

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Katarzyna Grab

Nr albumu: 363086

Fluorescencyjne RNA jako sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymów degradacji kapu

rozprawa doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
Dr hab. Joanny Kowalskiej
w Zakładzie Biofizyki
Instytutu Fizyki Doświadczalnej
Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, 2024

*Badanie zostały zrealizowane w ramach projektu OPUS 16,
finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki
„Synteza i charakterystyka nowych sond molekularnych do monitorowania
aktywności enzymów związanych z dekapingiem RNA w żywych komórkach”
UMO – 2018/31/B/ST5/03821*

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorce – dr hab. Joannie Kowalskiej – za nieustanne inspirowanie do dalszego rozwoju, wsparcie naukowe i osobiste oraz ogrom przekazanej wiedzy;

Prof. dr. hab. Jackowi Jemielitemu – za umożliwienie realizacji badań w Laboratorium Biologii Chemicznej, cenne rady oraz wsparcie merytoryczne;

Dr. Marcinowi Warmińskiemu – za każdą burzę mózgów i wszystkie niezwykle owocne współprace;

Dr. inż. Mikołajowi Chromińskiemu – za wiele cennych rad i wskazówek oraz wnikliwe przeanalizowanie niniejszej rozprawy;

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Chemii Biologicznej i Laboratorium Chemii Biofizycznej – za fantastyczną atmosferę pracy oraz pomoc w małych i wielkich sprawach;

Rodzicom, bratu, babci oraz Zorzy – za każdą formę wsparcia i anielską cierpliwość;

Mężowi Michałowi – za wyrozumiałość i poświęcenie!

1. Spis treści

Podziękowania.....	3
Dorobek naukowy.....	9
Wykaz skrótów.....	13
Streszczenie	15
Przegląd literaturowy.....	17
1. Wstęp.....	17
2. Budowa i znaczenie kwasu rybonukleinowego	19
2.1 Podział kwasów rybonukleinowych.....	20
2.2 RNA kodujące białka.....	21
2.2.1 Informacyjne RNA	21
2.3 RNA regulatorowe	24
2.4 Małe regulatorowe RNA.....	24
2.4.1 Mikro RNA.....	25
2.4.2 Małe interferujące RNA.....	26
2.4.3 Działające in trans siRNA.....	27
2.4.4 Naturalne siRNA pochodzące z transkryptu antysensownego.....	27
2.4.5 Małe interferujące RNA związane z powtórzeniami	28
2.4.6 RNA oddziałujące z białkami Piwi.....	28
2.5 Duże regulatorowe RNA	28
2.6 RNA konstytutywne.....	30
2.6.1 Małe jądrowe RNA	31
2.6.2 Małe jąderkowe RNA	32
2.6.3 Rybosomalne RNA.....	33
2.6.4 Transferowe RNA	34
2.6.5 Transferowo-informacyjne RNA.....	35
2.7 Terapeutyczne zastosowania RNA	36
3. Enzymatyczna degradacja RNA	36
3.1 Przegląd wybranych enzymów dekapujących	42
3.1.1 Dcp2	43
3.1.2 hNUDT16.....	44
3.1.3 VACV D9/VACV D10	45
3.1.4 EcRppH.....	46
3.1.5 NudC.....	47
3.1.6 mDXO/Rai1.....	49
3.2 Znaczenie i perspektywy badań nad enzymami dekapującymi	50
4. Strategie syntezy oligonukleotydów	51
4.1 Otrzymywanie oligonukleotydów metodą syntezy na podłożu stałym.....	51
4.1.1 Etapy syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym	53
4.2 Transkrypcja in vitro	55
4.2.1 Matryce DNA w reakcji transkrypcji in vitro	55
4.2.2 Polimeraza RNA.....	56
4.2.3 Synteza zmodyfikowanych RNA za pomocą reakcji transkrypcji in vitro	57
5. Sondy molekularne.....	60

