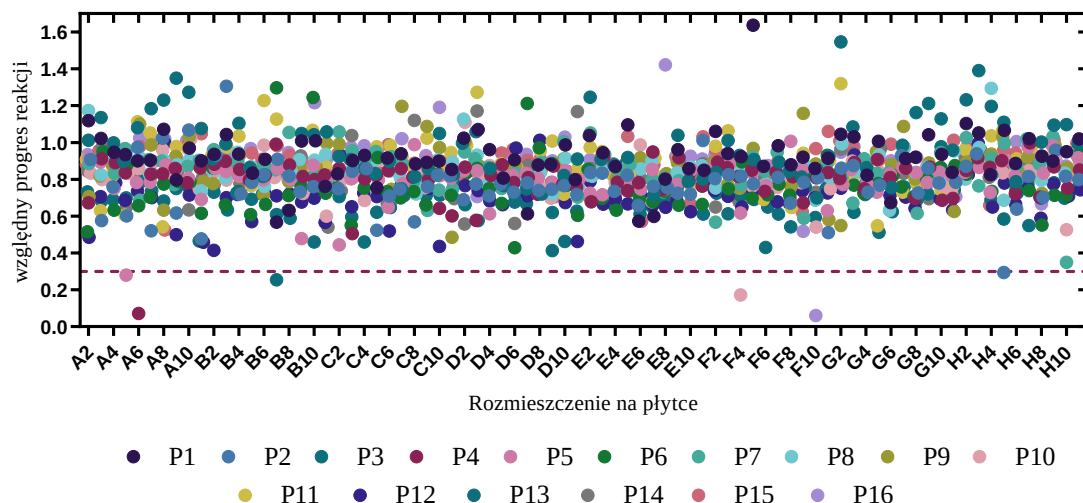
3.2.6 WYSOKOPRZEPUSTOWE BADANIA PRZESIEWOWE KOMERCYJNEJ BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW LOPAC^{®1280}

W kolejnym etapie badań zastosowano opracowaną metodę do wysokoprzepustowych eksperymentów przesiewowych (HTS). W tym celu przebadano komercyjnie dostępną bibliotekę związków farmakologicznie czynnych, LOPAC^{®1280} (Library of Pharmacologically Active Compounds, Sigma-Aldrich). Badania przesiewowe (z ang. *screening*) bibliotek związków są rutynowo wykonywane przez firmy farmaceutyczne w procesie opracowywania nowych leków w celu identyfikacji potencjalnych substancji czynnych, które są następnie dalej rozwijane. Dzięki temu w szybki sposób można spośród setek i tysięcy związków wyselekcjonować te oddziałujące z wybranym celem molekularnym. Biblioteka LOPAC^{®1280} to kolekcja 1280 małowartościowych związków o potwierdzonej aktywności biologicznej. Wśród nich znajdują się zarówno inhibitory i ligandy różnych białek, związki rozwijane przez koncerny farmaceutyczne, ale odrzucone na różnych etapach badań klinicznych, jak i już zatwierdzone leki.



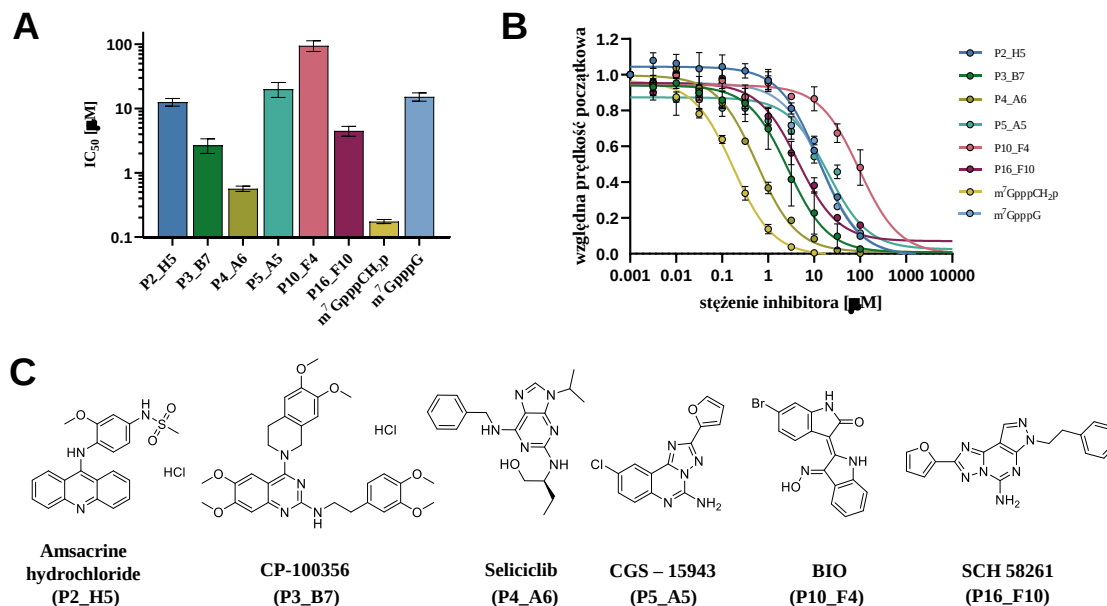
Rys. 35. Schemat działania metody w trybie HTS do identyfikacji inhibitorów enzymu D9.

Wykorzystanie opracowanej metody do wysokoprzepustowych badań przesiewowych (w trybie HTS) różni się nieco w porównaniu do wyznaczania przez nią parametru IC_{50} , co zobrazowano na Rys. 35 – związki testuje się przy jednym wybranym stężeniu (stężenie punktowe). Związki z biblioteki LOPAC^{®1280} były badane w stężeniu 30 μ M w warunkach podanych w Tabeli 1. Względny progres reakcji dla każdego związku obliczano normalizując początkową szybkość reakcji w obecności badanego związku do początkowej szybkości bez obecności żadnego inhibitora (Rys. 36). Kryterium odcięcia dla dalszej selekcji związków jako potencjalnych inhibitorów ustalono na 30% maksymalnej szybkości początkowej (linia kropkowana), co dało sześć potencjalnych trafień (tzw. *hitów*, z ang. *hit* – trafienie, celny strzał).



Rys. 36. Wyniki badania przesiewowego biblioteki LOPAC^{®1280} względem wirusowego enzymu D9.

Wyłonione w eksperymentach przesiewowych *hity* poddano dalszej ocenie, w tym określeniu ich wartości IC_{50} (Rys. 37A-B). Trzy najsilniejsze związki miały wartość IC_{50} poniżej 10 μM i były to: pochodna adeninowa Seliciclib ($IC_{50} = 0,57 \pm 0,05 \mu M$), pochodna chinazolinowa CP-100356 ($IC_{50} = 2,7 \pm 0,7 \mu M$) oraz pochodna purynowa SCH 58261 ($IC_{50} = 4,5 \pm 0,8 \mu M$) (Rys. 37C).



Rys. 37. Ewaluacja najlepszych związków wyselekcjonowanych z badań przesiewowych komercyjnej biblioteki LOPAC^{®1280}. A) Porównanie wartości parametru IC_{50} sześciu związków wytypowanych z badania HTS (parametr odcięcia – 30% względnego postępu reakcji). Zaprezentowane dane są wartościami średnimi $\pm$ SEM pochodzącymi z trzech niezależnych eksperymentów. B) Reprezentatywne krzywe inhibicji oraz C) struktury najlepszych inhibitorów enzymu D9.

Tabela 5. Zestawienie wartości IC_{50} wyznaczonych opracowaną metodą FLINT dla 6 związków wyselekcjonowanych z badań przesiewowych biblioteki LOPAC^{®1280}. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów $\pm$ SEM.

Lp.	Symbol	Nazwa	IC_{50} [μ M]
1.	P2H5	Amsacrine hydrochloride	13 ± 2
2.	P3B7	CP-100356	$2,7 \pm 0,7$
3.	P4A6	Seliciclib	$0,57 \pm 0,05$
4.	P5A5	CGS-15943	20 ± 5
5.	P10F4	BIO	95 ± 18
6.	P16F10	SCH 58261	$4,5 \pm 0,8$

3.2.7 WERYFIKACJA WYNIKÓW NIEZALEŻNĄ METODĄ NA KRÓTKIM SUBSTRACIE RNA

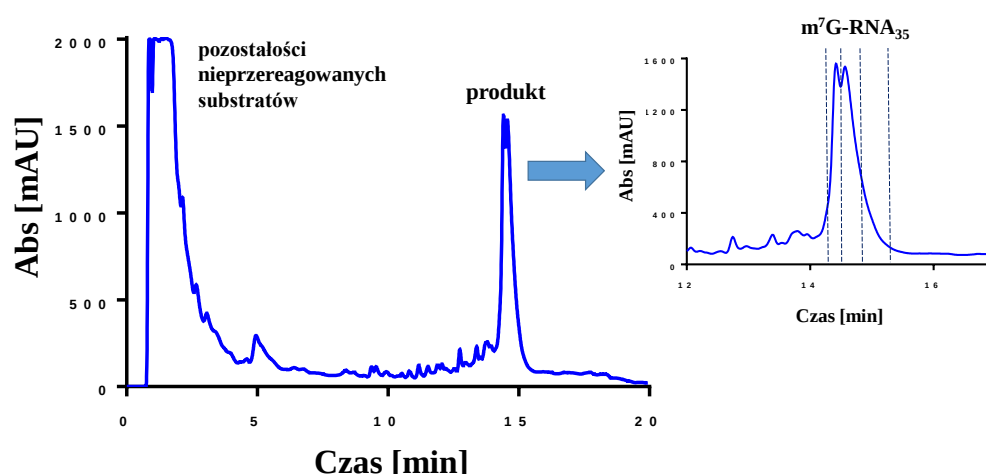
Kolejnym potwierdzeniem wiarygodności opracowanej przeze mnie metody była weryfikacja otrzymanych wyników inną, niezależną metodą badawczą. W tym celu sprawdzono, czy trzy najsilniejsze inhibitory małocząsteczkowe zidentyfikowane w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych komercyjnej biblioteki LOPAC^{®1280} oraz najlepszy inhibitor pochodzenia nukleotydowego hamują katalizowany przez D9 dekaping krótkich, kapowanych transkryptów RNA.

3.2.7.1 PRZYGOTOWANIE TRANSKRYPTÓW RNA

Źródłem substratów RNA była reakcja *in vitro* transkrypcji (z ang. *in vitro transcription*, IVT). Jest to najpowszechniejsza metoda otrzymywania zarówno krótkich fragmentów RNA, jak i kodujących cząsteczek mRNA pełnej długości. Polega ona na syntezie łańcucha oligonukleotydowego przez polimerazę RNA na liniowej matrycy DNA (która zawiera sekwencję promotorową odpowiednią dla danej polimerazy). Dobudowywanie kolejnych zasad azotowych odbywa się poprzez tworzenie wiązania fosfodiesterowego oraz z zachowaniem reguły komplementarności. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu enzymy pochodzące z bakteriofagów: SP6 lub T7, a ich substratami w tej reakcji są trifosforany nukleotydów (ATP, UTP, CTP, GTP).

Aby uzyskać krótkie fragmenty kapowanego RNA do testu inhibitorów enzymu D9, przeprowadzono reakcję IVT w następujący sposób – przygotowano mieszaninę nukleotydów (UTP, CTP, GTP w końcowym stężeniu 5 mM oraz ATP – 1,25 mM), analogu kapu m⁷GpppApG (5/6,5 mM), matrycy DNA (1 μ M) oraz inhibitora RNaz (Ribolock[™], 1U/ μ L) w buforze reakcyjnym (40 mM Tris-HCl pH 7,9, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM NaCl oraz 2 mM spermidyna). Reakcję suplementowano dodatkowo 20 mM MgCl₂ w celu polepszenia wydajności reakcji transkrypcji. Do tak przygotowanej mieszaniny dodano polimerazy T7 (20 U/ μ L) i inkubowano reakcję

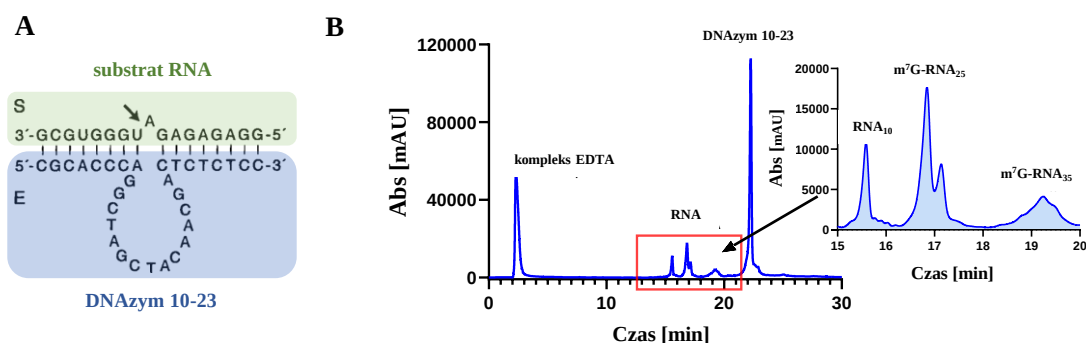
w 37°C przez 4 godziny. Następnie do reakcji dodano enzymu, Dnazy I (7 U), którego zadaniem było zdegradowanie matrycy DNA i pozostawiono na kolejne 30 min. Po tym czasie reakcję zastopowano poprzez skompleksowanie jonów magnezu niezbędnych do aktywności polimerazy, dodając roztwór Na₂EDTA, oraz rozcieńczając ją wodą. Surową reakcję poddano wstępnemu oczyszczaniu w celu pozbycia się zanieczyszczeń białkowych, przeprowadzając ekstrakcję mieszaniną fenolu i chloroformu oraz strącając przy użyciu octanu sodu. Tak przygotowaną próbkę RNA o długości 35 nukleotydów (35 nt) poddano następnie oczyszczaniu przy użyciu RP-HPLC (Rys. 38).



Rys. 38. Przykładowy chromatogram pochodzący z oczyszczenia RNA o długości 35 nukleotydów przy użyciu RP-HPLC. Najpierw z kolumny eluowane są pozostałości nieprzereagowanych substratów oraz krótsze RNA. Oczekiwany produkt RNA charakteryzuje się czasem retencji ok. 15 minuty. Na powiększeniu można zauważyć, że są to przynajmniej dwa nakładające się piki różniące się długością wynikającą z heterogenności na końcu 3' transkryptu lub obecnością wbudowanego kapu na końcu 5'. Warunki oczyszczania - kolumna: Clarity®3μM Oligo-RP, 150 x 4,6 mm; eluent A: 50 mM octan trietyloamoniowy (TEAA), eluent B: 75% acetonitryl (ACN); gradient: od 5% do 12,5% eluentu B w 5-20 min; przepływ: 1 mL/min; T=25°C.

Ponieważ otrzymane transkrypty są dość heterogenne pod względem długości na końcu 3' nici nukleotydowej, przeprowadzono reakcję ich trawienia DNazymem 10-23. DNazy (czy też deoksyrybozomy lub enzymy DNA) to jednoniciowe cząsteczki DNA o długości kilkudziesięciu nukleotydów posiadające funkcję katalizowania różnych reakcji chemicznych, w tym hydrolizy kwasów nukleinowych. Zbudowane są zazwyczaj z dwóch części – ramion wiążących substrat na zasadzie komplementarności Watsona-Cricka oraz pętli katalitycznej, która odpowiada za jego aktywność hydrolityczną (Rys. 39A). DNazym 10-23 jest znany w literaturze od przeszło 20 lat [171] i może hydrolizować substraty RNA o praktycznie dowolnej sekwencji, jeśli w miejscu cięcia występuje bezpośrednie połączenie zasad puryna-pirymidyna. W przypadku badanych w tej rozprawie krótkich sekwencji 35-nukleotydowych, DNazym10-23 odcina ok.10-nukleotydowy fragment na końcu 3'

RNA, w wyniku czego powstają produkty o długości 25 (niekapowane) lub 26 (kapowane) nukleotydów. Mieszaninę ponownie oczyszczono przy użyciu RP-HPLC (Rys. 39B), aby wyizolować finalny produkt gotowy do dalszych badań.

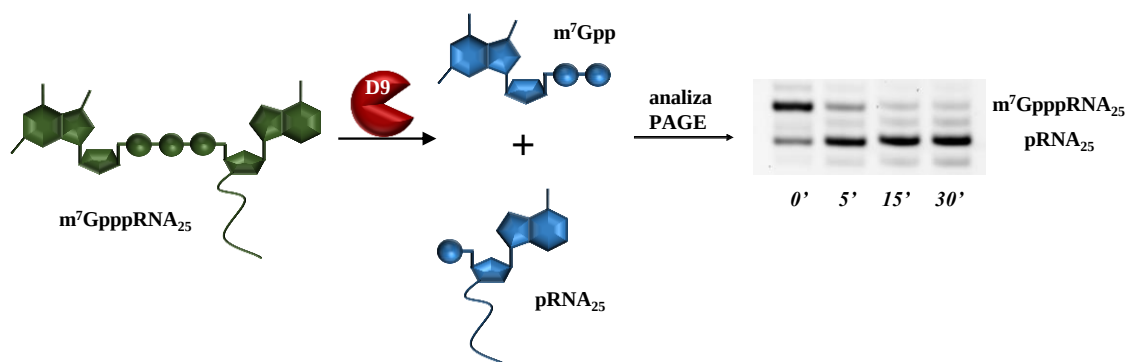


Rys. 39. Trawienie końca 3' transkryptu Dnazymem 10-23. A) Struktura oraz schemat działania Dnazymu 10-23. Dwa ramiona dnazymu (E) są komplementarne do fragmentu substratu RNA (S). Hydroliza następuje w miejscu, które wskazuje strzałka. Rysunek zaczerpnięto z publikacji *Santoro i Joyce* [171]. **B) Przykładowy chromatogram pochodzący z oczyszczania reakcji trawienia końca 3' RNA.** Oczekiwany produkt eluowany jest z kolumny ok. 17 minut. Warunki oczyszczania - kolumna: Clarity®3μM Oligo-RP, 150 x 4,6 mm; eluent A: 100 mM octan trietyloamoniowy (TEAA), eluent B: 100 mM octan trietyloamoniowy/acetonitryl 1:1 (TEAA/ACN, v/v); gradient: od 10% do 30% eluentu B w 30 min; przepływ: 1 mL/min; T=25°C.

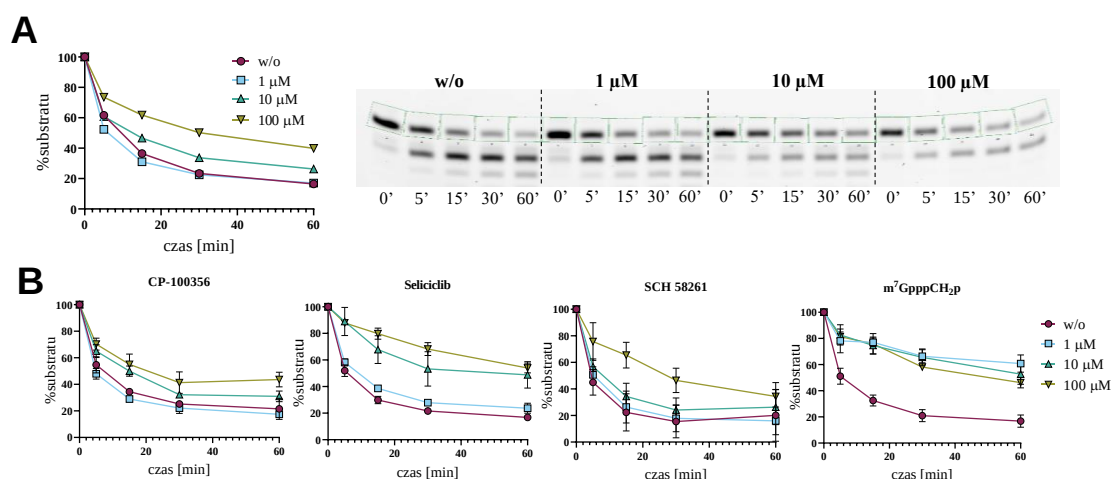
3.2.7.2 POTWIERDZENIE WŁAŚCIWOŚCI INHIBITOROWYCH

WYSELEKCJONOWANYCH ZWIĄZKÓW W TEŚCIE *IN VITRO* DEGRADACJI RNA

Substrat RNA o długości 26 nukleotydów zawierający na końcu 5' strukturę m⁷GpppApG (struktura *kapu 0*) poddano hydrolizie przez enzym D9 w obecności zidentyfikowanego inhibitora w trzech różnych stężeniach (1, 10, 100 μM). Postęp hydrolizy substratu analizowano elektroforetycznie w odniesieniu do reakcji przeprowadzonej przy braku inhibitora (Rys. 40). Intensywności prążków odpowiadających kapowanemu i „zdekapanemu” (czyli pozbawionemu struktury *kapu* na końcu 5') RNA były kwantyfikowane densytometrycznie, a rozkład substratu wykreślono w funkcji czasu (Rys. 41). Wszystkie związki wykazywały aktywność hamującą w kierunku dekapowania RNA, a ich względny potencjał inhibicyjny był skorelowany z wartościami IC₅₀ wyznaczonymi w teście HTS przy użyciu sondy m⁷GTP-Py.



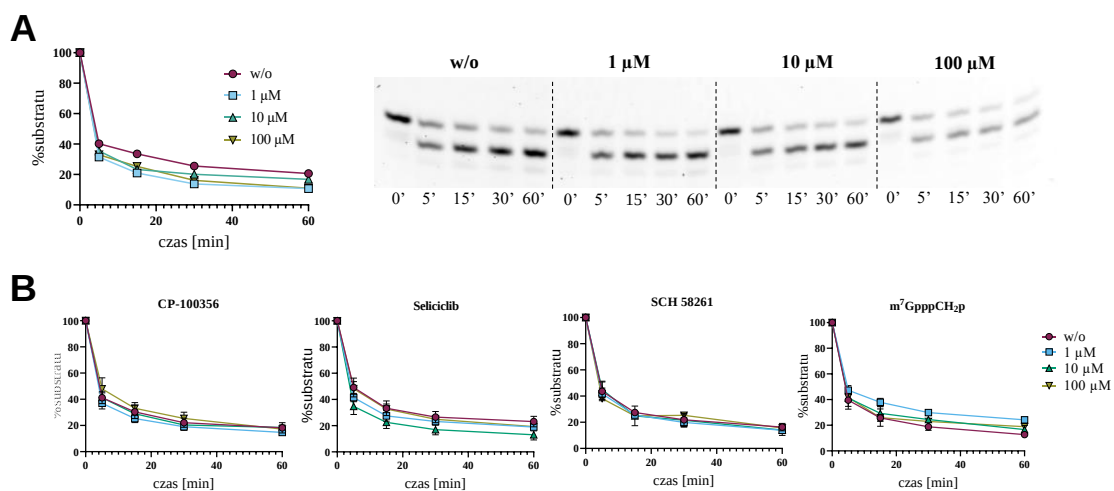
Rys. 40. Schemat eksperymentu potwierdzającego wyniki badań inhibitorowych. Krótki kapowany substrat RNA o długości 26nt został poddany hydrolizie przez enzym D9. W określonych punktach czasowych reakcję zatrzymywano, a jej postęp sprawdzano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE).