5.1 Sondy aptamerowe	62
5.2 Sondy znakowane fluorescencyjnie	63
5.2.1 Zjawisko fluorescencji	63
5.2.2 Barwniki fluorescencyjne	64
5.2.3 Rezonansowy transfer energii Förstera	65
5.2.4 Wygaszanie fluorescencji	66
Badania własne	69
6. Plan badań	69
7. Profilowanie substratów i inhibitorów dla enzymów dekapujących	72
7.1 Synteza chemiczna inicjatorów transkrypcji in vitro	73
7.1.1 Synteza unikalnych wariantów struktury kapu, Xpp(p)	74
7.1.2 Otrzymywanie difosforanów guanozyny	74
7.1.3 Synteza chemiczna dinukleotydów na podłożu stałym	77
7.1.4 Aktywacja dinukleotydów	78
7.1.5 Otrzymywanie aktywowanego monofosforanu nikotynamidu	79
7.1.6 Reakcje sprzegania	80
7.2 Transkrypcja in vitro	81
7.2.1 Projektowanie sond aptamerowych	81
7.3 Walidacja metody do analizy sond aptamerowych RNA	85
7.4 Profilowanie substratów enzymów dekapujących	88
7.5 Charakterystyka inhibitorów dekapingu	91
7.6 Badania kinetyki dekapingu	92
7.7 Badanie procesu dekapingu w ekstraktach komórkowych	93
8. Synteza podwójnie znakowanych sond fluorescencyjnych	95
8.1 Otrzymywanie inicjatorów transkrypcji in vitro	97
8.2 Znakowanie analogów struktury kapu	101
8.3 IVT i kontranskrypcyjne wprowadzanie analogów struktur kapu	103
8.4 Znakowanie posttranskrypcyjne końca 5' RNA	106
8.5 Znakowanie końca 3' RNA metodą chemiczną	107
8.6 Znakowanie końca 3' RNA na drodze ligacji	108
9. Zastosowanie sond do monitorowania procesu dekapingu in vitro	110
9.1 Monitorowanie aktywności Dcp2	113
9.2 Monitorowanie aktywności DXO	117
9.3 Bioobrazowanie	120
10. Podsumowanie	122
Procedury eksperymentalne	125
11. Syntezy chemiczne analogów kapu	125
11.1 Spis skrótów odczynników chemicznych stosowanych w procedurach eksperymentalnych	125
11.2 Odczynniki chemiczne i sprzęt laboratoryjny	126
11.2.1 m ⁷ GDP	128
11.2.2 m ₃ ^{2,7} GDP	129
11.2.3 Mononukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NMN)	132
11.3 Synteza 5'-monofosforanów dinukleotydów na podłożu stałym	132
11.3.1 pApG	133

11.3.2 pAmpG	134
11.3.3 pUpG	134
11.3.4 pApA.....	135
11.4 Aktywacja.....	135
11.4.1 Im-pApG	136
11.4.2 Im-pAmpG	136
11.4.3 Im-pUpG.....	137
11.4.4 NMN-Im.....	137
11.5 Reakcje sprzęgania do kapów	137
11.5.1 GpppApG.....	139
11.5.2 m ⁷ GpppApG	139
11.5.3 m ⁷ GpppAmpG	140
11.5.4 m ₃ ^{2,2,7} GpppApG	140
11.5.5 NRppApG.....	141
11.5.6 RflvppApG	141
11.5.7 GlcppUpG	142
11.6 Synteza mononukleotydów sfunkcjonalizowanych linkerem aminowym	142
11.6.1 L _{2N} -GDP	143
11.6.2 L _{6N} -GDP	143
11.6.3 LPEG _{2N} -GDP	144
11.6.4 L _{2N} -m ⁷ GDP	144
11.6.5 L _{6N} -m ⁷ GDP	144
11.6.6 LPEG _{2N} -m ⁷ GDP	145
11.7 Reakcje sprzęgania do sfunkcjonalizowanych analogów kapu	145
11.7.1 L _{2N} -m ⁷ GpppApG.....	145
11.7.2 L _{2N} -m ⁷ GpppAmpG.....	146
11.7.3 L _{6N} -m ⁷ GpppApG.....	146
11.7.4 LPEG _{2N} -m ⁷ GpppApG	147
11.7.5 L _{2N} -GpppApG	147
11.8 Funkcjonalizacja dinukleotydu pApA linkerem aminowym, pApA-EDA	148
11.9 Znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi	148
11.9.1 pApA-sCy5	149
11.9.2 pApA-sCy3	149
11.9.3 pApA-Cy5.....	150
11.10 Funkcjonalizacja barwników fluorescencyjnych	150
11.10.1 Janelia Fluor 549-DETA.....	151
11.10.2 Janelia Fluor 646-DETA.....	151
11.11 Znakowanie fluorescencyjne di- i trinukleotydów	152
11.11.1 Cy3-L _{2N} -m ⁷ GpppApG.....	152
11.11.2 Cy3-L _{6N} -m ⁷ GpppApG.....	153
11.11.3 Cy3-LPEG _{2N} - m ⁷ GpppApG	153
11.11.4 sCy5-L _{2N} -GpppApG.....	154
11.11.5 BHQ-2-L _{2N} -m ⁷ GpppApG	154
11.11.6 BHQ-3-L _{2N} -m ⁷ GpppApG	155

11.11.7 NRpp-glButyn-sCy5-pApG	156
12. Reakcje enzymatyczne	157
12.1 Informacje ogólne	157
12.2 Transkrypcja in vitro na matrycy poliA-Broccoli	158
12.2.1 ppp-poliA-Broccoli	158
12.2.2 kap-0-poliA-Broccoli	158
12.2.3 kap-1-poliA-Broccoli	159
12.2.4 TMG kap-poliA-Broccoli	159
12.2.5 GpppApG -poliA-Broccoli	159
12.2.6 NAD kap-poliA-Broccoli	159
12.2.7 FAD kap-poliA-Broccoli	159
12.2.8 GlcppUpG-poliA-Broccoli	160
12.3 Transkrypcja in vitro RNA ₃₅	160
12.3.1 N ₃ -kap-0-RNA ₃₅	161
12.3.2 Cy3-L2 _N -kap-0-RNA ₃₅	161
12.3.3 Cy3-L6 _N -kap-0-RNA ₃₅	161
12.3.4 Cy3-LPEG2 _N -kap-0-RNA ₃₅	162
12.3.5 sCy5-L2 _N -GpppApG-RNA ₃₅	162
12.3.6 NRpp-glButyn-sCy5-pApG-RNA ₃₅	162
12.3.7 (5)-FAM-C3-ppApG-RNA ₃₅	162
12.3.8 (6)-FAM-C3-ppApG-RNA ₃₅	163
12.3.9 NRpp-gln ₃ -pApG-RNA ₃₅ D1	163
12.3.10 NRpp-gln ₃ -pApG-RNA ₃₅ D2	163
12.3.11 N ₃ -NAC-GlcppUpG-RNA ₃₅	163
12.4 Znakowanie posttranskrypcyjne RNA ₃₅ na końcu 5'	164
12.4.1 SPAAC	164
12.5 Znakowanie końca 3' RNA ₃₅	165
12.5.1 Ligacja	165
12.6 Jednoczesne znakowanie RNA ₃₅ na końcu 5' oraz 3' – reakcja SPAAC + PORA	166
12.6.1 BHQ-2-DBCO-kap-0-RNA ₃₅ -EDA-Janelia Fluor 549	166
12.6.2 BHQ-3-DBCO-kap-0-RNA ₃₅ -EDA-Janelia Fluor 646	167
13. Test FLINT	167
13.1 Informacje ogólne	167
13.1.1 Degradacja RNA przez enzymy dekapujące i Xrn1	168
13.1.2 Tworzenie kompleksu aptamer-ligand	168
13.1.3 Pomiary intensywności fluorescencji	168
13.1.4 Walidacja za pomocą elektroforezy żelowej z powinowactwem do APB	168
13.1.5 Kinetyczny test dekapingu	168
14. Pomiary na spektrofлуorymetrze	169
Materiały uzupełniające	170
Bibliografia	179