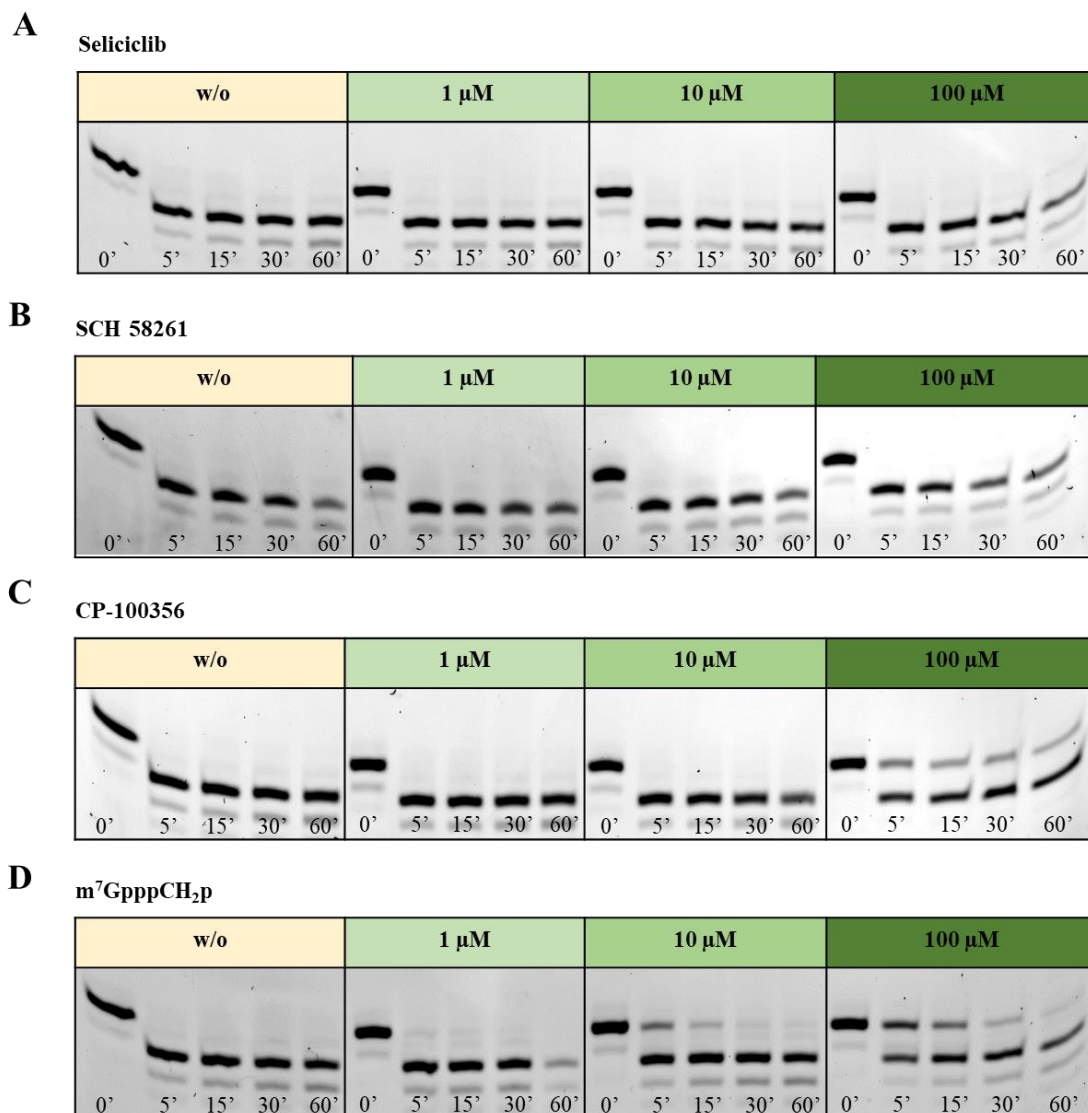
Rys. 41. Weryfikacja zidentyfikowanych inhibitorów w eksperymencie dekapingu na krótkim substracie RNA. **A)** Reprezentatywny żel z pojedynczego eksperymentu ze związkiem CP-100356 (z prawej) oraz analiza densytometryczna intensywności prążków (z lewej). **B)** Potwierdzenie właściwości inhibitorowych czterech wyselekcjonowanych związków.

Na koniec sprawdzono również, czy zidentyfikowane inhibitory są selektywne względem wirusowego enzymu D9 czy oddziałują również na inne enzymy o podobnej aktywności. W tym celu wykonano analogiczny eksperyment na krótkim substracie RNA, ale w obecności dwóch innych enzymów – ludzkiego kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2 oraz drugiego enzymu dekapującego z wirusa krowianki D10. Oba te enzymy także należą do hydrolaz z rodziny Nudix, a ich substratami są długie kapowane cząsteczki RNA. Nie zaobserwowano aktywności hamującej wobec ludzkiego kompleksu DCP1/2 dla badanych związków w stężeniach do 100 μM , potwierdzając tym samym ich wysoką selektywność wobec enzymu wirusowego (Rys. 42). $m^7GpppCH_2p$ i CP-100356 wykazywały lekkie działanie inhibitorowe względem D10 przy wyższych stężeniach (Rys. 43A, B), co może sugerować dwie rzeczy. Po pierwsze, że aktywności

tych dwóch enzymów są podobne i częściowo pokrywają się lub że jeden z nich może pełnić rolę enzymu zapasowego (z ang. *back-up enzyme*) względem drugiego w przypadku, gdyby aktywność jednego została w jakiś sposób upośledzona. Jednakowoż, najsilniejszy inhibitor D9 zidentyfikowany w tym badaniu, Selicilib, wykazywał bardzo dobrą selektywność tylko wobec D9.



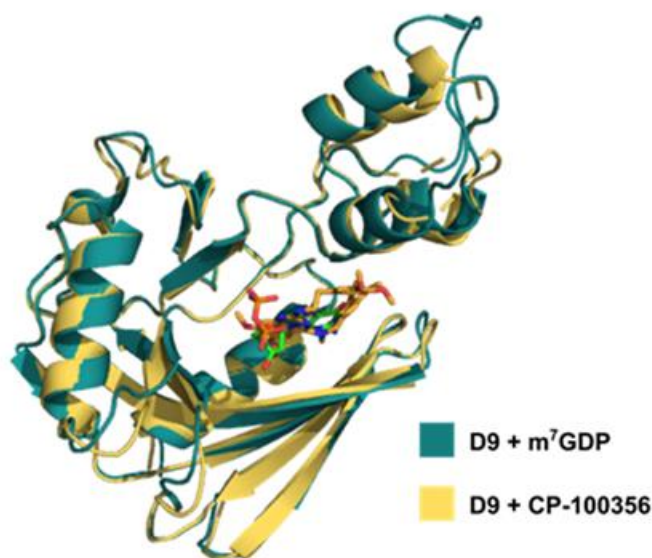
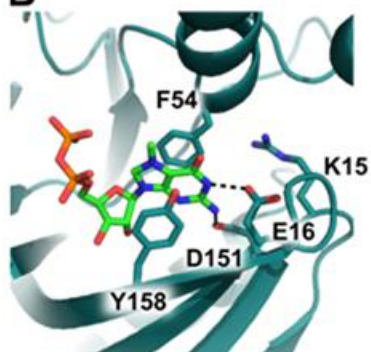
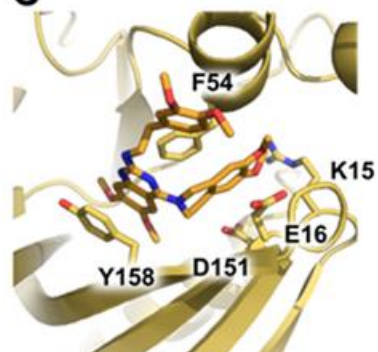
Rys. 42. Potwierdzenie selektywności zidentyfikowanych inhibitorów względem enzymu D9 – eksperyment z ludzkim kompleksem PNRC2-DCP1-DCP2. A) Reprezentatywny żel z pojedynczego eksperymentu ze związkiem Selicilib (z prawej) oraz analiza densytometryczna intensywności prążków (z lewej). **B)** Potwierdzenie braku właściwości inhibitorowych czterech wyselekcjonowanych związków względem enzymu DCP2.



Rys. 43. Potwierdzenie selektywności zidentyfikowanych inhibitorów względem enzymu D9 – eksperyment z wirusowym enzymem D10. Związki: Seliciclib (**A**) oraz SCH 58261 (**B**) nie wykazują właściwości inhibitorowych względem drugiego enzymu dekapującego z wirusa krowianki, D10. Dwa spośród testowanych związków: CP-100356 (**C**) oraz inhibitor nukleotydowy, m⁷GpppCH₂p (**D**) hamowały aktywność D10 przy wyższych stężeniach. Na rysunku przedstawiono reprezentatywny żel dla jednego z trzech powtórzeń wykonanych dla każdego związku. Analiza densytometryczna nie była możliwa do wykonania ze względu na różnice w aktywności enzymu między powtórzeniami i ograniczonej ilości białka.

3.2.8 BADANIA KRYSTALOGRAFICZNE

W ramach współpracy nad projektem dotyczącym wirusowego enzymu dekapującego D9, część badań obejmującą badania krystalograficzne wykonała dr Jessica Peters w laboratorium prof. Johna Grossa na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Francisco. W ich rezultacie udało się uzyskać strukturę krystaliczną dzikiego wariantu (z ang. *wild type*) enzymu D9 w kompleksie z jednym ze zidentyfikowanych wcześniej małowcząstkowych inhibitorów z biblioteki LOPAC^{®1280}, CP-100356 (P3_B7), w rozdzielczości 1,78 Å (PDB: 7T7H; Rys. 44). Pozwoliło to nieco lepiej zrozumieć mechanizm inhibicji tego białka. W otrzymanej strukturze przestrzennej D9 przyjmuje nieaktywną konformację post-katalityczną, analogiczną do opublikowanej niedawno struktury enzymu związanej z produktem hydrolizy kapowanych substratów, m⁷GDP (PDB: 7SEZ) [105]. Inhibitor CP-100356 układa się w kieszeni wiążącej enzymu przez zablokowanie pierścienia 6,7-dimetoksychinoliny między dwiema resztami aromatycznymi – fenyloalaniną-54 (F54) oraz tyroziną-158 (Y158). Dokładnie w ten sam sposób rozpoznawana jest struktura 7-metyloguanozyny na końcu 5' cząsteczki RNA, a te dwa zachowane ewolucyjnie aminokwasy są niezbędne do wydajnej hydrolizy kapu. Jednak w kompleksie z CP-100356 zaobserwowano znaczne przearanżowanie pozycji Y158 w porównaniu do jej ułożenia w kompleksie z m⁷GDP (Rys. 44B i C), przypuszczalnie w celu umożliwienia bardziej efektywnego oddziaływania warstwowego (π - π *stacking*) z aromatycznym układem chinazolinowym inhibitora. Ponadto, w kontrze do struktury 7SEZ, gdzie 7-metyloguanozyna tworzy pary wodorowe z resztami D151 i E16, cząsteczka CP-100356 nie jest stabilizowana przez tworzenie wiązań wodorowych z tymi aminokwasami, a raczej rozciąga się w niewielkiej wnęcie wzdłuż tych reszt (Rys. 44C). Podsumowując, wszystkie powyższe obserwacje prowadzą do wniosku, że CP-100356 hamuje hydrolizę kapowanych substratów D9 poprzez zablokowanie enzymu w nieaktywnej konformacji, uniemożliwiając zachowanym ewolucyjnie resztom aromatycznym F54 i Y158 związanie struktury 5' kapu. Niestety, próby krystalizacji enzymu D9 z innymi najsilniejszymi inhibitorami zidentyfikowanymi w eksperymentach HTS, Seliciclibem (P4_A6) i SCH 58261 (P16_F10), nie powiodły się. Niemniej jednak, na podstawie podobieństwa tych związków do naturalnych zasad można przypuszczać, że najprawdopodobniej hamują one aktywność enzymu w podobny sposób, tj. poprzez oddziaływania *stackingowe* pomiędzy F54 i Y158.

A**B****C**

Rys. 44. Struktura krystaliczna wirusowego enzymu D9 w kompleksie z małowcząsteczkowym inhibitorem CP-100356. A) Nałożenie struktur przestrzennych D9 uzyskanych przez kokrystalizację z m⁷GDP (kolor morski, PDB: 7SEZ) lub CP-100356 (kolor żółty, PDB: 7T7H). **B)** Zbliżenie na kieszeń wiążącą struktury 7SEZ – m⁷GDP tworzy oddziaływania warstwowe z F54 i Y158 oraz wiązania wodorowe z E16 i D151. **C)** Zbliżenie na kieszeń wiążącą struktury 7T7H – związek CP-100356 znajduje się w miejscu wiązania kapu i stabilizowany jest przez oddziaływania π - π pomiędzy F54 a Y158.

3.3 BADANIA LUDZKIEGO KOMPLEKSU DEKAPUJĄCEGO PNRC2-DCP1/DCP2

Druga część projektu dotyczyła badań inhibitorowych ludzkiego enzymu dekapującego, DCP2⁵. Do momentu pisania tej pracy, bardzo mało informacji na temat małowcząsteczkowych inhibitorów DCP2 można było odnaleźć w literaturze. W 2016 roku pojawiła się praca, w której autorzy przeanalizowali niewielką bibliotekę nukleotydowych analogów kapu zawierających różne modyfikacje w obrębie łańcucha oligofosforanowego względem drożdżowego kompleksu Dcp1/2 [156]. Użyli w tym celu wyznakowanych radioaktywnie cząsteczek RNA, które inkubowali z enzymem i potencjalnym inhibitorem, a następnie analizowali technikami elektroforetycznymi. Udało im się zidentyfikować kilka związków o właściwościach inhibitorowych w stężeniach mikromolarnych, a najsilniejszy z nich, m⁷Gpspppsm⁷G, charakteryzował się ponad 20-krotnie silniejszym powinowactwem do białka niż natywna struktura kapu, m⁷GpppN. Kilka lat później Luo *i wsp.*, wykorzystując metodę tzw. *phage display*, odkryli bicykliczny peptyd, CP21, który hamował aktywność hydrolityczną ludzkiego DCP2 względem wybranych substratów RNA w komórkach ludzkich [172]. Peptyd ten posłużył im później do badań specyficzności substratowej enzymu. Oba te przykłady dowodzą, że inhibitory Dcp2 mogą znaleźć zastosowanie w szeroko pojętych badaniach nie tylko degradacji, ale i całego cyklu życia mRNA (*mRNA turnover*). Stąd też wynika realna potrzeba zaprojektowania wysokoprzepustowej metody, która umożliwiłaby w prosty sposób dokonywać szybkiej selekcji związków o określonych właściwościach (np. inhibitorowych) spośród dużych bibliotek związków.

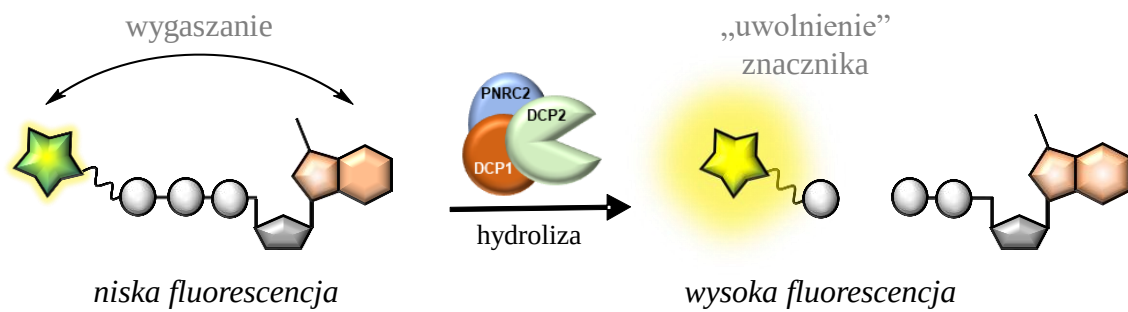
Jak już to zostało wielokrotnie wspomniane i opisane dokładniej w części literaturowej, DCP2 nie działa samodzielnie, a zawsze występuje w kompleksie. W warunkach laboratoryjnych odtworzenie tak złożonego kompleksu oraz zachowanie jego aktywności i skomplikowanej sieci powiązań między jego poszczególnymi składnikami białkowymi jest praktycznie niemożliwe. Z tej przyczyny dąży się do upraszczania modeli badawczych. Do badań wykonanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej użyto rekombinowanego kompleksu, w którego skład, oprócz podjednostki katalitycznej DCP2, wchodził również DCP1 pełniący funkcję aktywatora oraz PNRC2 dodatkowo stymulujący dekaping, czyli reakcję usuwania struktury kapu z końca 5' RNA (PNRC2-DCP1-DCP2, w skrócie: DCP1/2). Wyniki zaprezentowane w tej części pracy stanowią tylko preludium do większego projektu dotyczącego enzymu DCP2 i obejmują etap projektowania i optymalizacji metody, a także wstępne badania

⁵ Badania opisane w tej części pracy dotyczą w pełni ludzkiego kompleksu białkowego, dlatego zgodnie z obowiązującą międzynarodową nomenklaturą wytyczoną przez Komitet ds. Nomenklatury Genów Organizacji ds. Badań Nad Genomem Człowieka (HGNC) zarówno kompleks, jak i jego poszczególne składowe będą zapisywane wielkimi literami.

inhibitorowe, które miały ma celu pokazać jej użyteczność jako narzędzia w badaniach biofizycznych.

3.3.1 OPTIMALIZACJA STRUKTURY SONDY

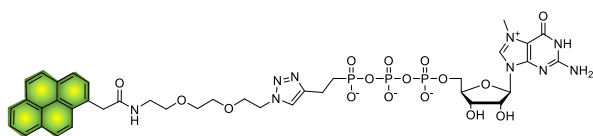
Badania ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2 rozpoczęto od wybrania odpowiedniej sondy fluorescencyjnej typu *turn-on*, która charakteryzuje się wzrostem intensywności sygnału fluorescencji na skutek degradacji sondy przez enzym i zaniku oddziaływań wygaszających (Rys. 45). Podobnie jak w przypadku enzymu D9, biorąc pod uwagę naturalne preferencje substratowe DCP2 względem kapowanych cząsteczek RNA, zdecydowano się przetestować sondy zawierające w swej strukturze 7-metyloguanozynę. Sprawdzono pięć związków z trzema różnymi znacznikami fluorescencyjnymi (pirenem [Py], 5-karboksyfluoresceiną [izomer 5, FAM] oraz dipirometenem boru [BODIPY-FL]) w różnych pozycjach (sondy **2a-2f**, Rys. 46, lewa strona). Ponieważ naturalnymi substratami DCP2 są długie cząsteczki RNA, istniało podejrzenie, że enzym do rozpoznania sondy jako substratu będzie wymagał „dłuższej” struktury. Z tego względu, w testowanym zestawie oprócz sond opartych na strukturze znakowanego mononukleotydu (**2a**), znalazły się również sondy dinukleotydowe (**2b**, **2c**, **2e**), a nawet jeden znakowany trinukleotyd (**2d**). Aby porównać związki między sobą, sprawdzono eksperymentalnie jak zmienia się fluorescencja każdej z sond pod wpływem hydrolizy przez DCP2 w funkcji czasu. W tym celu w kuwecie pomiarowej inkubowano roztwór 100 nM sondy z 50 nM PNRC2-DCP1-DCP2 przez 90 minut, wykonując pomiar widm emisyjnych w dwuminutowych odstępach czasu (Rys. 46, prawa strona). Następnie, dla każdej sondy wykreślono wykres względnej zmiany intensywności fluorescencji w maksimum emisji, normując zarejestrowane wartości sygnału do wartości w punkcie $t = 0$, oraz wyznaczono względną kinetykę hydrolizy sond (Rys. 47). Porównując otrzymane wyniki, do dalszych badań wytypowano związek **2a**, czyli trifosforan 7-metyloguanozyny znakowany pirenem ($m^7\text{GTP-Py}$). Charakteryzował się on największym, bo aż ok. 12-krotnym, wzrostem intensywności fluorescencji w trakcie trwania pomiaru. Jest to dokładnie ta sama sonda, która została wyselekcjonowana i użyta w badaniach inhibitorowych wirusowego enzymu dekapującego D9.



Rys. 45. Zasada działania sondy FLINT typu *turn-on* do monitorowania aktywności kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2. Wskutek degradacji sondy przez kompleks DCP1/2 zanikają oddziaływania wygaszające pomiędzy zasadą azotową a znacznikiem fluorescencyjnym, co powoduje mierzalną zmianę intensywności rejestrowanej fluorescencji.

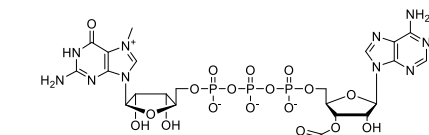
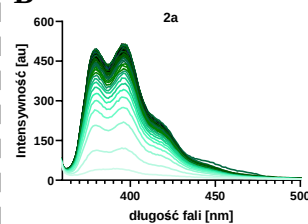
Struktura sondy

A

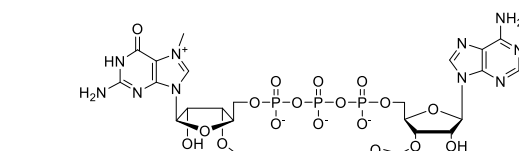
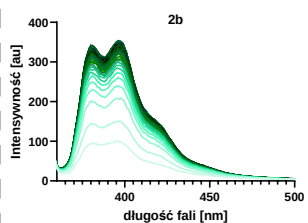


2a

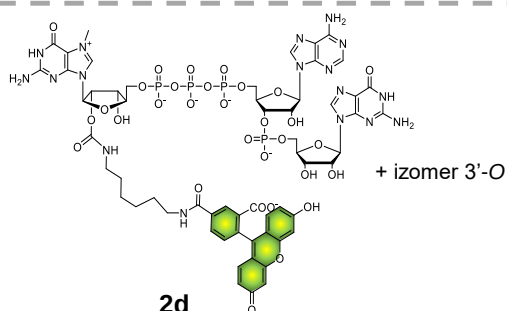
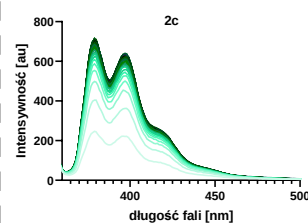
B



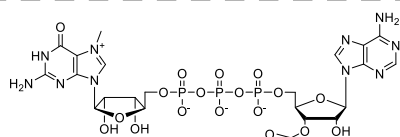
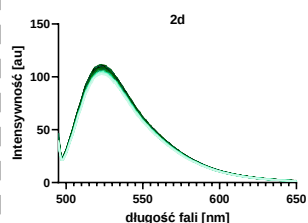
2b



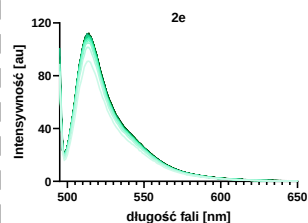
2c



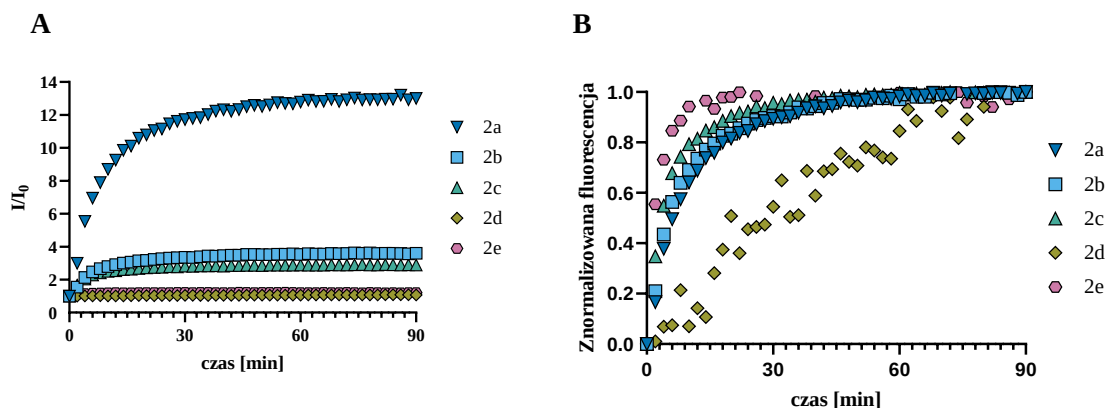
2d



2e



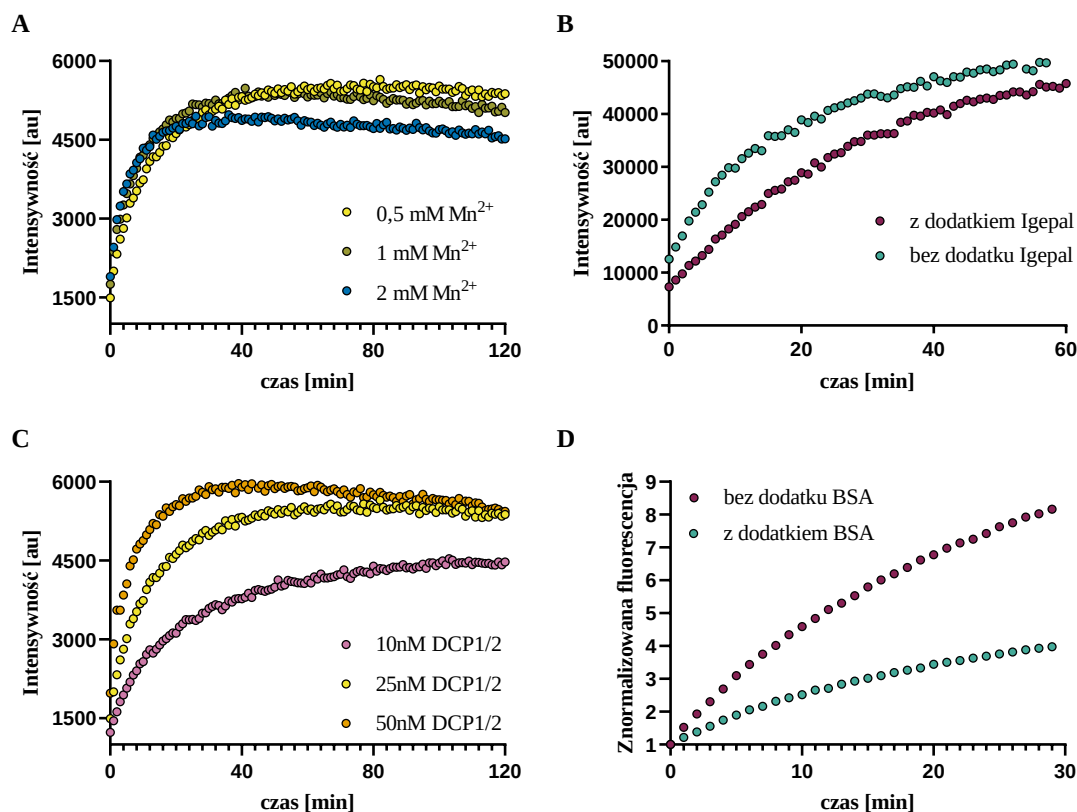
Rys. 46. Sprawdzenie oddziaływania ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2 z testowanymi sondami. Z lewej strony zaprezentowano struktury sond fluorescencyjnych użytych do badania kompleksu DCP1/2; z prawej strony znajdują się odpowiadające im zależności zmiany intensywności fluorescencji w funkcji czasu. Warunki eksperymentu: sondy **2a – 2e** (100 nM) inkubowano w obecności kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2 (50 nM) w 50 mM Tris-HCl pH 8,0 z dodatkiem 50 mM NH_4Cl , 5 mM MgCl_2 , 2 mM MnCl_2 , 1 mM DTT oraz 0,01% Igepal. Widma emisji fluorescencji rejestrowano z zachowaniem 2-minutowego interwału czasowego przy długości fal wzbudzenia: **2a-2c** – 345 nm, **2d, 2e** – 490 nm.



Rys. 47. Selekcja sondy do badania aktywności ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2. A) Porównanie zmian intensywności fluorescencji pod wpływem hydrolizy katalizowanej przez kompleks DCP1/2. Zmiany monitorowano w maksimum emisji każdej sondy. B) Względna kinetyka hydrolizy sond. Do porównania względnej podatności sond na degradację przez DCP1/2, wartości intensywności fluorescencji dla każdej z nich przedstawione w panelu A zostały znormowane do wartości w punkcie czasowym $t=90$ min. Warunki eksperymentu: sondy **2a – **2e** (100 nM) inkubowano w obecności kompleksu DCP1/2 (50 nM) w 50 mM Tris-HCl pH 8,0 z dodatkiem 50 mM NH_4Cl , 5 mM MgCl_2 , 2 mM MnCl_2 , 1 mM DTT oraz 0,01% Igepal. Widma emisji fluorescencji rejestrowano z zachowaniem 2-minutowego interwału czasowego przy długości fali wzbudzenia i maksimum emisji: **2a-2c** – 345 nm / 378 nm, **2d** – 490 nm / 523 nm, **2e** – 490 nm / 514 nm.**

3.3.2 OPTIMALIZACJA WARUNKÓW REAKCJI

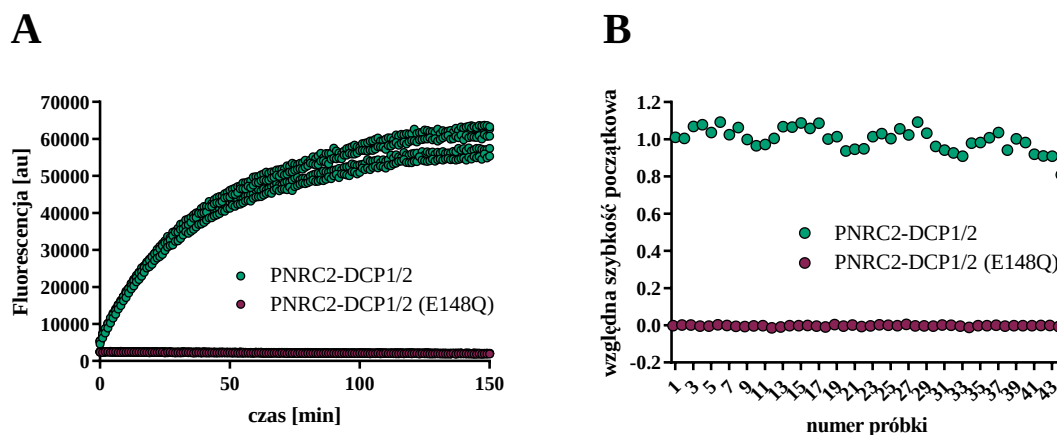
Kolejnym krokiem po wybraniu odpowiedniej sondy fluorescencyjnej w rozwijaniu wysokoprzepustowej metody FLINT jest optymalizacja warunków reakcji hydrolizy tej sondy. Parametry, które mają największy wpływ na kinetykę i przebieg reakcji to stężenia głównych reagentów, czyli enzymu i sondy, ale również skład i parametry roztworu buforującego, w tym zawartość jonów metali, które mają bezpośredni wpływ na aktywność białka oraz innych dodatków (takich jak sole, detergenty, białka pomocnicze/stabilizujące, itp.). Punkt wyjścia procesu optymalizacji metody FLINT do badania kompleksu DCP1/2 stanowiły znalezione w literaturze warunki stosowane do badań drożdżowego Dcp1/2 [156]. Wybór ostatecznych warunków opierał się na analizie porównawczej szybkości początkowych reakcji hydrolizy sondy oraz wartości rejestrowanego sygnału fluorescencji (aby wybrane warunki charakteryzowały się odpowiednio szerokim oknem pomiarowym). Wybrane wyniki optymalizacji przedstawiono na Rys. 48. Na ich podstawie zdecydowano się zrezygnować z obecności detergentu w buforze reakcyjnym, ponieważ jego dodatek negatywnie wpływał na intensywność sygnału fluorescencji. Podobnie było w przypadku BSA, którego suplementacja stabilizowała sygnał w metodzie do badania enzymu D9, natomiast w przypadku DCP1/2 znacznie go „spłaszczyła” przy jednoczesnym braku pozytywnego wpływu na inne parametry reakcji.



Rys. 48. Optimalizacja metody badawczej kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2 – wybrane wyniki. Wpływ różnych czynników na analizowane parametry reakcji hydrolizy sondy przez kompleks enzymatyczny: stężenia kompleksu (A), jonów manganu (B), dodatku detergentu Igepal (C) czy białka stabilizującego BSA (D).

Mając wstępnie wybrane warunki reakcji, sprawdzono dodatkowo, czy rejestrowany wzrost fluorescencji wynika ze specyficznej degradacji sondy przez hydrolazę DCP2. W tym celu przeprowadzono analogiczny eksperyment z użyciem nieaktywnego katalitycznie mutanta kompleksu DCP1/2, który pełnił rolę kontroli negatywnej. W konstrukcie tym reszta kwasu glutaminowego (E) w pozycji 148 została zastąpiona przez glutaminę (Q) – E148 to jedna z czterech zachowanych ewolucyjnie reszt kwasu glutaminowego, która jest kluczowa w procesie hydrolizy przez enzymy z rodziny Nudix i odpowiada za koordynację jonów magnezu. Jej podstawienie upośledza właściwości katalityczne kompleksu i jest często raportowane w literaturze do otrzymywania nieaktywnych form tego białka, np. do badań krystalograficznych [72,80,173]. W ramach doświadczenia przygotowano 88 próbek mieszaniny sondy w buforze reakcyjnym, do połowy dodano aktywnego kompleksu DCP1/2, a do drugiej połowy – mutanta E148Q i rejestrowano sygnał fluorescencji przy użyciu czytnika płytek. Na Rys. 49 na panelu A przedstawiono kilka przykładowych przebiegów reakcji dla kontroli pozytywnej (aktywny kompleks) oraz negatywnej (mutant), a na panelu B znajduje się wykres z wyznaczonymi względnymi szybkościami początkowymi reakcji dla każdej z analizowanych grup. Wyniki jednoznacznie pokazują,

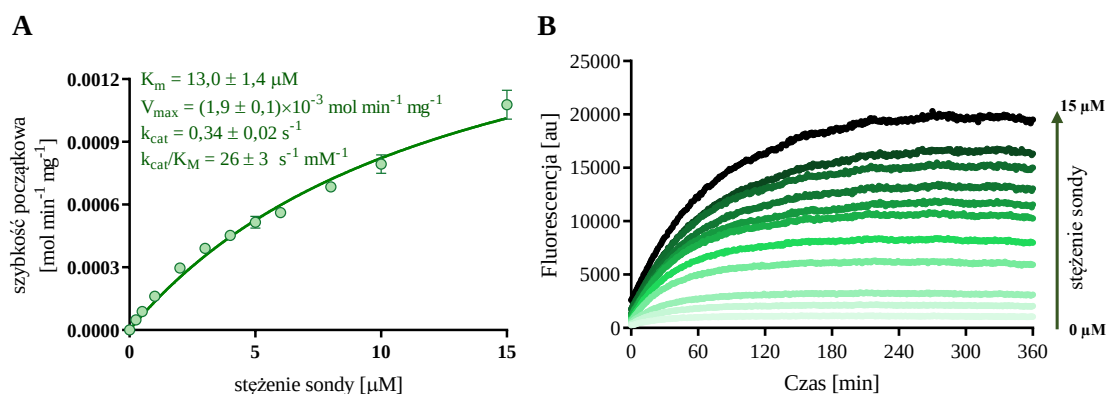
że obserwowany wzrost intensywności fluorescencji wynika ze specyficznej hydrolizy sondy pirenowej katalizowanej przez kompleks DCP1/2.



Rys. 49. Sonda $m^7\text{GTP-Py}$ jest specyficznie hydrolizowana przez kompleks PNR2-DCP1-DCP2. A) Przykładowe przebiegi reakcji dla kontroli pozytywnej z aktywnym kompleksem oraz kontroli negatywnej z użyciem nieaktywnego mutantu E148Q. B) Porównanie względnych szybkości początkowych reakcji hydrolizy sondy dla obu grup kontrolnych. Warunki reakcji: $3\ \mu\text{M}$ sondy $m^7\text{GTP-Py}$ inkubowano z $15\ \text{nM}$ DCP1/2 lub DCP1/2 (E148Q) w $50\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 8,0, zawierającym $50\ \text{mM}$ NH_4Cl , $5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $1,5\ \text{mM}$ MnCl_2 oraz $1\ \text{mM}$ DTT.

3.3.3 WYZNACZENIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH HYDROLIZY SONDY KATALIZOWANEJ PRZEZ KOMPLEKS DEKAPUJĄCY PNR2-DCP1-DCP2

Ostatnim krokiem procesu optymalizacji metody, będącym jednocześnie potwierdzeniem słuszności wybranych warunków eksperymentu, było wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy sondy pirenowej przez enzym – stałej Michaelisa-Menten oraz szybkości maksymalnej reakcji i stałej katalitycznej (liczby obrotów) kompleksu DCP1/2. Aby to osiągnąć, inkubowano kompleks dekapujący w stałym stężeniu ($15\ \text{nM}$) z różnymi stężeniami substratu – sondy pirenowej ($0\text{--}15\ \mu\text{M}$), monitorując jednocześnie zmieniający się sygnał fluorescencji w czasie. Dla każdego stężenia substratu wyznaczono szybkość początkową reakcji hydrolizy i odłożono na wykresie. Z badań nad enzymem D9 wiadomo, że postęp reakcji degradacji sondy przez hydrolazy z rodziny Nudix odpowiada standardowej kinetyce Michaelisa-Menten, dlatego do danych eksperymentalnych dopasowano odpowiedni model i wyznaczono parametry kinetyczne (Rys. 50). Stała Michaelisa-Menten, K_M , reakcji hydrolizy sondy $m^7\text{GTP-Py}$ przez kompleks DCP1/2 wyniosła $13,0 \pm 1,4\ \mu\text{M}$, szybkość maksymalna, $V_{\text{max}} - (1,9 \pm 0,1) \times 10^{-3}\ \text{mol/min/mg}$, a wydajność katalityczna kompleksu, $k_{\text{cat}}/K_M - 26 \pm 3\ \text{s}^{-1}\ \text{mM}^{-1}$.



Rys. 50. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy sondy m⁷GTP-Py przez kompleks PNRC2-DCP1-DCP2. A) Na wykresie przedstawiono wartości szybkości początkowych reakcji degradacji sondy w funkcji stężenia substratu. Do danych eksperymentalnych dopasowano klasyczny model Michaelisa-Menten i wyznaczono parametry kinetyczne reakcji hydrolizy: K_M , V_{max} , k_{cat} oraz k_{cat}/K_M . Warunki eksperymentu: 15 nM DCP1/2 inkubowano z różnym stężeniem m⁷GTP-Py (0-15 μM) w 50 mM Tris-HCl pH 8,0, zawierającym 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM MnCl₂ oraz 1 mM DTT. Zaprezentowane dane reprezentują wartości średnie (± SEM) obliczone dla trzech niezależnych powtórzeń. **B)** Przykładowe przebiegi reakcji dla różnych stężeń substratu – sondy.

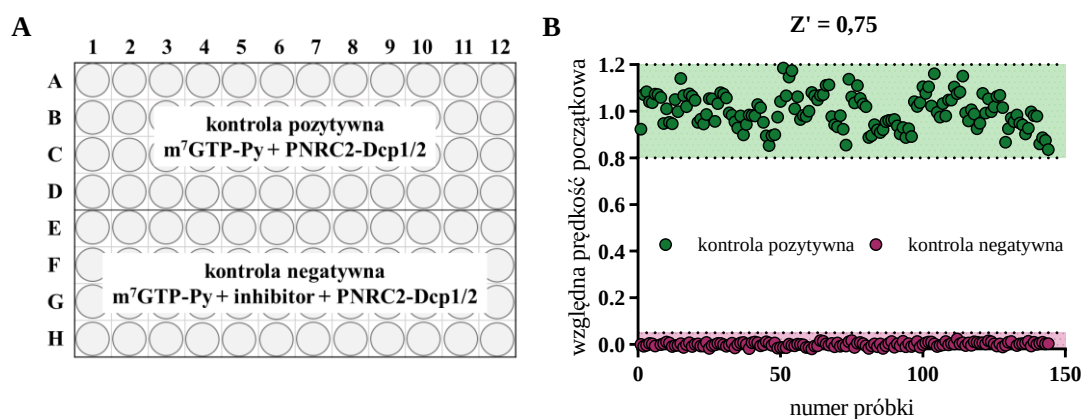
Podsumowując, w oparciu o wyniki eksperymentów optymalizacyjnych oraz wyznaczone parametry kinetyczne reakcji hydrolizy sondy pirenowej, m⁷GTP-Py, przez ludzki kompleks dekapujący PNRC2-DCP1-DCP2 wybrano najbardziej optymalne warunki do prowadzenia badań inhibitorowych z wykorzystaniem opracowanej metody FLINT (Tabela 6).

Tabela 6. Zoptymalizowane warunki metody FLINT do badania ludzkiego kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2.

Stężenie sondy	3 μM
Stężenie enzymu	15 nM
Bufor reakcyjny	50 mM Tris-HCl pH 8,0, zawierający 50 mM NH ₄ Cl, 5 mM MgCl ₂ , 1,5 mM MnCl ₂ oraz 1 mM DTT
Długość fali wzbudzenia/emisji sondy	345 nm / 378 nm
Temperatura pomiaru	30°C
Pre-inkubacja	15 min, 300 rpm

3.3.4 WALIDACJA METODY

Dodatkowym warunkiem, który musi spełniać metoda badawcza, aby można było zastosować ją do wysokoprzepustowych badań przesiewowych (HTS) jest odpowiednia wartość parametru Z' . Parametr ten wiąże ze sobą średnie oraz odchylenia standardowe kontroli pozytywnej (maksymalny możliwy do uzyskania sygnał) oraz negatywnej (sygnał tła) i jest miarą jakości danego testu, co opisano dokładniej w podrozdziale 3.2.4. Zakłada się, że jeśli Z' przyjmuje wartość powyżej 0,5 to metoda spełnia kryterium wysokoprzepustowości i może zostać zaimplementowana do badań HTS. W celu wyznaczenia parametru Z' wykonano pomiar intensywności fluorescencji serii próbek kontroli pozytywnej i negatywnej. Kontrolę pozytywną stanowiła mieszanina sondy z kompleksem dekapującym w buforze reakcyjnym, natomiast kontrola negatywna zawierała dodatkowo inhibitor w stężeniu całkowicie hamującym aktywność hydrolityczną enzymu (Rys. 51A). Dla każdej próbki z obu grup wyznaczono względne szybkości początkowe reakcji i przedstawiono na Rys. 51B. Wartości średnie i odchylenia standardowe dla każdej grupy znajdują się w Tabeli 7 i posłużyły one do obliczenia parametru Z' , który wyniósł 0,75. Oznacza to, że zoptymalizowana metoda generuje rzetelne i powtarzalne wyniki i może być wykorzystana do wysokoprzepustowych badań przesiewowych bibliotek związków.



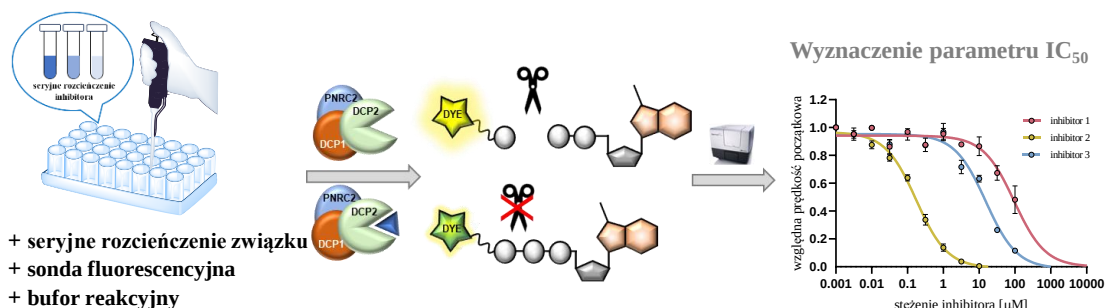
Rys. 51. Ocena jakościowa kompetycyjnego testu kinetycznego służącego do poszukiwania inhibitorów kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2 - wyznaczanie parametru Z' . A) Schemat płytki eksperymentalnej. Kontrola pozytywna: 3 μ M m⁷GTP-Py, 15 nM PNRC2-DCP1-DCP2; kontrola negatywna: 3 μ M m⁷GTP-Py, 15 nM PNRC2-DCP1-DCP2 w obecności inhibitora – 35 μ M Myricetin; B) Graficzne przedstawienie oceny jakościowej metody.

Tabela 7. Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych dla kontroli pozytywnej i negatywnej.

	kontrola pozytywna	kontrola negatywna
średnia, <i>M</i>	1,00	-0,0008
odchylenie standardowe, <i>SD</i>	0,07	0,0091

3.3.5 BADANIA INHIBITOROWE BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW NUKLEOTYDOWYCH

W kolejnym kroku zoptymalizowana metoda FLINT została wykorzystana do scharakteryzowania niewielkiej biblioteki 37 związków nukleotydowych, zawierającej po kilku przedstawicieli z grupy mono-, di- oraz trinukleotydów. Celem tego eksperymentu było zweryfikowanie użyteczności metody w ilościowych badaniach inhibitorowych przez porównanie wartości parametru IC_{50} , będącego miarą siły inhibitora. Dla przypomnienia, parametr ten wyznaczany jest w kompetycyjnym eksperymencie dla różnych stężeń potencjalnego inhibitora, który konkuruje z fluorescencyjną sondą pirenową o miejsce w kieszeni wiążącej enzymu (Rys. 52). Dla każdego stężenia testowanego związku wyznacza się względną szybkość początkową reakcji degradacji sondy katalizowanej przez DCP2, a do otrzymanych danych dopasowuje się odpowiedni model inhibicji, który pozwala wyznaczyć połowiczne stężenie hamujące.