Wystąpienia konferencyjne

- „*Fluorescent RNAs as molecular probes for monitoring the activity of decapping enzymes*”, Young Researchers Symposium, 7 września 2024, Tokio, Japonia, prezentacja plakatowa;
- „*Fluorescent RNAs as molecular probes for monitoring the activity of decapping enzymes*”, XXV International Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 3–6 września 2024, Tokio, Japonia, prezentacja plakatowa;
- „*Synthesis and characterization of dually-labeled oligonucleotide probes as molecular tools to visualize the activity of RNA decapping enzymes*”, Gordon Research Conference on Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, 25–30 czerwca 2023, Newport, Rhode Island, Stany Zjednoczone Ameryki, prezentacja plakatowa;
- „*Synthesis and characterization of dually-labeled oligonucleotide probes as molecular tools to visualize the activity of RNA decapping enzymes*”, Gordon Research Seminar on Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, 24–25 czerwca 2023, Newport, Rhode Island, Stany Zjednoczone Ameryki, prezentacja plakatowa;
- „*Nowe sondy aptamerowe jako narzędzia molekularne do profilowania specyficzności substratowej enzymów dekapujących RNA*”, 64. Zjazd Naukowy PTChem, 11–16 września 2022, Lublin, Polska, wystąpienie ustne;
- „*Aptamer-based probes as molecular tools to visualize the activity of RNA decapping enzymes*”, Young Researchers Symposium, 1 września 2022, Sztokholm, Szwecja, wystąpienie ustne;
- „*Aptamer-based probes as molecular tools to visualize the activity of RNA decapping enzymes*”, XXIV International Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 28–31 sierpnia 2022, Sztokholm, Szwecja, prezentacja plakatowa;
- „*Aptamer-based assay for high-throughput substrate profiling of RNA decapping enzymes*”, CRC 969 Symposium, Two Days of Proteostasis in Konstanz, 7–8 kwietnia 2022, Konstancja, Niemcy, prezentacja plakatowa i wystąpienie ustne;
- „*Nowe sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymów związanych z dekapowaniem mRNA*”, II Wirtualna Konferencja Kampusu Ochota, 20–21 września 2021, prezentacja plakatowa;
- „*Nowe narzędzia molekularne do badania procesu dekapingu mRNA*”, 63. Zjazd Naukowy PTChem, 14–17 września 2021, prezentacja plakatowa;
- „*Synteza mRNA modyfikowanych na 5' końcu jako narzędzi do monitorowania przebiegu procesu dekapingu*”, Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki UW, 30 sierpnia–3 września 2021, wystąpienie ustne;
- „*Specificity profiling of decapping enzymes using HTS aptamer – based probes*”, IS3NA-IRT Virtual Symposium, 26–27 sierpnia 2021, prezentacja plakatowa.

Publikacja naukowa bezpośrednio związana z tematem rozprawy doktorskiej

- „*Aptamer-based assay for high-throughput substrate profiling of RNA decapping enzymes*” Katarzyna Grab, Mateusz Fido, Tomasz Spiewla, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; zaakceptowana do publikacji w *Nucleic Acid Research*.

Pozostałe publikacje naukowe

- „*Photoactivatable mRNA 5' Cap Analogs for RNA-Protein Crosslinking*” Marcin Warminski, Katarzyna Grab, Kacper Szczepanski, Tomasz Spiewla, Joanna Zuberek, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity; *Advanced Science*, 2024; 2400994;
- „*Synthesis, kinetic studies, and QSAR of dinucleoside polyphosphate derivatives as human AK1 inhibitors*” Anna Kozakiewicz-Piekarz, Magdalena Grzegórska, Kamil Ziemkiewicz, Katarzyna Grab, Marek R. Baranowski, Mariusz Zapadka, Marta Karpiel, Bogumiła Kupcewicz, Joanna Kowalska, Magdalena Wujak; *Bioorganic chemistry*, 148: 107432;
- „*An MST-based assay reveals new binding preferences of IFIT1 for canonically and non-canonically capped RNAs*” Tomasz Spiewla, Katarzyna Grab, Anais Depaix, Kamil Ziemkiewicz, Marcin Warminski, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; zaakceptowana do publikacji w *RNA*;
- „*HIV-1 infection reduces NAD capping of host cell snRNA and snoRNA*” Barbora Benoni, Jiří František Potužník, Anton Škríba, Roberto Benoni, Jana Trylcova, Matouš Tulpa, Kristína Spustová, Katarzyna Grab, Maria-Bianca Mititelu, Jan Pačes, Jan Weber, David Stanek, Joanna Kowalska, Lucie Bednarova, Zuzana Keckesova, Pavel Vopalensky, Lenka Gahurova, Hana Cahova; *ACS Chemical Biology*, 2024, 19.6: 1243-1249;
- „*Low-oxidation-potential thiophene-carbazole monomers for electro-oxidative molecular imprinting: selective chemosensing of aripiprazole*” Marianna Gajda, Renata Rybakiewicz, Maciej Cieplak, Teresa Zolek, Dorota Maciejewska, Edyta Gilant, Piotr J. Rudzki, Katarzyna Grab, Andrzej Kutner, Paweł Borowicz, Włodzimierz Kutner, Krzysztof R. Noworyta; *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 169: 112589.