Rys. 52. Schemat metody FLINT do jakościowej ewaluacji inhibitorów kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2. Celem eksperymentu było sprawdzenie, czy metoda może zostać zastosowana do oceny właściwości inhibitorowych związków, np. wyselekcjonowanych w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych, poprzez wyznaczenie parametru IC_{50} .

Dla wszystkich testowanych związków z biblioteki nukleotydowej wyznaczono parametr IC_{50} (Rys. 53, Tabela 8). Uzyskane wartości wahają się w szerokim przedziale od 1,4 do 69 μM , co demonstruje, że metoda ta może być stosowana zarówno do charakterystyki tych słabszych, jak i silniejszych inhibitorów o IC_{50} rzędu wielkości kilku mikromoli.

Tabela 8. Zestawienie wartości parametru IC_{50} serii nukleotydowych inhibitorów kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2. Przedstawione dane są wartościami średnimi z trzech niezależnych eksperymentów $\pm$ SEM.

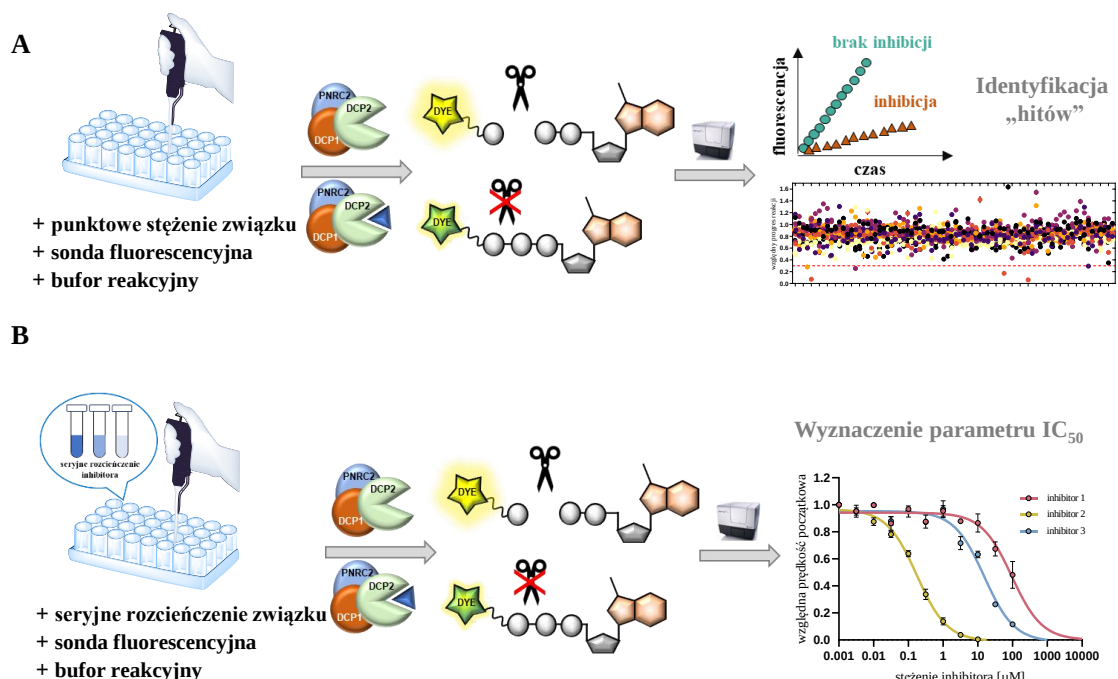
Lp.	Związek	IC_{50} [μ M]	Lp.	Związek	IC_{50} [μ M]
mononukleotydy			dinukleotydy		
1.	m ⁷ GMP	b.d. (>>100)	20.	m ⁷ Gpppm ⁷ G	4,7 $\pm$ 0,7
2.	m ⁷ GDP	2,3 $\pm$ 0,2	21.	m ⁷ Gpspppsm ⁷ G	0,9 $\pm$ 0,2
3.	m ⁷ GDP α S D1	1,9 $\pm$ 0,1	22.	bn ⁷ GppCCl ₂ ppbn ⁷ G	b.d. (>>100)
4.	m ⁷ GDP α S D2	3,2 $\pm$ 0,3	23.	bn ⁷ Gppppbn ⁷ G	9 $\pm$ 3
5.	m ⁷ GTP	1,8 $\pm$ 0,2	24.	m ⁷ G _m ppCF ₂ ppG	39 $\pm$ 6
6.	GTP	17 $\pm$ 2	25.	m ⁷ G _m ppCCl ₂ ppG	57 $\pm$ 9
7.	m ⁷ GpCH ₂ pp	1,8 $\pm$ 0,1	26.	m ⁷ GppCCppG	65 $\pm$ 9
8.	m ⁷ GppCH ₂ p	9,2 $\pm$ 0,8	27.	Gpp-triazole-m ⁷ G	b.d. (>>100)
9.	m ⁷ GpppCH ₂ p	7,7 $\pm$ 0,8	28.	Gppp-triazole-m ⁷ G	5,3 $\pm$ 0,4
dinukleotydy			29.	Gppp-SCH ₂ -triazol-m ⁷ G	b.d. (>>100)
10.	m ⁷ GpppG	3,1 $\pm$ 0,2	30.	m ⁷ Gpp-triazol-G	b.d. (>>100)
11.	m ⁷ G _m pppCH ₂ pG	5,2 $\pm$ 0,6	31.	m ⁷ Gpp-SCH ₂ -triazole-G	b.d. (>>100)
12.	m ⁷ GppCF ₂ ppG	69 $\pm$ 11	32.	Gpp-SCH ₂ -triazole-m ⁷ G	b.d. (>>100)
13.	m ⁷ GppCCl ₂ ppG	b.d. (>>100)	33.	m ⁷ Gppp-SCH ₂ -triazole-G	1,65 $\pm$ 0,07
14.	m ⁷ GppCF ₂ ppm ⁷ G	51 $\pm$ 6	trinukleotydy		
15.	m ⁷ GppCCl ₂ ppm ⁷ G	b.d. (>>100)	34.	m ⁷ GpppApG	2,38 $\pm$ 0,09
16.	m ⁷ Gppp ^{6S} G	2,5 $\pm$ 0,3	35.	m ⁷ GpppA _m pG	2,1 $\pm$ 0,1
17.	m ⁷ G _m ppp ^{6S} G	2,2 $\pm$ 0,2	36.	m ⁷ GpppCH ₂ -triazol-A _m pG	3,1 $\pm$ 0,3
18.	m ⁷ G _N pppG	3,1 $\pm$ 0,4	37.	m ⁷ Gppp-triazol-C ₂ H ₄ -A _m pG	1,39 $\pm$ 0,09
19.	m ⁷ GpCH ₂ ppG	7 $\pm$ 1			

b.d. – brak danych (związek sprawdzono w zakresie stężeń 0-100 μ M, ale parametru IC_{50} nie wyznaczano ze względu na słabe właściwości inhibitorowe, IC_{50} >>100)

3.3.6 WYSOKOPRZEPUSTOWE BADANIA PRZESIEWOWE KOMERCYJNEJ BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW LOPAC^{®1280}

Następny etap badań inhibitorowych ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2 stanowiły wysokoprzepustowe badania przesiewowe komercyjnej biblioteki LOPAC^{®1280}. Ich celem było zidentyfikowanie nowych, małowartościowych inhibitorów ludzkiego enzymu DCP2. Eksperyment ten można podzielić na dwie fazy. W pierwszej wykonano jakościowy screening dla jednego, wybranego stężenia testowanych związków, w którym dąży się do szybkiej selekcji cząsteczek

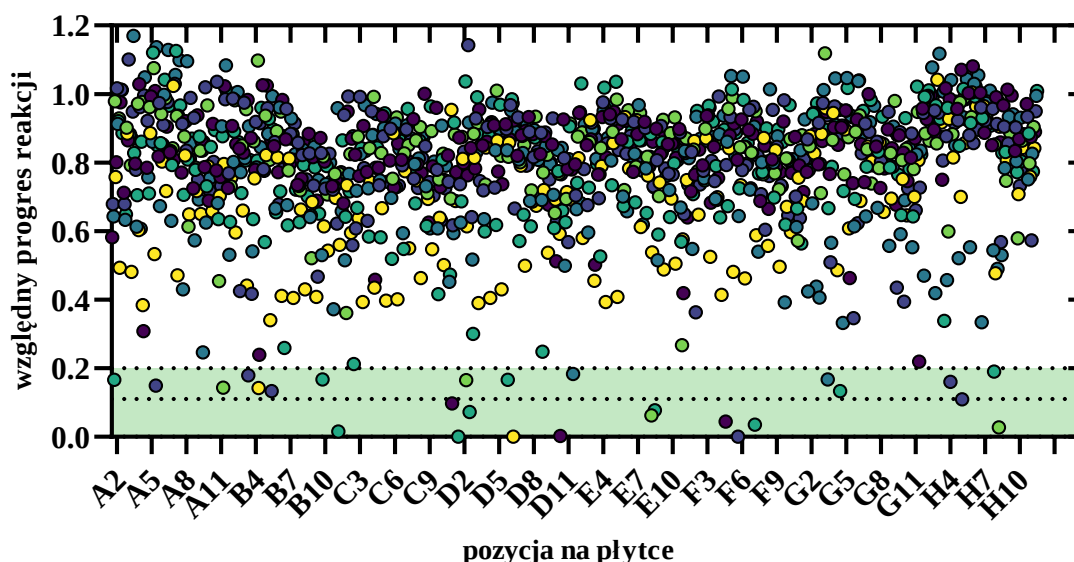
o potencjalnych własnościach inhibitorowych spośród całej biblioteki związków (Rys. 54A). Druga faza polegała na dokładniejszej ewaluacji *hitów* wytypowanej w poprzednim etapie i wyznaczeniu dla nich parametru IC_{50} (Rys. 54B).



Rys. 54. Schemat działania metody FLINT w trybie HTS do jakościowej identyfikacji potencjalnych *hitów* (A) oraz ilościowej ewaluacji wyselekcjonowanych inhibitorów kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2 (B).

Punktowe stężenie testowanych cząsteczek zostało wybrane na podstawie danych z krzywych inhibicji dla kilku najsilniejszych zidentyfikowanych do tamtego momentu związków nukleotydowych (o $IC_{50} \sim 2 \mu M$) i wynosiło $20 \mu M$ - dla tego stężenia obserwowano ok. 90% inhibicję reakcji hydrolizy sondy pirenowej. Jeden z tych związków, m^7GTP , posłużył również jako kontrola pozytywna obecna na płycie 96-dołkowej w każdym pojedynczym eksperymencie. Dla każdego związku została wyznaczona szybkość początkowa reakcji, która została następnie znormowana do szybkości początkowej reakcji bez inhibitora. Punkt odcięcia został ustalony na 20% maksymalnej szybkości początkowej (linia kropkowana), co pozwoliło wyłonić 26 związków (Rys. 55). Zostały one poddane dalszej ewaluacji, której celem było wyznaczenie dla każdego z nich wartości parametru IC_{50} . W przypadku tej analizy zastosowano nieco inny model inhibicji w programie GraphPad Prism – do danych eksperymentalnych dopasowano czteroparametrowe równanie ze zmiennym współczynnikiem Hilla, p . Współczynnik ten jest czasem nazywany współczynnikiem nachylenia krzywej eksperymentalnej na wykresie (z ang. *slope factor*) i może być źródłem wielu cennych informacji na temat oddziaływania związku z białkiem. Zazwyczaj przyjmuje się, że jest on miarą kooperatywności oddziaływania (w sytuacji,

gdy białko może wiązać więcej niż jeden inhibitor), ale może on również świadczyć o innym niż odwracalnym typie inhibicji danego związku - jeśli wartość względna współczynnika Hilla jest znacznie większa od jedności to jest to przesłanka świadcząca o tym, że być może inhibitor wiąże się z enzymem kowalencyjnie.



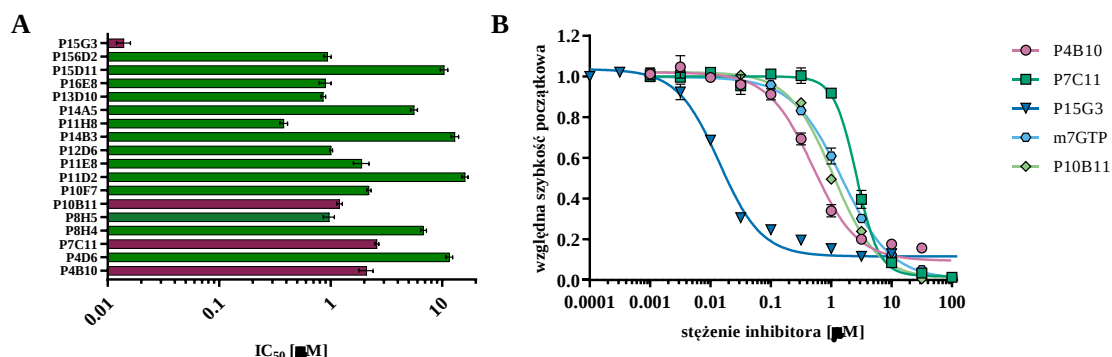
Rys. 55. Wyniki badania przesiewowego biblioteki LOPAC^{®1280} względem ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2.

Spośród wyselekcjonowanych 26 związków, parametr IC_{50} udało się wyznaczyć dla 21 (Rys. 56, Tabela 9) – dwa związki nie potwierdziły swoich właściwości inhibitorowych z wcześniejszego badania HTS ($IC_{50} \gg 100 \mu M$, XCT790 oraz Oleic acid), natomiast dla trzech innych otrzymano niestandardowe krzywe zależności dawka-odpowieź, co może sugerować inny typ inhibicji lub niespecyficzne oddziaływania z białkiem (Aurintricarboxylic acid, NF 023, Reactive Blue 2). Wartości względne współczynnika Hilla, p , również nie odbiegały dość znacznie od jedności, a krzywe inhibicji testowanych związków przyjmowały standardowy, sigmoidalny przebieg. Można zatem przypuszczać, że w przypadku większości testowanych na tym etapie związków mamy do czynienia z odwracalnym typem inhibicji, a białko wiąże jedną cząsteczkę inhibitora w miejscu aktywnym.

Najsilniejszym zidentyfikowanym inhibitorem była suramina (Suramin, $IC_{50} = 0,014 \mu M$) – jest to znany od dawna lek stosowany pierwotnie m.in. w przypadku infekcji pasożytniczych takich jak śpiączka afrykańska czy ślepotą rzeczną. Jest ona inhibitorem niespecyficznym – hamuje aktywność wielu enzymów komórkowych, a mechanizm jej działania nie został do końca poznany. Ponadto, suramina powoduje też szereg poważnych skutków ubocznych, dlatego jej zastosowanie w medycynie zostało ograniczone. Bardzo liczną grupę silnych inhibitorów DCP2 stanowią flawonoidy

(Hispidin, Myricetin, Quercetin, Morin, Picceatanol, Galloflavin). Są to naturalne związki pochodzenia roślinnego i często można znaleźć wzmianki o ich działaniu leczniczym – przeciwzapalnym, przeciwwirusowym, antynowotworowym czy antyoksydacyjnym. Na uwagę zasługują również:

- Cefsulodin, który należy do grupy antybiotyków z rodziny cefalosporyn, które wykazują silne działanie antibakteryjne poprzez hamowanie syntezy ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich.
- Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) – przedstawiciel lignanów, naturalnych związków o działaniu estrogenopodobnym, który wykazuje właściwości m.in. antynowotworowe czy antyoksydacyjne.
- Thyrphostin 51 – związek należący do rodziny małocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych, które są stosowane np. w terapiach przeciwnowotworowych. Ich struktura oparta jest na strukturze naturalnego związku produkowanego przez bakterie – erbstatyny.
- GW5074 – syntetyczny inhibitor kinazy cRaf1, policykliczny związek z podstawnikami halogenowymi, które mogą być donorami wiązania halogenowego z białkowym celem molekularnym.



Rys. 56. Ewaluacja najlepszych związków wyselekcjonowanych ze screeningu komercyjnej biblioteki LOPAC[®]1280. A) Porównanie wartości parametru IC_{50} związków wytypowanych z badania HTS. Na wykresie przedstawiono tylko związki o $IC_{50} < 20 \mu$ M. Zaprezentowane wartości liczbowe są średnimi $\pm$ SEM i pochodzą z trzech niezależnych powtórzeń. B) Reprezentatywne krzywe inhibicji czterech związków wybranych z grupy najsilniejszych inhibitorów enzymu DCP2 wraz z m⁷GTP (kontrola pozytywna). Związki zostały wytypowane do weryfikacji metodą dekapingu na krótkim substracie RNA.

Tabela 9. Porównanie wartości IC_{50} oraz współczynników Hilla wyznaczonych przy użyciu opracowanej metody FLINT dla związków wyselekcjonowanych z wysokoprzepustowych badań biblioteki LOPAC^{®1280}. Zaprezentowane wyniki są średnimi wartościami $\pm$ SEM i pochodzą z 3 niezależnych eksperymentów.

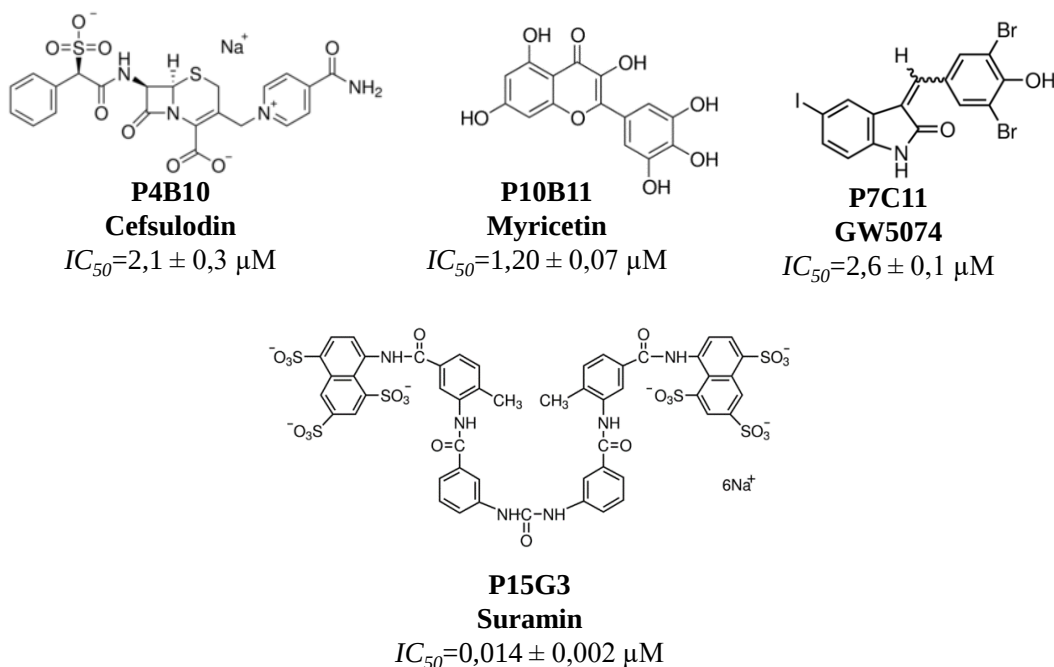
Lp.	Symbol	Nazwa	IC_{50} [μ M]	p
	m ⁷ GTP	Trifosforan 7-metyloguanozyny	1,52 $\pm$ 0,07	1,03
1.	P1F5	Aurintricarboxylic acid	b.d.*	b.d.
2.	P4A2	Icaritin	34 $\pm$ 3	1,33
3.	P4B10	Cefsulodin	2,1 $\pm$ 0,3	0,81
4.	P4D6	L-798106	11,6 $\pm$ 0,8	1,95
5.	P4H8	Calcimycin	32 $\pm$ 3	1,40
6.	P7C11	GW5074	2,6 $\pm$ 0,1	2,17
7.	P8H4	6-Hydroxy-DL-DOPA	6,8 $\pm$ 0,4	1,21
8.	P8H5	Hispidin	0,97 $\pm$ 0,11	1,21
9.	P10B11	Myricetin	1,20 $\pm$ 0,07	1,37
10.	P10F7	Morin	2,2 $\pm$ 0,1**	1,40
11.	P11A11	NF 023	b.d.*	b.d.
12.	P11D2	JNJ-40418677	16 $\pm$ 1	1,79
13.	P11E8	Gossypol	1,9 $\pm$ 0,3**	1,40
14.	P11H8	Nordihydroguaiaretic acid	0,38 $\pm$ 0,03	1,00
15.	P12B4	Oleic Acid	b.d. (>>100 μ M)	b.d.
16.	P12D6	Piceatannol	1,01 $\pm$ 0,03*	1,33
17.	P13D10	Quercetin	0,86 $\pm$ 0,04**	1,57
18.	P14A5	Ro 41-0960	5,6 $\pm$ 0,4	1,32
19.	P14B3	Rottlerin	13 $\pm$ 1	2,05
20.	P14B5	Reactive Blue 2	b.d.*	b.d.
21.	P15D11	Tyrphostin 23	10,4 $\pm$ 0,8	1,15
22.	P15G3	Suramin	0,014 $\pm$ 0,002	1,24
23.	P16C11	YC-1	57 $\pm$ 6	1,36
24.	P16D2	Tyrphostin 51	0,94 $\pm$ 0,07	1,39
25.	P16E8	Galloflavin	0,90 $\pm$ 0,11**	1,06
26.	P16G4	XCT790	b.d. (>>100 μ M)	b.d.

b.d. (>>100 μ M) – brak danych (związek sprawdzono w zakresie stężeń 0-100 μ M, ale parametru IC_{50} nie wyznaczano ze względu na słabe właściwości inhibitorowe, $IC_{50}>>100$); * otrzymane dane zależności dawka – odpowiedź nie przyjmowały postaci krzywej sigmoidalnej, co uniemożliwiło wyznaczenie parametru; ** podany wynik jest średnią z dwóch powtórzeń ze względu na brak wystarczającej ilości materiału badawczego

3.2.7 WERYFIKACJA WYNIKÓW NIEZALEŻNĄ METODĄ NA KRÓTKIM SUBSTRACIE RNA

W celu zweryfikowania wyników otrzymanych metodą FLINT, wybrano kilka zidentyfikowanych inhibitorów z biblioteki LOPAC i sprawdzono ich wpływ na dekaping krótkich cząsteczek kapowanego RNA o długości 26 nukleotydów (26 nt). Związki te wytypowano z grupy najsilniejszych inhibitorów, biorąc pod uwagę nie tylko wartość

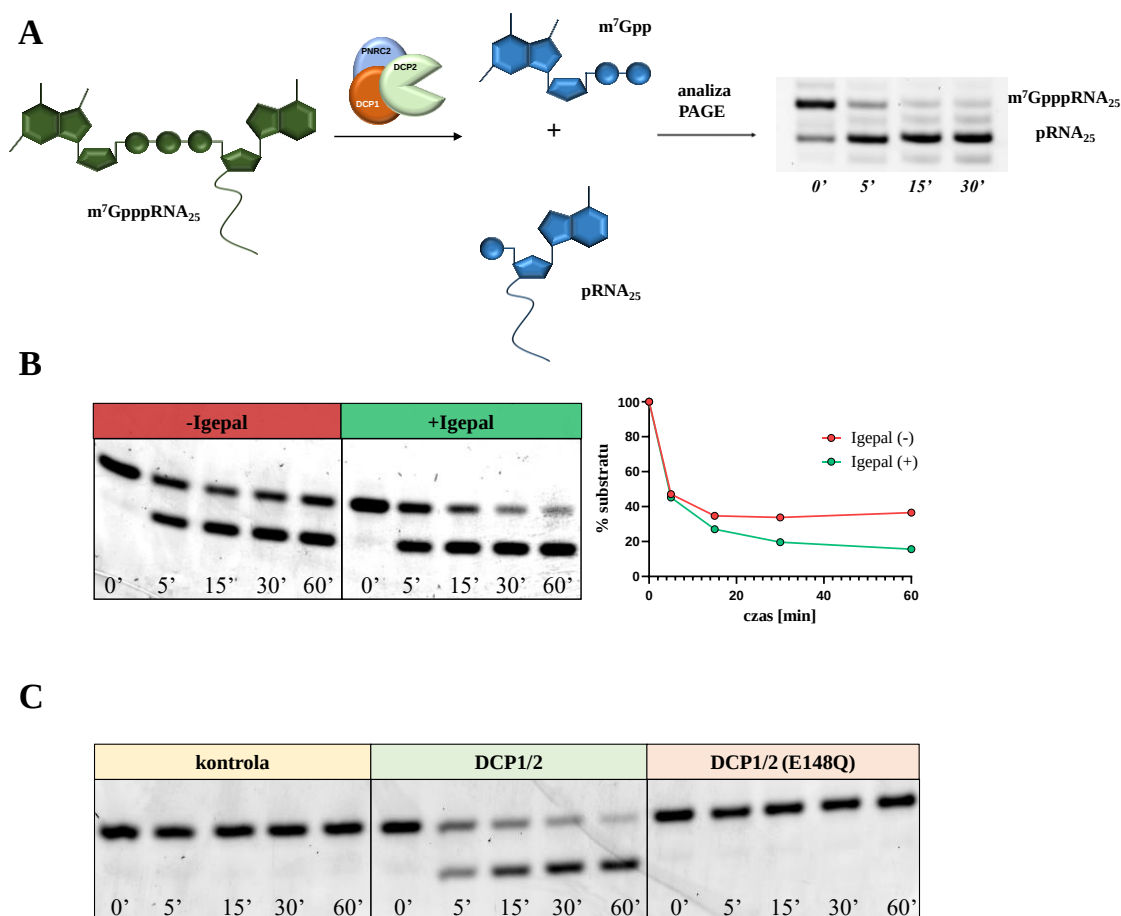
wyznaczonego parametru IC_{50} , ale również budowę związku (starano się wybrać związki najbardziej zróżnicowane pod względem struktury). Finalnie, zbadano cztery związki: Suramin (P15G3, $IC_{50} = 0,014 \pm 0,002$), Myricetin (P10B11, $IC_{50} = 1,20 \pm 0,07$), Cefsulodin (P4B10, $IC_{50} = 2,1 \pm 0,3$) oraz GW5074 (P7C11, $IC_{50} = 2,6 \pm 0,1$). Ich struktury przedstawiono na Rys. 57.



Rys. 57. Struktury czterech związków wybranych z grupy najsilniejszych inhibitorów enzymu DCP2 wytypowanych do weryfikacji metodą dekapingu na krótkim substracie RNA.

Schemat eksperymentu wyglądał następująco – kapowany substrat RNA o długości 26 nukleotydów inkubowano przez godzinę z kompleksem DCP1/2 w obecności zidentyfikowanego inhibitora (w stężeniu 1, 10 lub 100 μM). W określonych punktach czasowych z reakcji pobierano próbki, które na chwilę umieszczano w ciekłym azocie, aby inaktywować enzym i analizowano techniką elektroforezy w żelu akrylamidowym, PAGE (Rys. 58A). Prążki odpowiadające substratowi i produktowi reakcji dekapingu były analizowane densytometrycznie i przedstawione na wykresie jako procentowy zanik substratu RNA w funkcji czasu. Wstępne eksperymenty przeprowadzono w warunkach zoptymalizowanych dla opracowanej metody FLINT, jednak zauważono, że w trakcie trwania eksperymentu enzym traci swoją aktywność, a reakcja dekapingu zatrzymuje się po pierwszych pięciu minutach i nie postępuje dalej. Postanowiono więc sprawdzić, czy w tym przypadku dodatek detergentu nie wpłynie korzystnie na stabilność kompleksu DCP1/2. Okazało się, że niewielki dodatek niedenaturującego detergentu, Igepal CA-630, znacząco polepsza przebieg reakcji, zapobiegając dezaktywacji białka już na początku reakcji (Rys. 58B). Dodatkowo, sprawdzono również, czy degradacja substratu RNA w czasie jest specyficzna względem aktywności hydrolitycznej kompleksu DCP1/2,

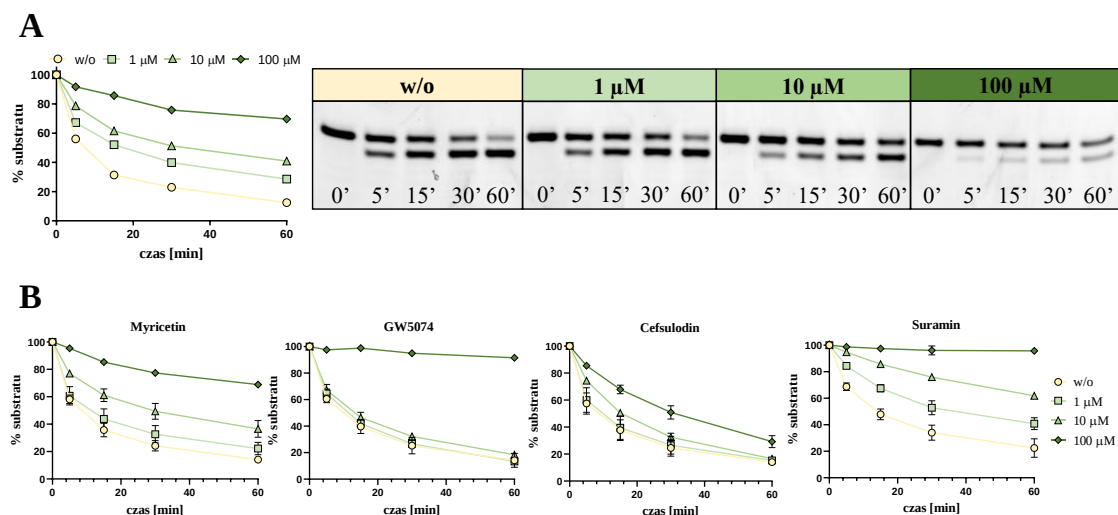
przeprowadzając dwie analogiczne reakcje – jedną bez udziału enzymu, a drugą z dodatkiem nieaktywnego katalitycznie mutanta. W obu przypadkach substrat pozostawał nietknięty w czasie 60 minut trwania reakcji (Rys. 58C).



Rys. 58. A) Schemat eksperymentu dekapiingu krótkich substratów RNA. Kapowany substrat RNA o długości 26 nt został poddany hydrolizie przez kompleks DCP1/2. W określonych punktach czasowych reakcję zatrzymywano, a jej postęp sprawdzano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE). **B) Wpływ detergentu na postęp reakcji dekapiingu RNA.** Dodatek detergentu Igepal widocznie poprawił stabilność enzymu w mieszaninie reakcyjnej i umożliwił śledzenie postępu reakcji dekapiingu w ciągu 60 min. Warunki reakcji: 20 ng m⁷G-RNA₂₅, 15nM DCP1/2 w 50 mM Tris pH 8, 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂ i 1 mM DTT oraz z dodatkiem lub bez 0,01% Igepal. **C) Potwierdzenie specyficzności hydrolizy substratu RNA przez kompleks DCP1/2.** Od lewej: reakcja w buforze bez enzymu, reakcja z 15 nM kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2, na końcu reakcja z 15 nM nieaktywnego mutanta kompleksu E148Q.

Mając wybrane warunki reakcji, przeprowadzono właściwy eksperyment. Jego wynik potwierdził właściwości inhibitorowe wszystkich testowanych związków i koresponduje on z wynikami otrzymanymi metodą FLINT. Najsilniejszym inhibitorem, który hamował aktywność kompleksu DCP1/2 nawet przy najniższym stężeniu była suramina (Suramin), a jej potencjał inhibujący wzrastał wraz z użytym stężeniem. Na uwagę zasłużył również przedstawiciel flawonoidów, Myricetin, który również wykazał całkiem przyzwoite właściwości inhibitorowe. Ciekawym przypadkiem jest związek GW5074, który dla niższych stężeń praktycznie nie miał wpływu na przebieg reakcji, ale użyty w stężeniu

100 μM zahamował reakcję dekapingu RNA praktycznie całkowicie. Jest to heterocykliczny związek zawierający w swojej strukturze podstawniki fluorowcowe, które mogą oddziaływać z celem białkowym poprzez formowanie wiązań halogenowych – podejście to jest coraz częściej stosowane w projektowaniu nowych leków w celu zwiększenia selektywności i powinowactwa wiązania.



Rys. 59. Potwierdzenie właściwości hamujących aktywność kompleksu PNRC2-DCP1-DCP2 zidentyfikowanych inhibitorów w eksperymencie dekapingu na krótkim substracie RNA. A) Reprezentatywny żel z pojedynczego eksperymentu ze związkiem Myricetin (z prawej) oraz analiza densytometryczna intensywności prążków (z lewej). B) Potwierdzenie właściwości inhibitorowych czterech wyselekcjonowanych związków.

4. PODSUMOWANIE

Celem zaprezentowanej rozprawy doktorskiej było wykorzystanie metod biofizycznych do identyfikacji nowych, selektywnych inhibitorów białek zaangażowanych w degradację końca 5' mRNA o znaczeniu terapeutycznym. Mowa tu o dwóch białkach z rodziny hydrolaz Nudix – wirusowym enzymie dekapującym z wirusa ospy krowiej, D9 oraz ludzkiej hydrolazie DCP2, która w organizmie działa jako część większego kompleksu białkowego (w badaniach wykonanych w ramach niniejszej dysertacji wykorzystano jego uproszczony model, składający się z enzymu DCP2 oraz dwóch białek „pomocniczych” – PNRC2 oraz DCP1). Naturalnym więc wydawał się podział rozprawy na dwie części, z których każda dotyczyła badań nad innym enzymem. Każda z nich obejmowała:

- zaprojektowanie uniwersalnej metody FLINT do badania aktywności modelowych enzymów, zarówno w trybie jakościowym, jak i ilościowym,
- wykorzystanie opracowanej metody do wysokoprzepustowych badań inhibitorowych, których celem było przeszukanie komercyjnej biblioteki związków i wyodrębnienie z niej cząsteczek o potencjale inhibitorowym – badania jakościowe,
- zastosowanie wyżej wymienionej metody do dokładniejszej charakterystyki wyselekcjonowanych związków – wyznaczenie dla nich wartości parametru IC_{50} , będącego miarą siły danego inhibitora – badania ilościowe,
- weryfikację wyników badań inhibitorowych niezależną metodą degradacji krótkich fragmentów RNA.

Największe wyzwanie tego projektu doktorskiego stanowiło opracowanie oraz optymalizacja metody do badania każdego z białek. Ze względu na wysoką czułość, selektywność oraz prostotę detekcji zdecydowano się na głębszą eksplorację metod opartych na pomiarze intensywności fluorescencji (FLINT). Kluczowym punktem wybranej strategii było wyselekcjonowanie odpowiedniej sondy fluorescencyjnej w taki sposób, aby po pierwsze, była ona rozpoznawana przez badane białko, a po drugie, generowała mierzalny sygnał fluorescencji, zmieniający swoją intensywność pod wpływem zachodzenia reakcji enzymatycznej. Okazało się, że w przypadku obu testowanych enzymów te dwa warunki są spełnione przez ten sam związek oparty na strukturze trifosforanu 7-metyloguanozyny wyznakowanego pirenem, m^7GTP -Py. Początkowo nie było to jednak takie oczywiste, ponieważ naturalnymi substratami zarówno D9, jak i DCP2 są cząsteczki długiego, kapowanego mRNA. Nie było zatem pewności, że hydrolazy te zaakceptują jako swój substrat stosunkowo niewielki nukleotyd. Źródłem mierzalnego sygnału jest połączony ze strukturą sondy za pomocą

linkera znacznik fluorescencyjny. Spośród kilku testowanych i najczęściej używanych w tego typu badaniach barwników fluorescencyjnych to właśnie piren wykazał najlepsze parametry emisyjne, co skutkowało ponad 10-krotnym wzrostem sygnału fluorescencji wynikającym z hydrolizy sondy katalizowanej przez badane enzymy. Było to możliwe dzięki unikalnej własności pirenu, jaką jest tworzenie silnych oddziaływań wygaszających między znacznikiem a 7-metyloguanozyną. Dzięki temu fluorescencja pirenu wolnej sondy była wygaszana przez zasadę azotową, a wraz z postępem reakcji enzymatycznej następowało „uwolnienie” monofosforanu z barwnikiem i przywrócenie jego fluorescencji. Kolejnym bardzo wymagającym i czasochłonnym etapem był proces optymalizacji reakcji hydrolizy. To, że stężenia głównych reagentów, jak i kofaktorów w postaci jonów metali mocno wpływają na kinetykę reakcji jest rzeczą oczywistą. Okazało się jednak, że tak subtelne zmiany, jak bardzo niewielki dodatek innych czynników, np. BSA czy detergentu w mieszaninie, może bardzo znacząco rzutować na jakość rejestrowanego sygnału. Szczególnie duży nacisk położono również na uniwersalność opracowywanej metody pod kątem jej użyteczności zarówno w badaniach wysokoprzepustowych do szybkiego i wydajnego testowania dużych bibliotek związków, jak i do bardziej szczegółowej analizy zidentyfikowanych inhibitorów prowadzącej do wyznaczenia dla nich ilościowego parametru IC_{50} , będącego miarą siły danego inhibitora.

Poniżej podsumowano najważniejsze osiągnięcia pierwszej części projektu doktorskiego dotyczącej badań wirusowego enzymu D9:

- Opracowano metodę FLINT do badania aktywności enzymu D9 przy użyciu małowzrostkowej sondy nukleotydowej wyznakowanej pirenem. Zweryfikowano jakość zoptymalizowanej metody, wyznaczając parametr Z' , który wyniósł 0,75, co oznacza, że mogła być ona wykorzystana w wysokoprzepustowych badaniach HTS.
- Zebrano i przetestowano niewielką bibliotekę 48 nukleotydów (zarówno niemodyfikowanych, jak i zawierających modyfikacje w różnych pozycjach), aby dodatkowo zweryfikować poprawność metody oraz poznać preferencje substratowe D9 względem jego potencjalnych inhibitorów. Dla każdego związku (o ile było to możliwe), wyznaczono parametr IC_{50} – parametr ten zawierał się w zakresie 0,077 μM – 100 μM , co pokazuje, że opracowana metoda może być zastosowana do charakteryzowania związków o różnej sile inhibowania enzymu. Efektem tych badań było zidentyfikowanie 9 związków o $IC_{50} < 4 \mu\text{M}$, z czego ponad połowę (5) stanowią mononukleotydy. Wśród najsilniejszych inhibitorów znajdują się związki zawierające w swojej strukturze 7-metyloguanozynę oraz minimum trzy grupy fosforanowe w mostku, co sugeruje, że są to elementy kluczowe do silnego oddziaływania z enzymem. Obecność grupy metylowej

w pozycji 2'-O rybozy 7-metyloguanozyny dodatkowo zwiększała właściwości inhibitorowe.

- Użyteczność opracowanej metody HTS zademonstrowano, wykonując wysokoprzepustowe badania przesiewowe komercyjnej biblioteki związków LOPAC^{®1280}. Spośród ponad 1000 związków wyselekcjonowano 6 potencjalnych inhibitorów, które następnie poddano dalszej ewaluacji poprzez wyznaczenie dla nich parametru IC_{50} . Trzy najlepsze związki to pochodna adeninowa Seliciclib ($IC_{50} = 0,57 \pm 0,05 \mu M$), pochodna chinazolinowa CP-100356 ($IC_{50} = 2,7 \pm 0,7 \mu M$) oraz pochodna purynowa SCH 58261 ($IC_{50} = 4,5 \pm 0,8 \mu M$).
- Właściwości inhibitorowe najlepszych związków wyselekcjonowanych w badaniach wysokoprzepustowych (trzy związki z biblioteki LOPAC oraz najsilniejszy inhibitor nukleotydowy, $m^7GpppCH_2p$) zostały w następnym etapie zweryfikowane niezależną metodą – sprawdzono ich wpływ na reakcję dekapingu cząsteczek krótkiego, kapowanego RNA przez enzym D9. Wszystkie testowane związki potwierdziły swoją aktywność hamującą względem aktywności hydrolitycznej D9, a ich potencjał inhibicyjny korespondował z wartościami IC_{50} wyznaczonymi za pomocą opracowanej metody FLINT.
- Ponadto, niewątpliwą wartością dodaną w tej części projektu było zaprezentowanie wyników badań strukturalnych wykonanych przez współpracowników z laboratorium prof. Grossa z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco. Uzyskana struktura krystaliczna enzymu D9 z jednym ze zidentyfikowanych małowcząsteczkowych inhibitorów, CP-100356, pozwoliła rzucić nieco światła na mechanizm inhibicji tego enzymu – inhibitor blokuje enzym w nieaktywnej konformacji, angażując dwie aromatyczne reszty aminokwasowe (F54 oraz Y158), które są odpowiedzialne za rozpoznanie i związanie struktury 5' kapu oddziaływaniami warstwowymi (*stackingowymi*).

Druga część projektu doktorskiego dotyczyła badań ludzkiego enzymu dekapującego DPC2 w kompleksie z białkami: DCP1 oraz PNRC2. Podsumowując najistotniejsze uzyskane wyniki:

- Opracowano i zoptymalizowano metodę do monitorowania aktywności ludzkiego kompleksu dekapującego PNRC2-DCP1-DCP2: metoda charakteryzowała się wysoką jakością – wyznaczony parametr Z' wyniósł 0,75, co pozwoliło na zastosowanie jej w badaniach HTS i gwarantowało uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników.
- Funkcjonalność opracowanej metody zweryfikowano testując niewielką bibliotekę złożoną z 37 związków pochodzenia nukleotydowego. Najsilniejszym nukleotydowym inhibitorem enzymu DCP2 okazał się $m^7Gpspppsm^7G$, który

jako jedyny osiągnął IC_{50} poniżej 1 μM ($IC_{50} = 0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Ten sam związek, a właściwie jeden z jego izomerów, został również zidentyfikowany jako silny inhibitor drożdżowego kompleksu Dcp1/2, co zostało zaraportowane w literaturze [156]. Modyfikacje mostkowe ($-\text{CH}_2$, $-\text{CF}_2$, $-\text{CCl}_2$) negatywnie wpływają na interakcje z białkiem, a im większy podstawnik ($\text{H} < \text{F} < \text{Cl}$), tym to oddziaływanie jest silniej zaburzone, co ma swoje odzwierciedlenie w wysokich wartościach parametru IC_{50} .

- Wykonano skrining komercyjnej biblioteki małowcząsteczkowych związków LOPAC^{®1280}, w wyniku którego dalszej ewaluacji poddano finalnie 26 cząsteczek, które hamowały kontrolną reakcję hydrolizy sondy w co najmniej 80%. Związki te scharakteryzowano przez wyznaczenie dla nich parametru IC_{50} (udało się to zrobić dla 21 z nich) – zawierał się on w zakresie 0,014 μM – 57 μM . Do najsilniejszych inhibitorów enzymu DCP2 o $IC_{50} < 2 \mu\text{M}$ należały: Suramin ($IC_{50} = 0,014 \pm 0,002 \mu\text{M}$), Nordihydroguaiaretic acid ($IC_{50} = 0,38 \pm 0,03 \mu\text{M}$), Quercetin ($IC_{50} = 0,86 \pm 0,04 \mu\text{M}$), Galloflavin ($IC_{50} = 0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$), Tyrphostin 51 ($IC_{50} = 0,94 \pm 0,07 \mu\text{M}$), Hispidin ($IC_{50} = 0,97 \pm 0,11 \mu\text{M}$), Piceatannol ($IC_{50} = 1,01 \pm 0,03 \mu\text{M}$), Gossypol ($IC_{50} = 1,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$), Myricetin ($IC_{50} = 1,20 \pm 0,07 \mu\text{M}$)
- Z grupy najsilniejszych inhibitorów DCP2 zidentyfikowanych w badaniach HTS biblioteki LOPAC wytypowano cztery związki i potwierdzono ich właściwości inhibitorowe w eksperymentach na krótkim substracie RNA. Były to wspomniane już wcześniej: Suramin i Myricetin, a także Cefsulodin ($IC_{50} = 2,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$) oraz GW5074 ($IC_{50} = 2,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Wszystkie związki wykazywały właściwości hamujące aktywność DCP2, a siła inhibicji dość mocno zależała od użytego stężenia.
- Odkryte inhibitory wykorzystywane są do prób krystalizacji z enzymem DCP2 – określenie dokładnej struktury takiego oddziaływania na poziomie atomowym pozwoliłoby powiązać ją z aktywnością danego inhibitora i umożliwiłoby projektowanie nowych struktur celujących w DCP2, które w przyszłości mogą stać się potencjalnymi terapeutykami.
- Zidentyfikowane inhibitory mogą również znaleźć zastosowanie jako narzędzia do monitorowania aktywności DCP2 w różnych układach – po odpowiedniej modyfikacji, np. znakowaniu fluorescencyjnym mogą pełnić rolę sond/próbników do śledzenia enzymu w komórkach.
- Opracowana metoda posłuży do dalszego poszukiwania i ewaluacji inhibitorów nie tylko DCP2, ale również innych enzymów o podobnej aktywności.

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

5.1 SPEKTROFOTOMETRYCZNE OZNACZANIE STĘŻEŃ

Stężenia związków pochodzenia nukleotydowego używanych w badaniach inhibicji były wyznaczane spektrofotometrycznie na podstawie prawa Lamberta-Beera:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l,$$

gdzie: A – absorbancja, c – stężenie badanego związku, ε – molowy współczynnik ekstynkcji, l – długość drogi optycznej.

Pomiary absorbancji wykonano na aparacie Shimadzu 1800 UV-Vis w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 10 mm (HL114B-10-40, Hellma). Mononukleotydowe analogi zawierające 7-metyloguanozynę oraz fluorescencyjna sonda ze znacznikiem pirenowym (m^7 GTP-Py) były mierzone w 0,1 M buforze fosforanowym pH 6,0, natomiast mononukleotydy zawierające guanozynę oraz dinukleotydy - w 0,1 M buforze fosforanowym pH 7,0.

5.2 MATERIAŁY BIOLOGICZNE

Plazmidy ekspresyjne zawierające sekwencje kodujące wirusowy enzym dekapujący D9 (pET28a_D9_CHis) oraz ludzki kompleks dekapujący PNRC2-DCP1/DCP2 (pET_PNRC_Dcp2/Trx_Dcp1), a także porcję wirusowego enzymu dekapującego D10 uzyskano dzięki uprzejmości prof. Johna Grossa z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco.

Ekspresję oraz oczyszczanie białka D9 oraz kompleksu PNRC2-DCP1/DCP2 wykonał mgr Tomasz Śpiwła w Laboratorium Chemii Biologicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Ekspresję oraz oczyszczanie białka D10 wykonała dr Jessica Peters w laboratorium prof. Johna Grossa na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Francisco.

5.2.1 WIRUSOWY ENZYM DEKAPUJĄCY D9

Ekspresję rekombinowanego enzymu D9 przeprowadzono w komórkach *E. coli* w szczepie bakteryjnym BL21(DE3)RIL. Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 200 obr./min w pożywce LB z dodatkiem kanamycyny (50 µg/mL) aż do osiągnięcia gęstości optycznej bakterii (OD_{600}) w zakresie 0,5-0,7. Po osiągnięciu tej wartości hodowlę indukowano przy użyciu 0,3 M IPTG (izopropylo-β-D-1-tiogalaktopiranozydu) i kontynuowano wytrząsanie (200 obr./min),

zmniejszając temperaturę do 18°C i zostawiając hodowlę na noc (o/n). Następnego dnia hodowlę zwirowano (15 min, 4°C, 7000×g), supernatant usunięto, a otrzymany pelet zawieszono w buforze do lizy (50 mM Hepes pH 7,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM β-merkaptioetanol, 10% glicerol) z dodatkiem inhibitorów proteaz (1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptyny oraz 1 µg/mL pepstatyny A) i sonikowano (10 min, 15s on/off, moc 45%). Lizat zwirowano (30 min, 4°C, 40000×g) i zebrano supernatant, który następnie oczyszczono przy użyciu aparatu ÄKTA pure™ (Cytiva). Supernatant zawierający rekombinowane białko D9 oczyszczono dwuetapowo techniką chromatografii powinowactwa – w pierwszym etapie na kolumnie HisTrap HP (GE Healthcare) ze złożem Ni-NTA wypełnionej **buforem NiA** (białko eluowano **buforem NiB**), a następnie na kolumnie HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) wypełnionej **buforem HA** (białko eluowano **buforem HB**). W ostatnim kroku zastosowano filtrację żelową – białko nałożono na kolumnę HiLoad 16/600 75 µg (GE Healthcare) i eluowano **buforem S**. Frakcje zawierające czyste białko połączono i zatężono na filtrach wirówkowych (Amicon, odcięcie: 10 kDa) i dodano glicerolu do finalnego stężenia 10% (v/v). Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu urządzenia NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), przyjmując współczynnik ekstynkcji $\epsilon_{280\text{nm}} = 14900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Białko następnie podzielono na porcje i przechowywano w temperaturze -80°C.

Bufory używane do oczyszczania:

Bufor NiA: 50 mM Hepes pH 7,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10% glicerol

Bufor NiB: 50 mM Hepes pH 7,0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 10% glicerol

Bufor HA: 20 mM Hepes pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol

Bufor HB: 20 mM Hepes pH 7,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol

Bufor S: 10 mM MES pH 6,0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT

5.2.2 LUDZKI KOMPLEKS DEKAJUJĄCY PNRC2-DCP1/DCP2

Ekspresję rekombinowanego kompleksu enzymatycznego PNRC2-DCP1/DCP2 przeprowadzono w komórkach *E. coli* w szczepie bakteryjnym BL21(DE3)RIL. Hodowlę bakteryjną inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 220 obr./min w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny (100 µg/mL). Po uzyskaniu gęstości optycznej $\text{OD}_{600} \sim 0,5$, hodowlę schłodzono do temperatury 20°C i kontynuowano inkubację aż do osiągnięcia wartości OD_{600} w zakresie 0,6-0,7. Ekspresję kompleksu białkowego zaindukowano przy użyciu 1 mM IPTG i prowadzono przez 16 godzin (o/n). Następnie komórki zwirowano (15 min, 4°C, 7000×g), supernatant odrzucono, a pelet bakteryjny zawieszono w buforze do lizy (50 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM DTT,

5% glicerol) z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Do zawiesiny bakteryjnej dodano inhibitorów proteaz (1 mM PMSF, 10,5 μ M leupeptyny i 1 μ M pepstatyny A) oraz lizozymu (1 mg/mL) i inkubowano na lodzie przez 20 minut. Po tym czasie bakterie sonikowano (10 min, 15s on/off, moc 45%), a powstały lizat zwirowano (30 min, 4°C, 40000 $\times$ g). Supernatant zawierający docelowy kompleks białkowy zebrano i oczyszczono przy użyciu systemu ÄKTA pure™ (Cytiva) metodą chromatografii powinowactwa oraz filtracji żelowej. Próbkę najpierw nałożono na kolumnę powinowactwa HisTrap HP (GE Healthcare) wypełnioną **buforem NiA-2** i eluowano **buforem NiB-2**. Otrzymany eluat nałożono następnie na kolumnę powinowactwa HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) wypełnioną **buforem HA-2** i eluowano **buforem HB-2**. Ostatnim etapem była filtracja żelowa na kolumnie HiLoad Superdex 16/600 200 pg (GE Healthcare), z której finalny produkt białkowy wyeluowano **buforem S-2**. Odpowiednie frakcje zawierające oczyszczony kompleks połączono, zatężono na filtrach wirówkowych (Amicon, odcięcie: 30 kDa) i dodano glicerolu do finalnego stężenia 20% (v/v). Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu urządzenia NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), przyjmując współczynnik ekstynkcji $\epsilon_{280\text{nm}} = 82445 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Białko podzielono na porcje i przechowywano w temperaturze -80°C.

Bufory używane do oczyszczania:

Bufor NiA-2: 50 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 1 M NaCl, 30 mM imidazol, 1 mM DTT

Bufor NiB-2: 50 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, 1 mM DTT

Bufor HA-2: 50 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT

Bufor HB-2: 50 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM DTT

Bufor S-2: 50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT

5.2.3 WIRUSOWY ENZYM DEKAPUJĄCY D10

Ekspresję rekombinowanego enzymu D10 przeprowadzono w komórkach *E. coli* w szczepie bakteryjnym BL21(DE3)RIL. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny (100 μ g/mL) oraz 0,2% (w/v) glukozy do momentu osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} \sim 0,5-0,7$. Następnie kolby z hodowlą chłodzono przez 30 minut. Po tym czasie ekspresję białka zaindukowano przy użyciu 0,1 mM IPTG i kontynuowano inkubację z wytrząsaniem w temperaturze 18°C przez noc (o/n). Następnego dnia hodowlę zwirowano (30 min, 4°C, 3500 obr./min), a otrzymany pelet zawieszono w buforze do lizy (50 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl,

10 mM β -merkaptotoetanol, 10% glicerol, 1% Triton X-100) z dodatkiem inhibitorów proteaz (1 mM PMSF, 1 μ g/mL leupeptyny oraz 1 μ g/mL pepstatyny A). Lizat zwirowano (40 min, 4°C, 14500 obr./min) i zebrano supernatant, który następnie oczyszczono kolejno na kolumnie powinowactwa MBPTrap HP (GE Healthcare) wypełnionej **buforem A** (białko eluowano **buforem B**), a następnie na kolumnie powinowactwa HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) wypełnionej **buforem HA** (białko eluowano **buforem HB**). Frakcje zawierające czyste białko połączono i zatężono, a następnie wymieniono bufor na 10 mM Hepes pH 7, 500 mM NaCl, 1 mM DTT. Białko podzielono na porcje i przechowywano w temperaturze -80°C.

Bufory używane do oczyszczania:

Bufor A: 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol

Bufor B: 20 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol, 1% (w/v) maltoza

Bufor HA: 20 mM Hepes pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol

Bufor HB: 20 mM Hepes pH 7, 1 M NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol

5.3 SYNTEZA SOND FLUORESCENCYJNYCH

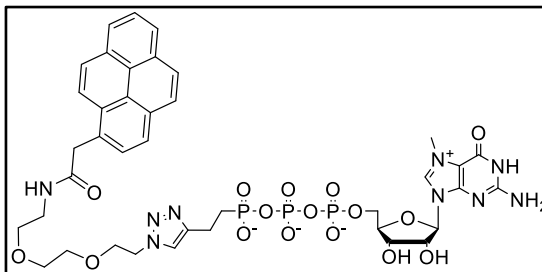
Wszystkie rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne do syntezy sond **1b** oraz **1c** zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Znaczniki: piren (Pyrene azide 2, numer katalogowy: 2530) oraz perylen (Perylene azide, numer katalogowy: 5530) zostały zakupione w Lumiprobe.

Sondy fluorescencyjne były analizowane i oczyszczane techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP HPLC) na aparacie Agilent Tech Series 1200. Do rozdzielania analitycznych używano kolumny Supelcosil LC-18-T (4,6 $\times$ 250 mm, przepływ 1,3 mL/min) z liniowym gradientem acetonitrylu (0–100% od 0 do 15 min) w 0,05 M buforze octanu amonu (pH 5,9). Detekcja absorpcji była prowadzona dla długości fali 254 nm, a także dla maksimum absorpcji znacznika (Py – $\lambda_{\text{max}} = 345$ nm, Pe – $\lambda_{\text{max}} = 435$ nm). Detekcja fluorescencji była wykonywana dla maksimum emisji znacznika: $\lambda_{\text{em}} = 380$ nm dla pirenu oraz $\lambda_{\text{em}} = 467$ nm w przypadku perylenu. Do rozdzielania półpreparatywnych (finalny etap oczyszczania sond) zastosowano kolumnę Grace Vision HT C18 HL (250 $\times$ 22 mm, 10 μ m, przepływ 5 mL/min) lub Gemini NX-C18 (250 $\times$ 10 mm, 5 μ m, przepływ 5 mL/min) z liniowym gradientem acetonitrylu (0–100% od 0 do 120 min) w 0,05 M buforze octanu amonu (pH 5,9) oraz detekcją UV przy 254 nm i przy maksymalnej absorpcji i emisji znacznika fluorescencyjnego. Struktura i czystość produktów końcowych zostały potwierdzone techniką RP HPLC oraz wysokorozdzielczej spektrometrii masowej HRMS (ESI-) przy użyciu spektrometru mas Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos.

m⁷GTPC₄Py (1b)

Reakcję syntezy sondy **1b** przeprowadzono zgodnie z procedurą opublikowaną przez Kasprzyk i wsp. [163].

Wodny roztwór soli trietyloamonowej m⁷GTPC₄H₅ (3,9 mg, 6,8 μmol) zmieszano ze znacznikiem Py-N₃ (4,8 mg, 11,5 μmol) w 60 μL DMSO, a następnie dodano 6 μL 1 M wodnego roztworu CuSO₄·5H₂O (2,5 mg, 6 μmol) oraz 12 μL

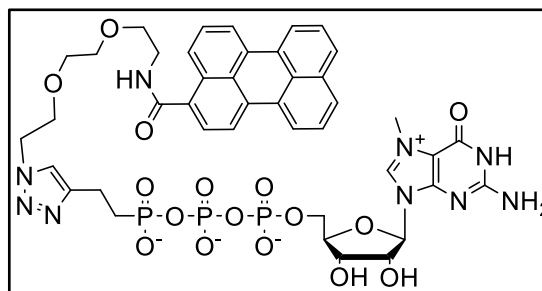


1 M wodnego roztworu askorbinianu sodu (2,4 mg, 12 μmol) i dopełniono DMSO do objętości 80 μL. Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez ~20 godzin z wytrząsaniem 300 rpm. Po tym czasie reakcję zatrzymano, dodając do mieszaniny 100 μL 0,1 M roztworu Na₂EDTA oraz 100 μL wody. Następnie odwirowano nadmiar nieprzereagowanego znacznika pirenowego. Powstały produkt oczyszczono techniką RP HPLC na kolumnie półpreparatywnej. Zebrany eluat poddano trzykrotnej liofilizacji. Otrzymano 3,08 mg (3,12 μmol) związku **1b** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu: 46%

HR MS (-)ESI teoretyczny *m/z* dla: C₃₉H₄₅N₉O₁₆P₃⁻: 988,2203, zmierzony: 988,2218

m⁷GTPC₄Pe (1c)

Zmieszano ze sobą wodny roztwór m⁷GTPC₄H₅ w postaci soli trietyloamonowej (1,5 mg, 2,6 μmol) oraz znacznik Pe-N₃ (2,0 mg, 4,4 μmol) rozpuszczony w 80 μL DMSO. Do powstałej mieszaniny dodano 3 μL 1 M wodnego roztworu CuSO₄·5H₂O (0,8 mg,



3 μmol) oraz 6 μL 1 M askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 μmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez ~24 godziny z wytrząsaniem 300 rpm. Po tym czasie reakcję zatrzymano, dodając do mieszaniny 100 μL 0,1 M roztworu Na₂EDTA oraz 100 μL wody. Następnie odwirowano nadmiar nieprzereagowanego znacznika perylenowego. Powstały produkt oczyszczono techniką RP HPLC na kolumnie półpreparatywnej. Zebrany eluat poddano trzykrotnej liofilizacji. Otrzymano 0,15 mg (0,15 μmol) związku **1c** w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu: 6%

HR MS (-)ESI teoretyczny *m/z* dla C₄₂H₄₅N₉O₁₆P₃⁻: 1024,2203, zmierzony: 1024,2221

5.4 POMIARY SPEKTROSKOPOWE

Widma emisji fluorescencji były rejestrowane na spektrofluorymetrze Cary Eclipse (Agilent) w termostатовanej kuwecie kwarcowej (HL110-10-40, Hellma) o długości drogi optycznej 10 mm w temperaturze 37°C z mieszaniem za pomocą elementu magnetycznego. Sygnał rejestrowano dla długości fali w maksimum wzbudzenia i emisji badanego związku (znacznika fluorescencyjnego). Celem eksperymentu było wyłonienie najlepszej pod względem spektralnym sondy fluorescencyjnej do badania wirusowego enzymu D9 oraz ludzkiego kompleksu Dcp1/2. Sondy zestawiono ze sobą, porównując względną zmianę intensywności fluorescencji pod wpływem ich hydrolizy enzymatycznej. Eksperyment przeprowadzono według następującej procedury: w kuwecie inkubowano przez ok. 5 min roztwór badanej sondy o stężeniu 100 nM w odpowiednim buforze. Po tym czasie dodawano enzymu (finalne stężenie: 50 nM) i uruchamiano rejestrację widm emisyjnych w 1- lub 2-minutowym interwale czasowym. Pomiar prowadzono przez 90 minut.

Warunki eksperymentu dla enzymu D9:

- Bufor: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM MnCl₂
- Interwał: 1 min
- Długości fal wzbudzenia / emisji: **1a** – 490 nm / 512 nm, **1b, 1d, 1e** – 345 nm / 378 nm, **1c** – 420 nm / 489 nm.

Warunki eksperymentu dla kompleksu Dcp1/2:

- Bufor: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 0,01% Igepal
- Interwał: 2 min
- Długości fal wzbudzenia / emisji: **2a-2c** – 345 nm / 378 nm, **2d** – 490 nm / 523 nm, **2e** – 490 nm / 514 nm.

5.5 POMIARY Z WYKORZYSTANIEM HPLC

Rozdziały analityczne były wykonywane na aparacie Agilent Technologies Series 1200 techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP HPLC) przy użyciu kolumny Supercosil LC-18-T (250 × 1,6 mm, 5 µm, przepływ 1,3 mL/min) lub Gemini NX-C18 110Å LC (150 × 4,6 mm, 3 µm, przepływ 1 mL/min). Do elucji stosowano różne układy gradientowe:

Metoda	Bufor A	Bufor B	Gradient buforu B
1	50 mM octan amonu pH 5,9	ACN	100 % w 15 min
2	50 mM octan amonu pH 5,9	MeOH	50% w 15 min

W pomiarach sondy fluorescencyjnej m⁷GTP-Py zastosowano detekcję absorpcji przy 254 nm oraz 345 nm, a także detekcję fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 345 nm oraz emisji 380 nm. W przypadku analogów nukleotydów detekcję absorpcji wykonywano przy długości fali 254 nm, a dodatkowo dla pochodnych 7-metyloguanozyny rejestrowano również sygnał fluorescencyjny (wzbudzenie 280 nm, emisja 370 nm).

5.5.1. MONITOROWANIE HYDROLIZY SONDY M⁷GTP-PY KATALIZOWANEJ PRZEZ D9

Aby potwierdzić regioselektywność hydrolizy sondy pirenowej m⁷GTP-Py przez D9, przeprowadzono reakcję enzymatyczną 100 µM sondy z 25 nM enzymu D9 w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM MnCl₂, 2 mM DTT w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. W określonych punktach czasowych (0, 5, 15, 30 oraz 60 min) pobierano porcję mieszaniny reakcyjnej, termicznie dezaktywowano działanie enzymu (98°C, 3 min) i analizowano przy użyciu RP HPLC. W celu określenia masy i zidentyfikowania masy produkty hydrolizy zostały dodatkowo zanalizowane przy użyciu niskorozdzielczej spektrometrii mas MS ESI(-) na aparacie Sciex QTRAP 3200.

5.5.2. BADANIE PODATNOŚCI ZWIĄZKÓW NUKLEOTYDOWYCH NA HYDROLIZĘ PRZEZ D9

Podatność wybranych związków nukleotydowych, które były testowane jako potencjalne inhibitory, na hydrolizę przez enzym D9 była badana w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM MnCl₂, 2 mM DTT. W próbówce typu Eppendorf inkubowano 30 µM testowanego związku z 25 nM enzymu D9 w temperaturze 37°C przez 2 godziny. W określonych punktach czasowych (0, 30, 60, 90 oraz 120 minut) pobierano porcję mieszaniny reakcyjnej, termicznie dezaktywowano działanie enzymu (98°C, 3 min) i analizowano przy użyciu RP HPLC.

Podatność na hydrolizę określano, obliczając procent przereagowania substratu (%S) według wzoru:

$$\%S = \frac{P_{t_0}}{P_t} \cdot 100\%,$$

gdzie: P_{t_0} – pole powierzchni pod pikiem pochodzącym od substratu w czasie $t=0$ min, P_t – pole powierzchni pod pikiem pochodzącym od substratu w czasie t .

5.6. WYSOKOPRZEPUSTOWA METODA PRZESIEWOWA (HTS)

Wszystkie eksperymenty opisane w podrozdziale 5.6 zostały wykonane przy użyciu czytnika płytek BioTek Synergy™ H1 (Agilent) w 96-dołkowych czarnych płytkach typu „non binding” (Greiner). Punktowe pomiary intensywności fluorescencji wykonywano w 1-minutowych odstępach czasowych dla długości fali wzbudzenia i emisji odpowiadającej barwnikowi sondy fluorescencyjnej – pirenowi ($\lambda_{wzb} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 378 \text{ nm}$). Przed każdym pomiarem (i dodaniem enzymu, który inicjował reakcję) płytka była inkubowana i wytrząsana przez 15 minut w temperaturze 30°C przy prędkości obrotów 300 obr./min w termomikserze Thermo-Shaker PST-60-HL-4 (Biosan).

5.6.1 WYZNACZENIE PARAMETRÓW HYDROLIZY SONDY

Parametry kinetyczne reakcji hydrolizy sondy $m^7\text{GTP-Py}$ przez D9 oraz Dcp1/2 wyznaczono w eksperymencie przeprowadzonym zgodnie z następującą procedurą: w każdej studzience 96-dołkowej płytki przygotowano mieszaninę sondy $m^7\text{GTP-Py}$ w różnych stężeniach (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 μM) oraz enzymu w stałym stężeniu w dedykowanym buforze o całkowitej objętości 150 μL . Rejestrowano zmieniający się sygnał fluorescencji w czasie. Pomiar prowadzono do całkowitego wysycenia sygnału (braku zmian), co pozwoliło na przeliczenie szybkości początkowych reakcji hydrolizy z jednostki au/min na mol/min/mg. Wartości szybkości początkowych wyznaczono, dopasowując krzywą liniową do pierwszych 10 punktów (10 minut) reakcji, a następnie wykreślono zależność szybkości początkowych od stężenia substratu (sondy fluorescencyjnej). Do obliczenia parametrów kinetycznych zastosowano model Michaelisa-Menten, dopasowując wzór do danych doświadczalnych za pomocą oprogramowania GraphPad Prism:

$$V = \frac{E_t k_{cat} C_{probe}}{K_m + C_{probe}} = \frac{V_{max}}{K_m + C_{probe}},$$

gdzie: V – szybkość początkowa reakcji hydrolizy sondy, E_t – stężenie enzymu, k_{cat} – stała katalityczna, C_{probe} – stężenie sondy (substratu), K_m – stała Michaelisa, V_{max} – szybkość maksymalna reakcji hydrolizy sondy.

Szczegółowe warunki eksperymentu dla enzymu D9

Bufor: 10 mM MOPS-HCl, pH 7,0, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl_2 , 0,3 mM MnCl_2 , 2 mM DTT

Stężenie enzymu: 5 nM

Szczegółowe warunki eksperymentu dla kompleksu Dcp1/2

Bufor: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT

Stężenie enzymu: 15 nM

5.6.2 WYZNACZENIE PARAMETRU Z'

Aby wyznaczyć jakościowy parametr Z' wysokoprzepustowej metody HTS, zmierzono zmienność i separację sygnałów pochodzących od kontroli pozytywnej oraz negatywnej. Kontrola pozytywna zawierała mieszaninę sondy fluorescencyjnej m⁷GTP-Py (3 μM) i enzymu (odpowiednio 5 nM D9 oraz 15 nM kompleksu Dcp1/2) w dedykowanym buforze. Kontrola negatywna dodatkowo zawierała inhibitor w stężeniu całkowicie hamującym aktywność enzymu.

Szczegółowe warunki eksperymentu dla enzymu D9

Bufor: 10 mM MOPS-HCl, pH 7,0, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM MnCl₂, 2 mM DTT

Użyty inhibitor: 30 μM m⁷GpppCH₂p

Szczegółowe warunki eksperymentu dla kompleksu Dcp1/2

Bufor: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT

Użyty inhibitor: 35 μM mirycetyny (Miricetin)

Na podstawie zarejestrowanych przebiegów wyznaczono prędkości początkowe reakcji hydrolizy sondy bez i w obecności inhibitora, a następnie dla każdej z grup (kontrola pozytywna / negatywna) wyznaczono wartości średnie i odchylenia standardowe.

Wartość parametru Z' wyznaczono według wzoru:

$$Z' = 1 - \frac{3(SD_{pos} + SD_{neg})}{|M_{pos} - M_{neg}|},$$

gdzie: SD_{pos} / SD_{neg} to odchylenie standardowe kontroli pozytywnej / negatywnej, a M_{pos} / M_{neg} to wartości średnie sygnału kontroli pozytywnej / negatywnej.

5.6.3 BADANIA HTS

Wysokoprzepustowe badania przesiewowe biblioteki związków LOPAC^{®1280} wykonano według następującej procedury: każda studzienka 96-dołkowej płytki zawierała mieszaninę fluorescencyjnego substratu (3 μM m⁷GTP-Py), testowanego związku w stałym, wybranym stężeniu oraz enzymu w odpowiednim buforze do końcowej objętości 150 μL . Na jednej płytce można było przetestować jednocześnie 80 nowych związków. Pozostałe dołki zostały wykorzystane na reakcje kontrolne bez inhibitora lub z dodatkiem zidentyfikowanych już wcześniej inhibitorów. Aby określić względny postęp reakcji, obliczono stosunek szybkości początkowej reakcji z testowanym związkiem do szybkości początkowej reakcji bez inhibitora. Dziewięć z 1280 związków wykazywało interferencję z fluorescencją sondy m⁷GTP-Py, zostały one przetestowane osobno przy różnych ustawieniach odczytu fluorescencji (różne wzmocnienia, z ang. *gain*).

Szczegółowe warunki eksperymentu dla enzymu D9

Bufor: 10 mM MOPS-HCl, pH 7,0, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM MnCl₂, 2 mM DTT

Stężenie enzymu: 5 nM

Stężenie testowanego związku z biblioteki LOPAC: 30 μM

Szczegółowe warunki eksperymentu dla kompleksu Dcp1/2

Bufor: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT

Stężenie enzymu: 15 nM

Stężenie testowanego związku z biblioteki LOPAC: 20 μM

5.6.4 WYZNACZANIE PARAMETRU IC_{50}

Parametr IC_{50} będący miarą aktywności inhibitorowej testowanych związków został wyznaczony w eksperymencie zgodnie z następującą procedurą: każdy dołek płytki eksperymentalnej zawierał dedykowany do konkretnego enzymu bufor, fluorescencyjną sondę m⁷GTP-Py w stałym stężeniu (3 μM), enzym w stałym stężeniu oraz badany inhibitor – każdy związek był testowany w serii rozcieńczeń od 3,1 nM do 100 μM (zastosowano rozcieńczenia w skali półlogarytmicznej). Analizę wyników wykonano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism. Na podstawie otrzymanych przebiegów reakcji wyznaczono wartości prędkości początkowych dla każdego testowanego stężenia inhibitora, dopasowując funkcję liniową do pierwszych 10 punktów (prostoliniowy

przebieg zmian intensywności fluorescencji w czasie). Znормowane do wartości prędkości bez inhibitora dane wykreślono w funkcji stężenia inhibitora. W przypadku inhibitorów nukleotydowych założono kompetycyjny model inhibicji i do danych dopasowano równanie:

$$\frac{V}{V_0} = I_{min} + \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + \frac{C_{inh}}{IC_{50}}},$$

gdzie: $\frac{V}{V_0}$ – względna szybkość początkowa reakcji, I_{min} oraz I_{max} – minimalna oraz maksymalna odpowiedź układu (dolny i górny poziom plateau), C_{inh} – stężenie testowanego inhibitora, IC_{50} – wartość stężenia hamującego w 50%.

W przypadku testowania związków z biblioteki LOPAC^{®1280} do danych eksperymentalnych dopasowano model inhibicji ze zmiennym współczynnikiem Hilla (p):

$$\frac{V}{V_0} = I_{min} + \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C_{inh}}\right)^p}.$$

Szczegółowe warunki eksperymentu dla enzymu D9

Bufor: 10 mM MOPS-HCl, pH 7,0, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM MnCl₂, 2 mM DTT

Stężenie enzymu: 5 nM

Szczegółowe warunki eksperymentu dla kompleksu Dcp1/2

Bufor: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT

Stężenie enzymu: 15 nM

5.7 SYNTEZA RNA

Krótkie kapowane sekwencje RNA o długości 35 nukleotydów były zsyntetyzowane w reakcji *in vitro* transkrypcji (IVT) z użyciem promotora Φ 2.5 polimerazy RNA T7 klasy II (TAATACGACTCACTATTA) inicjowanej przez przyłączenie ATP [174]. Przykładowa reakcja IVT w objętości 200 μ L była prowadzona przez 4 h w temperaturze 37°C i zawierała: 5 mM każdego z nukleotydów GTP/CTP/UTP (Thermo Fisher Scientific), 1,25 mM ATP (Thermo Fisher Scientific), a także 6,5 mM trinukleotydowego analogu kapu (m⁷GpppApG, zbiory laboratorium), 1 μ M zhybrydowanych nici oligonukleotydowych jako matrycy DNA (CAGTAATACGACTCACTATTAGGGAAGCGGGCATGCGGCCAGCCATAGCC GATCA oraz TGATCGGCTATGGCTGGCCGCATGCCCCGCTTCCCTAATAGTGAGTCGTATTA

CTG, Genomed), 1 U/ μ L inhibitora rybonukleaz Ribolock (Thermo Fisher Scientific), 20 mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich) oraz 20 U/ μ L polimerazy T7 (Thermo Fisher Scientific). Niekapowane transkrypty zostały przygotowane w sposób analogiczny jak opisano powyżej z jedną tylko różnicą – końcowe stężenie ATP wynosiło 5 mM oraz do reakcji nie był dodawany analog kapu. Po 4 h inkubacji do reakcji dodano 7 U DNazy I (Thermo Fisher Scientific) w celu usunięcia matrycy DNA i pozostawiono w temperaturze 37°C na kolejne 30 min. Po tym czasie reakcja IVT została zahamowana poprzez dodanie równomolowych ilości wodnego roztworu Na_2EDTA w celu skompleksowania jonów magnezu. RNA zostało następnie wyizolowane z mieszaniny reakcyjnej metodą ekstrakcji fenol-chloroform i strącone przy użyciu 3 M $NaOAc$ pH 5,2 oraz etanolu. Taki surowy produkt RNA został następnie oczyszczony metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz (RP-HPLC, szczegóły rozdziału podane na końcu akapitu) z detekcją UV przy 254 nm i strącony jak opisano wcześniej. Aby otrzymać zestaw homogennych na końcu 3' krótkich transkryptów RNA, odpowiednią próbkę poddano trawieniu przez DNazym (inaczej deoksyrybozym, krótka sekwencja DNA posiadająca katalityczną aktywność, np. cięcia łańcucha RNA; DNazym 10-23: TGATCGGCTAGGCTAGCTACAACGAGGCTGGCCGC, Genomed). Mieszanina reakcyjna zawierała równomolowe stężenia substratu RNA oraz DNazymu w odpowiednim buforze i była inkubowana przez 1 h w temperaturze 37°C. Mieszanina poreakcyjna została następnie oczyszczona przy użyciu HPLC w układzie odwróconych faz (metoda poniżej), a produkt końcowy został wyizolowany poprzez wytrącanie jak to opisano wyżej. Procedura ta pozwoliła uzyskać homogenne na końcu 3' 25-nt (niekapowane) lub 26-nt (kapowane) transkrypty RNA. Jakość otrzymanych próbek potwierdzono na żelu poliakrylamidowym (15% akrylamid, 7 M mocznik, bufor TBE) wybarwionym przy użyciu barwnika SYBR Gold (Invitrogen), a stężenie wyznaczono spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Bufor do reakcji IVT: 40 mM Tris pH 7,9, 60 mM $MgCl_2$, 20 mM spermidyna, 10 mM DTT

Bufor do reakcji z DNazymem: 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM $MgCl_2$

Bufor TBE: 89 mM Tris, 89 mM boran, 2 mM EDTA, pH 8,2

Oczyszczanie finalnych związków przy użyciu RP-HPLC:

- Aparat: Agilent Technologies Series 1200 lub Shimadzu LC-40 Series
- Detekcja UV: 254 nm
- Kolumna: Phenomenex Clarity 3 μ M Oligo-RP, 150 x 4,66 mm, przepływ 1 mL/min

- Metoda: bufor A - 100 mM TEAA, bufor B - 200 mM TEAA/ACN (50:50, v/v); gradient: 10–30% buforu B w 30 min.

5.9 TEST IN VITRO DEGRADACJI RNA

Aby potwierdzić właściwości inhibitorowe wyselekcjonowanych związków, sprawdzono podatność krótkich cząsteczek kapowanego RNA o długości 26 nukleotydów na dekaping i dalszą degradację w obecności testowanych związków w trzech stężeniach (1, 10 i 100 μ M). W tym celu 20 ng 26-nt kapowanego RNA inkubowano z odpowiednim enzymem dekapującym (3 nM D9, 11 nM Dcp1/2 lub 200 nM D10) w dedykowanym buforze z dodatkiem 0,1% BSA w temperaturze 37°C. W określonych punktach czasowych (0' – przed dodaniem enzymu, 5', 15', 30', 60') porcję reakcji zatrzymywano przez dodanie równej objętości obciążającego barwnika denaturującego (skład: 4,5 M mocznik, 50% formamid, 20 mM EDTA, 0,03% błękit bromofenolowy oraz 0,03% ksylenocyjanol) i natychmiastowe umieszczenie ich w ciekłym azocie. Próbkę zanalizowano elektroforetycznie w denaturującym żelu poliakrylamidowym (15% akrylamid, 7 M mocznik, bufor TBE), który następnie wybarwiono przy użyciu barwnika SYBR Gold (Invitrogen) i zwizualizowano z wykorzystaniem skanera laserowego Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Intensywności prążków odpowiadających kapowanemu i pozbawionemu już kapu RNA zostało zanalizowane densytometrycznie przy użyciu oprogramowania 1D Gel Image Analysis Software TotalLab CLIQS.

Bufor do badania enzymu D9 oraz D10: 10 mM MOPS-HCl, pH 7,0, 100 mM KOAc, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM MnCl₂, 2 mM DTT

Bufor do badania kompleksu Dcp1/2: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT

6. BIBLIOGRAFIA

1. Deng, Z.L.; Munch, P.C.; Mreches, R.; McHardy, A.C. Rapid and accurate identification of ribosomal RNA sequences via deep learning. *Nucleic Acids Research* **2022**, *50*, 12.
2. Varani, G.; McClain, W.H. The G-U wobble base pair: A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *Embo Reports* **2000**, *1*, 18-23.
3. Lemieux, S.; Major, F. RNA canonical and non-canonical base pairing types: a recognition method and complete repertoire. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 4250-4263.
4. Hwang, J.W.; Li, P.; Shimizu, K.D. Synergy between experimental and computational studies of aromatic stacking interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15*, 1554-1564.
5. Mathews, D.H.; Disney, M.D.; Childs, J.L.; Schroeder, S.J.; Zuker, M.; Turner, D.H. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 7287-7292.
6. Gruber, A.R.; Lorenz, R.; Bernhart, S.H.; Neuböck, R.; Hofacker, I.L. The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36*, W70-W74, doi:10.1093/nar/gkn188.
7. Lorenz, R.; Bernhart, S.H.; Siederdisen, C.H.Z.; Tafer, H.; Flamm, C.; Stadler, P.F.; Hofacker, I.L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology* **2011**, *6*, 14.
8. Mignon, P.; Loverix, S.; Steyaert, J.; Geerlings, P. Influence of the π - π interaction on the hydrogen bonding capacity of stacked DNA/RNA bases. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*, 1779-1789.
9. Sponer, J.; Riley, K.E.; Hobza, P. Nature and magnitude of aromatic stacking of nucleic acid bases. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, *10*, 2595-2610.
10. Laalami, S.; Zig, L.; Putzer, H. Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2014**, *71*, 1799-1828.
11. Yu, J.; Russell, J.E. Structural and functional analysis of an mRNP complex that mediates the high stability of human β -globin mRNA. *Molecular and Cellular Biology* **2001**, *21*, 5879-5888.
12. Brenner, S.; Meselson, M.; Jacob, F. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **1961**, *190*, 576-581.
13. Gros, F.; Kurland, C.G.; Hiatt, H.; Watson, J.D.; Gilbert, W.; Risebrough, R.W. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of Escherichia coli. *Nature* **1961**, *190*, 581-585.
14. Jacob, F.; Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* **1961**, *3*, 318-356.
15. Galloway, A.; Cowling, V.H. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **2019**, *1862*, 270-279.
16. Apponi, L.H.; Corbett, A.H.; Pavlath, G.K. RNA-binding proteins and gene regulation in myogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences* **2011**, *32*, 652-658.

17. Erkmann, J.A.; Kutay, U. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Experimental Cell Research* **2004**, *296*, 12-20.
18. Katahira, J. Nuclear Export of Messenger RNA. *Genes* **2015**, *6*, 163-184.
19. Xie, Y.H.; Ren, Y. Mechanisms of nuclear mRNA export: A structural perspective. *Traffic* **2019**, *20*, 829-840.
20. Hu, G.H.; Gershon, P.D.; Hodel, A.E.; Quijcho, F.A. mRNA cap recognition: Dominant role of enhanced stacking interactions between methylated bases and protein aromatic side chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 7149-7154.
21. Byszewska, M.; Smietanski, M.; Purta, E.; Bujnicki, J.M. RNA methyltransferases involved in 5' cap biosynthesis. *Rna Biology* **2014**, *11*, 1597-1607.
22. Furuichi, Y.; Morgan, M.; Shatkin, A.J.; Jelinek, W.; Saldittgeorgieff, M.; Darnell, J.E. Methylated, blocked 5' termini in Hela-cell messenger-RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, *72*, 1904-1908.
23. Wei, C.M.; Gershowitz, A.; Moss, B. N⁶,O^{2'}-Dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to 5' terminal of animal-cell and virus messenger-RNAs. *Nature* **1975**, *257*, 251-253.
24. Sikorski, P.J.; Warminski, M.; Kubacka, D.; Ratajczak, T.; Nowis, D.; Kowalska, J.; Jemielity, J. The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48*, 1607-1626.
25. Moteki, S.; Price, D. Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Molecular Cell* **2002**, *10*, 599-609.
26. Shatkin, A.J.; Manley, J.L. The ends of the affair: Capping and polyadenylation. *Nature Structural Biology* **2000**, *7*, 838-842.
27. Ramanathan, A.; Robb, G.B.; Chan, S.H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research* **2016**, *44*, 7511-7526.
28. Jiao, X.F.; Chang, J.H.; Kilic, T.; Tong, L.; Kiledjian, M. A Mammalian Pre-mRNA 5' End Capping Quality Control Mechanism and an Unexpected Link of Capping to Pre-mRNA Processing. *Molecular Cell* **2013**, *50*, 104-115.
29. Pabis, M.; Neufeld, N.; Steiner, M.C.; Bojic, T.; Shav-Tal, Y.; Neugebauer, K.M. The nuclear cap-binding complex interacts with the U4/U6.U5 tri-snRNP and promotes spliceosome assembly in mammalian cells. *Rna* **2013**, *19*, 1054-1063.
30. Flaherty, S.M.; Fortes, P.; Izaurralde, E.; Mattaj, I.W.; Gilmartin, G.M. Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 11893-11898.
31. Andersen, P.R.; Domanski, M.; Kristiansen, M.S.; Storvall, H.; Ntini, E.; Verheggen, C.; Schein, A.; Bunkenborg, J.; Poser, I.; Hallais, M.; et al. The human cap-binding complex is functionally connected to the nuclear RNA exosome. *Nature Structural & Molecular Biology* **2013**, *20*, 1367-1376.
32. Nojima, T.; Hirose, T.; Kimura, H.; Hagiwara, M. The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 15645-15651.
33. Chin, S.Y.; Lejeune, F.; Ranganathan, A.C.; Maquat, L.E. The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes & Development* **2004**, *18*, 745-754.

34. Choe, J.; Oh, N.; Park, S.; Lee, Y.K.; Song, O.K.; Locker, N.; Chi, S.G.; Kim, Y.K. Translation Initiation on mRNAs Bound by Nuclear Cap-binding Protein Complex CBP80/20 Requires Interaction between CBP80/20-dependent Translation Initiation Factor and Eukaryotic Translation Initiation Factor 3g. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 18500-18509.
35. Choe, J.; Ryu, I.; Park, O.H.; Park, J.; Cho, H.; Yoo, J.S.; Chi, S.W.; Kim, M.K.; Song, H.K.; Kim, Y.K. eIF4AIII enhances translation of nuclear cap-binding complex-bound mRNAs by promoting disruption of secondary structures in 5' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, E4577-E4586.
36. Maquat, L.E.; Hwang, J.; Sato, H.; Tang, Y.; Cold Spring Harbor Lab, P. CBP80-Promoted mRNP Rearrangements during the Pioneer Round of Translation, Nonsense-Mediated mRNA Decay, and Thereafter. *Nuclear Organization and Function* **2010**, *75*, 127-134.
37. Maquat, L.E.; Tarn, W.Y.; Isken, O. The Pioneer Round of Translation: Features and Functions. *Cell* **2010**, *142*, 368-374.
38. Preiss, T.; Hentze, M.W. From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development* **1999**, *9*, 515-521.
39. Preiss, T.; Hentze, M.W. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* **1998**, *392*, 516-520.
40. Smith, R.W.P.; Blee, T.K.P.; Gray, N.K. Poly(A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans. *Biochemical Society Transactions* **2014**, *42*, 1229-1237.
41. Meyer, S.; Temme, C.; Wahle, E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: Pathways and enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2004**, *39*, 197-216.
42. Haile, S.; Dupe, A.; Papadopoulou, B. Deadenylation-independent stage-specific mRNA degradation in Leishmania. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36*, 1634-1644.
43. Badis, G.; Saveanu, C.; Fromont-Racine, M.; Jacquier, A. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Molecular Cell* **2004**, *15*, 5-15.
44. Beelman, C.A.; Parker, R. Degradation of messenger-RNA in eukaryotes. *Cell* **1995**, *81*, 179-183.
45. Garneau, N.L.; Wilusz, J.; Wilusz, C.J. The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8*, 113-126.
46. Uchida, N.; Hoshino, S.; Katada, T. Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 1383-1391.
47. Martinez, J.; Ren, Y.G.; Nilsson, P.; Ehrenberg, M.; Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 27923-27929.
48. Balatsos, N.A.A.; Nilsson, P.; Mazza, C.; Cusack, S.; Virtanen, A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 4517-4522.
49. Tharun, S.; He, W.H.; Mayes, A.E.; Lennertz, P.; Beggs, J.D.; Parker, R. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **2000**, *404*, 515-518.

50. Tharun, S.; Parker, R. Targeting an mRNA for decapping: Displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Molecular Cell* **2001**, *8*, 1075-1083.
51. Kshirsagar, M.; Parker, R. Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2004**, *166*, 729-739.
52. Mangus, D.A.; Amrani, N.; Jacobson, A. Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Molecular and Cellular Biology* **1998**, *18*, 7383-7396.
53. Kramer, S.; McLennan, A.G. The complex enzymology of mRNA decapping: Enzymes of four classes cleave pyrophosphate bonds. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* **2019**, *10*, 17.
54. Shen, V.; Liu, H.D.; Liu, S.W.; Jiao, X.F.; Kiledjian, M. DcpS scavenger decapping enzyme can modulate pre-mRNA splicing. *Rna* **2008**, *14*, 1132-1142.
55. Bail, S.; Kiledjian, M. DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *Rna Biology* **2008**, *5*, 216-219.
56. Liu, H.D.; Rodgers, N.D.; Jiao, X.; Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *Embo Journal* **2002**, *21*, 4699-4708.
57. Lima, C.D.; Klein, M.G.; Hendrickson, W.A. Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science* **1997**, *278*, 286-290.
58. Ng, C.K.L.; Shboul, M.; Taverniti, V.; Bonnard, C.; Lee, H.; Eskin, A.; Nelson, S.F.; Al-Raqad, M.; Altawalbeh, S.; Séraphin, B.; et al. Loss of the scavenger mRNA decapping enzyme DCPS causes syndromic intellectual disability with neuromuscular defects. *Human Molecular Genetics* **2015**, *24*, 3163-3171.
59. Alesi, V.; Capolino, R.; Genovesea, S.; Capriati, T.; Loddo, S.; Calvieri, G.; Calacci, C.; Diociaiuti, A.; Diamanti, A.; Novelli, A.; 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*, 2781-2786.
60. Ahmed, I.; Buchert, R.; Zhou, M.; Jiao, X.; Mittal, K.; Sheikh, T.I.; Scheller, U.; Vasli, N.; Rafiq, M.A.; Brohi, M.Q.; 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*, 3172-3180.
61. Singh, J.; Salcius, M.; Liu, S.W.; Staker, B.L.; Mishra, R.; Thurmond, J.; Michaud, G.; Mattoon, D.R.; Printen, J.; Christensen, J.; et al. DcpS as a Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy. *Acs Chemical Biology* **2008**, *3*, 711-722.
62. Van Meerbeke, J.P.; Gibbs, R.M.; Plasterer, H.L.; Miao, W.Y.; Feng, Z.H.; Lin, M.Y.; Rucki, A.A.; Wee, C.D.; Xia, B.; Sharma, S.; et al. The DcpS inhibitor RG3039 improves motor function in SMA mice. *Human Molecular Genetics* **2013**, *22*, 4074-4083.
63. Yamauchi, T.; Masuda, T.; Canver, M.C.; Seiler, M.; Semba, Y.; Shboul, M.; Al-Raqad, M.; Maeda, M.; Schoonenberg, V.A.C.; Cole, M.A.; et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies Leukemia-Specific Dependence on a Pre-mRNA Metabolic Pathway Regulated by DCPS. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 386-400.
64. Jin, B.; Yang, L.; Ye, Q.Y.; Pan, J.X. Ferroptosis induced by DCPS depletion diminishes hepatic metastasis in uveal melanoma. *Biochemical Pharmacology* **2023**, *213*, 14..
65. McLennan, A.G. The Nudix hydrolase superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2006**, *63*, 123-143.

66. She, M.; Decker, C.J.; Svergun, D.I.; Round, A.; Chen, N.; Muhlrads, D.; Parker, R.; Song, H. Structural basis of Dcp2 recognition and activation by Dcp1. *Molecular Cell* **2008**, *29*, 337-349.
67. Dunckley, T.; Tucker, M.; Parker, R. Two related proteins, Edc1p and Edc2p, stimulate mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2001**, *157*, 27-37.
68. Borja, M.S.; Piotukh, K.; Freund, C.; Gross, J.D. Dcp1 links coactivators of mRNA decapping to Dcp2 by proline recognition. *Rna* **2011**, *17*, 278-290.
69. Fromm, S.A.; Truffault, V.; Kamenz, J.; Braun, J.E.; Hoffmann, N.A.; Izaurralde, E.; Sprangers, R. The structural basis of Edc3- and Scd6-mediated activation of the Dcp1:Dcp2 mRNA decapping complex. *Embo Journal* **2012**, *31*, 279-290.
70. Fromm, S.A.; Kamenz, J.; Nöldeke, E.R.; Neu, A.; Zocher, G.; Sprangers, R. In Vitro Reconstitution of a Cellular Phase-Transition Process that Involves the mRNA Decapping Machinery. *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, *53*, 7354-7359.
71. Harigaya, Y.; Jones, B.N.; Muhlrads, D.; Gross, J.D.; Parker, R. Identification and Analysis of the Interaction between Edc3 and Dcp2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **2010**, *30*, 1446-1456.
72. Chang, C.T.; Bercovich, N.; Loh, B.; Jonas, S.; Izaurralde, E. The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, 5217-5233.
73. Lai, T.F.; Cho, H.; Liu, Z.; Bowler, M.W.; Piao, S.F.; Parker, R.; Kim, Y.K.; Song, H.W. Structural Basis of the PNRC2-Mediated Link between mRNA Surveillance and Decapping. *Structure* **2012**, *20*, 2025-2037.
74. Cho, H.; Kim, K.M.; Kim, Y.K. Human Proline-Rich Nuclear Receptor Coregulatory Protein 2 Mediates an Interaction between mRNA Surveillance Machinery and Decapping Complex. *Molecular Cell* **2009**, *33*, 75-86.
75. Chowdhury, A.; Mukhopadhyay, J.; Tharun, S. The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *Rna* **2007**, *13*, 998-1016.
76. Chowdhury, A.; Tharun, S. Activation of decapping involves binding of the mRNA and facilitation of the post-binding steps by the Lsm1-7-Pat1 complex. *Rna* **2009**, *15*, 1837-1848.
77. Collier, J.; Parker, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **2005**, *122*, 875-886.
78. Braun, J.E.; Tritschler, F.; Haas, G.; Igreja, C.; Truffault, V.; Weichenrieder, O.; Izaurralde, E. The C-terminal α - α superhelix of Pat is required for mRNA decapping in metazoa. *Embo Journal* **2010**, *29*, 2368-2380.
79. Floor, S.N.; Borja, M.S.; Gross, J.D. Interdomain dynamics and coactivation of the mRNA decapping enzyme Dcp2 are mediated by a gatekeeper tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 2872-2877.
80. She, M.P.; Decker, C.J.; Chen, N.; Tumati, S.; Parker, R.; Song, H.W. Crystal structure and functional analysis of Dcp2p from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Structural & Molecular Biology* **2006**, *13*, 63-70.
81. Deshmukh, M.V.; Jones, B.N.; Quang-Dang, D.U.; Flinders, J.; Floor, S.N.; Kim, C.; Jemielity, J.; Kalek, M.; Darzynkiewicz, E.; Gross, J.D. mRNA decapping is promoted by an RNA-binding channel in Dcp2. *Molecular Cell* **2008**, *29*, 324-336.

82. He, F.; Jacobson, A. Control of mRNA decapping by positive and negative regulatory elements in the Dcp2 C-terminal domain. *Rna* **2015**, *21*, 1633-1647.
83. Piccirillo, C.; Khanna, R.; Kiledjian, M. Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2. *Rna* **2003**, *9*, 1138-1147.
84. Floor, S.N.; Jones, B.N.; Hernandez, G.A.; Gross, J.D. A split active site couples cap recognition by Dcp2 to activation. *Nature Structural & Molecular Biology* **2010**, *17*, 1096-1099.
85. Mugridge, J.S.; Ziemniak, M.; Jemielity, J.; Gross, J.D. Structural basis of mRNA-cap recognition by Dcp1-Dcp2. *Nature Structural & Molecular Biology* **2016**, *23*, 987-994.
86. Brannan, K.; Kim, H.; Erickson, B.; Glover-Cutter, K.; Kim, S.; Fong, N.; Kiemele, L.; Hansen, K.; Davis, R.; Lykke-Andersen, J.; et al. mRNA Decapping Factors and the Exonuclease Xrn2 Function in Widespread Premature Termination of RNA Polymerase II Transcription. *Molecular Cell* **2012**, *46*, 311-324.
87. Geisler, S.; Lojek, L.; Khali, A.M.; Baker, K.E.; Collier, J. Decapping of Long Noncoding RNAs Regulates Inducible Genes. *Molecular Cell* **2012**, *45*, 279-291.
88. Presnyak, V.; Alhusaini, N.; Chen, Y.H.; Martin, S.; Morris, N.; Kline, N.; Olson, S.; Weinberg, D.; Baker, K.E.; Graveley, B.R.; et al. Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability. *Cell* **2015**, *160*, 1111-1124.
89. Li, Y.; Dai, J.H.; Song, M.G.; Fitzgerald-Bocarsly, P.; Kiledjian, M. Dcp2 Decapping Protein Modulates mRNA Stability of the Critical Interferon Regulatory Factor (IRF) IRF-7. *Molecular and Cellular Biology* **2012**, *32*, 1164-1172.
90. Shukla, S.; Parker, R. Quality control of assembly-defective U1 snRNAs by decapping and 5'-to-3' exonucleolytic digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 3277-3286.
91. Parrish, S.; Resch, W.; Moss, B. Vaccinia virus D10 protein has mRNA decapping activity, providing a mechanism for control of host and viral gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 2139-2144.
92. Parrish, S.; Moss, B. Characterization of a second vaccinia virus mRNA decapping enzyme conserved in poxviruses. *Journal of Virology* **2007**, *81*, 12973-12978.
93. Parrish, S.; Hurchalla, M.; Liu, S.W.; Moss, B. The African swine fever virus g5R protein possesses mRNA decapping activity. *Virology* **2009**, *393*, 177-182.
94. Kago, G.; Parrish, S. The Mimivirus L375 Nudix enzyme hydrolyzes the 5' mRNA cap. *PLoS One* **2021**, *16*.
95. Weber, F.; Wagner, V.; Rasmussen, S.B.; Hartmann, R.; Paludan, S.R. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of Virology* **2006**, *80*, 5059-5064..
96. Boone, R.F.; Parr, R.P.; Moss, B. Inter-molecular duplexes formed from polyadenylated Vaccinia virus RNA. *Journal of Virology* **1979**, *30*, 365-374.
97. Colby, C.; Duesberg, P.H. Double-stranded RNA in Vaccinia virus infected cells. *Nature* **1969**, *222*, 940-944.
98. Liu, S.W.; Katsafanas, G.C.; Liu, R.K.; Wyatt, L.S.; Moss, B. Poxvirus Decapping Enzymes Enhance Virulence by Preventing the Accumulation of dsRNA and the Induction of Innate Antiviral Responses. *Cell Host & Microbe* **2015**, *17*, 320-331.

99. Dhungel, P.; Cantu, F.M.; Molina, J.A.; Yang, Z.L. Vaccinia Virus as a Master of Host Shutoff Induction: Targeting Processes of the Central Dogma and Beyond. *Pathogens* **2020**, *9*, 23.
100. Moss, B. *Poxviridae*; Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 2013.
101. McLennan, A.G. Decapitation: poxvirus makes RNA lose its head. *Trends in Biochemical Sciences* **2007**, *32*, 297-299.
102. Baldick, C.J.; Moss, B. Characterization and temporal regulation of messenger-RNAs encoded by *Vaccinia virus* intermediate-stage genes. *Journal of Virology* **1993**, *67*, 3515-3527.
103. Silverman, R.H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of Virology* **2007**, *81*, 12720-12729.
104. Burgess, H.M.; Pourchet, A.; Hajdu, C.H.; Chiriboga, L.; Frey, A.B.; Mohr, I. Targeting Poxvirus Decapping Enzymes and mRNA Decay to Generate an Effective Oncolytic Virus. *Molecular Therapy-Oncolytics* **2018**, *8*, 71-81.
105. Peters, J.K.; Tibble, R.W.; Warminski, M.; Jemielity, J.; Gross, J.D. Structure of the poxvirus decapping enzyme D9 reveals its mechanism of cap recognition and catalysis. *Structure* **2022**, *30*, 1-12.
106. Matsuo, H.; Li, H.J.; McGuire, A.M.; Fletcher, C.M.; Gingras, A.C.; Sonenberg, N.; Wagner, G. Structure of translation factor eIF4E bound to m⁷GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nature Structural Biology* **1997**, *4*, 717-724.
107. Mazza, C.; Segref, A.; Mattaj, I.W.; Cusack, S. Large-scale induced fit recognition of an m⁷GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *Embo Journal* **2002**, *21*, 5548-5557.
108. Cantu, F.; Cao, S.; Hernandez, C.; Dhungel, P.; Spradlin, J.; Yang, Z.L. Poxvirus-encoded decapping enzymes promote selective translation of viral mRNAs. *Plos Pathogens* **2020**, *16*, 22.
109. van Dijk, E.; Cougot, N.; Meyer, S.; Babajko, S.; Wahle, E.; Seraphin, B. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo Journal* **2002**, *21*, 6915-6924.
110. Conti, E.; Izaurralde, E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current Opinion in Cell Biology* **2005**, *17*, 316-325.
111. van Hoof, A.; Frischmeyer, P.A.; Dietz, H.C.; Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **2002**, *295*, 2262-2264.
112. Frischmeyer, P.A.; van Hoof, A.; O'Donnell, K.; Guerrierio, A.L.; Parker, R.; Dietz, H.C. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **2002**, *295*, 2258-2261.
113. Inada, T.; Aiba, H. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 30-UTR is repressed after initiation in yeast. *Embo Journal* **2005**, *24*, 1584-1595.
114. Doma, M.K.; Parker, R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **2006**, *440*, 561-564.
115. Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. Direct gene-transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **1990**, *247*, 1465-1468.
116. Sahin, U.; Kariko, K.; Tureci, O. mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, *13*, 759-780.

117. Zhu, Y.R.; Zhu, L.Y.; Wang, X.; Jin, H.C. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell Death & Disease* **2022**, *13*, 15.
118. Wang, Y.; Zhang, Z.Q.; Luo, J.W.; Han, X.J.; Wei, Y.Q.; Wei, X.W. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer* **2021**, *20*, 23.
119. Miao, L.; Zhang, Y.; Huang, L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer* **2021**, *20*, 23.
120. Vavilis, T.; Stamoula, E.; Ainatzoglou, A.; Sachinidis, A.; Lamprinou, M.; Dardalas, I.; Vizirianakis, I.S. mRNA in the Context of Protein Replacement Therapy. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 19.
121. Swingle, K.L.; Hamilton, A.G.; Mitchell, M.J. Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of mRNA Therapeutics and Vaccines. *Trends in Molecular Medicine* **2021**, *27*, 616-617.
122. Lamb, Y.N. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs* **2021**, *81*, 495-501.
123. Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine* **2021**, *384*, 403-416.
124. Horvath, P.; Barrangou, R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* **2010**, *327*, 167-170.
125. Makarova, K.; Haft, D.; Barrangou, R.; Brouns, S.; Charpentier, E.; Horvath, P.; Moineau, S.; Mojica, F.; Wolf, Y.; Yakunin, A.; et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **2011**, *9*, 467-477.
126. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816-821.
127. Jiang, F.; Doudna, J. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, **2017**, *46*, 505-529.
128. Pourseif, M.M.; Masoudi-Sobhanzadeh, Y.; Azari, E.; Parvizpour, S.; Barar, J.; Ansari, R.; Omid, Y. Self-amplifying mRNA vaccines: Mode of action, design, development and optimization. *Drug Discovery Today* **2022**, *27*, 19.
129. Li, Y.Z.; Su, Z.J.; Zhao, W.Y.; Zhang, X.F.; Momin, N.; Zhang, C.X.; Wittrup, K.D.; Dong, Y.Z.; Irvine, D.J.; Weiss, R. Multifunctional oncolytic nanoparticles deliver self-replicating IL-12 RNA to eliminate established tumors and prime systemic immunity. *Nature Cancer* **2020**, *1*, 882-893.
130. Maruggi, G.; Chiarot, E.; Giovani, C.; Buccato, S.; Bonacci, S.; Frigimelica, E.; Margarit, I.; Geall, A.; Bensi, G.; Maione, D. Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens. *Vaccine* **2017**, *35*, 361-368.
131. Chahal, J.S.; Khan, O.F.; Cooper, C.L.; McPartlan, J.S.; Tsosie, J.K.; Tilley, L.D.; Sidik, S.M.; Lourido, S.; Langer, R.; Bavari, S.; et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and Toxoplasma gondii challenges with a single dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113*, 4133-4142.
132. Luo, F.J.; Zheng, L.N.; Hu, Y.; Liu, S.X.; Wang, Y.; Xiong, Z.K.; Hu, X.; Tan, F. Induction of Protective Immunity against Toxoplasma gondii in Mice by Nucleoside Triphosphate Hydrolase-II (NTPase-II) Self-amplifying RNA Vaccine Encapsulated in Lipid Nanoparticle (LNP). *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 10.

133. Moyo, N.; Vogel, A.B.; Buus, S.; Erbar, S.; Wee, E.G.; Sahin, U.; Hanke, T. Efficient Induction of T Cells against Conserved HIV-1 Regions by Mosaic Vaccines Delivered as Self-Amplifying mRNA. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development* **2019**, *12*, 32-46.
134. Hansen, T.B.; Jensen, T.I.; Clausen, B.H.; Bramsen, J.B.; Finsen, B.; Damgaard, C.K.; Kjems, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **2013**, *495*, 384-388.
135. Panda, A.C. Circular RNAs Act as miRNA Sponges. In *Circular Rnas: Biogenesis and Functions*, Xiao, J., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer-Verlag Singapore Pte Ltd: Singapore, **2018**, 1087, 67-79.
136. Chen, R.; Wang, S.K.; Belk, J.A.; Amaya, L.; Li, Z.J.; Cardenas, A.; Abe, B.T.; Chen, C.K.; Wender, P.A.; Chang, H.Y. Engineering circular RNA for enhanced protein production. *Nature Biotechnology* **2022**, *16*, 262-272.
137. Wang, Y.; Wu, C.J.; Du, Y.; Li, Z.W.; Li, M.L.; Hou, P.F.; Shen, Z.G.; Chu, S.F.; Zheng, J.N.; Bai, J. Expanding uncapped translation and emerging function of circular RNA in carcinomas and noncarcinomas. *Molecular Cancer* **2022**, *21*, 22.
138. Seephetdee, C.; Bhukhai, K.; Buasri, N.; Leelukkanaveera, P.; Lerdwattanasombat, P.; Manopwisedjaroen, S.; Phueakphud, N.; Kuhaudomlarp, S.; Olmedillas, E.; Sapphire, E.O.; et al. A circular mRNA vaccine prototype producing VFLIP-X spike confers a broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by mouse sera. *Antiviral Research* **2022**, *204*, 9.
139. Yang, J.L.; Zhu, J.F.; Sun, J.J.; Chen, Y.Y.; Du, Y.R.; Tan, Y.L.; Wu, L.P.; Zhai, M.T.; Wei, L.X.; Li, N.; et al. Intratumoral delivered novel circular mRNA encoding cytokines for immune modulation and cancer therapy. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* **2022**, *30*, 184-197.
140. Ladbury, J.E.; Chowdhry, B.Z. Sensing the heat: The application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chemistry & Biology* **1996**, *3*, 791-801.
141. Brandts, J.F.; Lin, L.N. STUDY OF STRONG TO ULTRATIGHT PROTEIN INTERACTIONS USING DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY. *Biochemistry* **1990**, *29*, 6927-6940.
142. Becker, W.; Bhattiprolu, K.C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. Investigating Protein-Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemphyschem* **2018**, *19*, 895-906, doi:10.1002/cphc.201701253.
143. Lees, J.A.; Dias, J.M.; Han, S. Applications of Cryo-EM in small molecule and biologics drug design. *Biochemical Society Transactions* **2021**, *49*, 2627-2638.
144. Davis, A.M.; Teague, S.J.; Kleywegt, G.J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 2718-2736.
145. Kendrew, J.; Bodo, G.; Dintzis, H.; Parrish, R.; Wyckoff, H.; Phillips, D. 3-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray Analysis. *Nature* **1958**, *181*, 662-666.
146. Perutz, M.; Rossmann, M.; Cullis, A.; Muirhead, H.; Will, G.; North, A. Structure of Haemoglobin - 3-dimensional Fourier Synthesis at 5,5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* **1960**, *185*, 416-422.
147. Patching, S.G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2014**, *1838*, 43-55.

148. Niedzwiecka, A.; Marcotrigiano, J.; Stepinski, J.; Jankowska-Anyszka, M.; Wyslouch-Cieszyńska, A.; Dadlez, M.; Gingras, A.C.; Mak, P.; Darzynkiewicz, E.; Sonenberg, N.; et al. Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: Recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *319*, 615-635.
149. Piecyk, K.; Darzynkiewicz, Z.; Jankowska-Anyszka, M.; Ferenc-Mrozek, A.; Stepinski, J.; Darzynkiewicz, E.; Bojarska, E. Effect of different N7 substitution of dinucleotide cap analogs on the hydrolytic susceptibility towards scavenger decapping enzymes (DcpS). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *464*, 89-93.
150. Heybrock, S.; Kanerva, K.; Meng, Y.; Ing, C.; Liang, A.; Xiong, Z.; Weng, X.; Kim, Y.; Collins, R.; Trimble, W.; et al. Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2/SCARB2) is involved in lysosomal cholesterol export. *Nature Communications* **2019**, *10*.
151. Banni, G.; Nasreddine, R.; Fayad, S.; Colas, C.; Marchal, A.; Nehmé, R. Investigation of lipase-ligand interactions in porcine pancreatic extracts by microscale thermophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2021**, *413*, 3667-3681.
152. Fukuzawa, A.; Koch, D.; Grover, S.; Rees, M.; Gautel, M. When is an obscurin variant pathogenic? The impact of Arg4344Gln and Arg4444Trp variants on protein-protein interactions and protein stability. *Human Molecular Genetics* **2021**, *30*, 1131-1141.
153. Nelson, C.; Mrozowich, T.; Gemmill, D.; Park, S.; Patel, T. Human DDX3X Unwinds Japanese Encephalitis and Zika Viral 5' Terminal Regions. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*.
154. Zhang, S.; Williams, C.; Wormington, M.; Stevens, A.; Peltz, S. Monitoring mRNA decapping activity. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **1999**, *17*, 46-51.
155. Lu, G.W.; Zhang, J.; Li, Y.; Li, Z.X.; Zhang, N.; Xu, X.; Wang, T.T.; Guan, Z.H.; Gao, G.F.; Yan, J.H. hNUDT16: a universal decapping enzyme for small nucleolar RNA and cytoplasmic mRNA. *Protein & Cell* **2011**, *2*, 64-73.
156. Ziemniak, M.; Mugridge, J.S.; Kowalska, J.; Rhoads, R.E.; Gross, J.D.; Jemielity, J. Two-headed tetraphosphate cap analogs are inhibitors of the Dcp1/2 RNA decapping complex. *RNA* **2016**, *22*, 518-529.
157. Miura, M.; Takahashi, N. Routine therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors by HPLC-UV or LC-MS/MS methods. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2016**, *31*, 12-20.
158. Anzenbacherová, E.; Anzenbacher, P.; Macek, K.; Kvetina, J. Determination of enzyme (angiotensin convertase) inhibitors based on enzymatic reaction followed by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2001**, *24*, 1151-1156.
159. Wojtczak, B.A.; Sikorski, P.J.; Fac-Dabrowska, K.; Nowicka, A.; Warminski, M.; Kubacka, D.; Nowak, E.; Nowotny, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. 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*, 5987-5999.
160. Brown, M.P.; Royer, C. Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions. *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, *8*, 45-49.
161. Möller, M.; Denicola, A. Study of protein-ligand binding by fluorescence. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2002**, *30*, 309-312.

162. Deng, H.H.; Wang, F.F.; Shi, X.Q.; Peng, H.P.; Liu, A.L.; Xia, X.H.; Chen, W. Water-soluble gold nanoclusters prepared by protein-ligand interaction as fluorescent probe for real-time assay of pyrophosphatase activity. *Biosensors & Bioelectronics* **2016**, *83*, 1-8.
163. Kasprzyk, R.; Starek, B.J.; Ciechanowicz, S.; Kubacka, D.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Fluorescent Turn-On Probes for the Development of Binding and Hydrolytic Activity Assays for mRNA Cap-Recognizing Proteins. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25*, 6728-6740.
164. Wojtczak, A.; Kasprzyk, R.; Warminski, M.; Ubych, K.; Kubacka, D.; Sikorski, P.J.; Jemielity, J.; Kowalska, J. Evaluation of carboxyfluorescein-labeled 7-methylguanine nucleotides as probes for studying cap-binding proteins by fluorescence anisotropy. *Scientific Reports* **2021**, *11*, 15.
165. Kasprzyk, R.; Fido, M.; Mamot, A.; Wanat, P.; Smietanski, M.; Kopcial, M.; Cowling, V.H.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Direct High-Throughput Screening Assay for mRNA Cap Guanine-N7 Methyltransferase Activity. *Chemistry – A European Journal* **2020**, *26*, 11266-11275.
166. Kopcial, M.; Wojtczak, B.A.; Kasprzyk, R.; Kowalska, J.; Jemielity, J. N1-Propargylguanosine Modified mRNA Cap Analogs: Synthesis, Reactivity, and Applications to the Study of Cap-Binding Proteins. *Molecules* **2019**, *24*, 17.
167. Shukla, S.; Parker, R. Quality control of assembly-defective U1 snRNAs by decapping and 5'-to-3' exonucleolytic digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 3277-3286.
168. Bednarczyk, M.; Peters, J.K.; Kasprzyk, R.; Starek, J.; Warminski, M.; Spiewla, T.; Mugridge, J.S.; Gross, J.D.; Jemielity, J.; Kowalska, J. Fluorescence-Based Activity Screening Assay Reveals Small Molecule Inhibitors of Vaccinia Virus mRNA Decapping Enzyme D9. *Acs Chemical Biology* **2022**, *17*, 1460-1471.
169. Acker, M.G.; Auld, D.S. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspectives in Science* **2014**, *1*, 56-73.
170. Zhang, J.H.; Chung, T.D.Y.; Oldenburg, K.R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, *4*, 67-73.
171. Santoro, S.W.; Joyce, G.F. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* **1998**, *37*, 13330-13342.
172. Luo, Y.; Schofield, J.A.; Na, Z.K.; Hann, T.; Simon, M.D.; Slavoff, S.A. Discovery of cellular substrates of human RNA-decapping enzyme DCP2 using a stapled bicyclic peptide inhibitor. *Cell Chemical Biology* **2021**, *28*, 463-474.
173. Wang, Z.R.; Jiao, X.F.; Carr-Schmid, A.; Kiledjian, M. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 12663-12668.
174. Coleman, T.M.; Wang, G.C.; Huang, F.Q. Superior 5' homogeneity of RNA from ATP-initiated transcription under the T7 phi 2,5 promoter. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 4.