Zgłoszenia patentowe

- Współautorstwo patentu w trybie PCT (PCT/PL2024/050060) „*Pochodna monofosforanu dinukleotydu, zawierająca ją pochodna kwasu nukleinowego oraz sposób jej otrzymywania*” Perzanowska O., Kowalska J., Jemielity J., Mroczek S., Krawczyk P., Dziembowski A., Rajkiewicz A., Warminiński M., Grab K.; PZ/9949/RW/PCT.

Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda wyjazdowa: Travel Award for the XXV IRT in Tokyo 2024;
- Nagroda za wystąpienie konferencyjne: „*Synthesis and characterization of dually-labeled oligonucleotide probes as molecular tools to visualize the activity of RNA decapping enzymes*”, Gordon Research Conference on Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, 25–30 czerwca 2023, Newport, Rhode Island, Stany Zjednoczone Ameryki;

- Wyróżnienie za wystąpienie konferencyjne: „*Nowe sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymów związanych z dekapingiem mRNA*”, II Wirtualna Konferencja Kampusu Ochota, 20–21 września 2021.

APB – kwas *N*-akryloilo-3-aminofenylo-boronowy

CBC – (*cap binding complex*), kompleks białkowy wiążący strukturę kapu

CuAAC – (*Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*), katalizowana Cu(I) cykloadycja azydowo-alkinowa

DE – (*decapping enzyme*), enzym dekapujący

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dsRNA – (*double stranded RNA*), dwuniciowe RNA

FLINT – (*fluorescence intensity*), intensywność fluorescencji

FRET – (*Förster resonance energy transfer*), rezonansowy transfer energii Förstera

FTN – (*first transcribed nucleotide*), pierwszy transkrybowany nukleotyd

GMP – 5'-monofosforan guanozyny

GTaza – guanylotransferaza

GTP – 5'-trifosforan guanozyny

HRMS – (*high resolution mass spectrometry*), spektrometria mas o wysokiej rozdzielczości

HT – (*high-throughput*), wysokoprzepustowy

IVT – (*in vitro transcription*), transkrypcja *in vitro*

LX_N – modyfikacja nukleotydów stanowiąca linker o długości X atomów, zawierający I-rzędową aminę

MUT – zmutowana forma białka

m⁷G – *N*⁷-metyloguanozyna

miRNA – (*micro RNA*), mikro RNA

mlncRNA – (*mRNA-like noncoding RNA*), duże regulatorowe RNA

mRNA – (*messenger RNA*), RNA informacyjne, inaczej matrycowe

***N*⁷-MTaza** – metylotransferaza *N*⁷-guaninowa

nat-siRNA – (*natural antisense transcript derived siRNA*), naturalne siRNA pochodzące z transkryptu antysensownego

ncRNA – (*noncoding RNA*), RNA niekodujące białek

NTP – (*nucleoside triphosphate*), 5'-trifosforan nukleozydu

PABP – (*polyA binding protein*), białko wiążące ogon poliA

PAGE – (*polyacrylamide gel electrophoresis*), elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

pi-RNA – (*Piwi-interacting RNA*), RNA oddziałujące z białkami Piwi

PORA – (*periodate oxidation and reductive amination*), dwuetapowa reakcja łącząca utlenianie nadjodanem i aminowanie redukcyjne

pre-mRNA – prekursorowa cząsteczka mRNA

ra-siRNA – (*repeat-associated small interfering RNA*), małe interferujące RNA związane z powtórzeniami

RISC – (*RNA-Induced Silencing Complex*), kompleks białkowy indukujący wyciszenie aktywności RNA

RNA – kwas rybonukleinowy

RNP – rybonukleoproteina

RP-HPLC – (*reverse phase high performance liquid chromatography*), wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych fazach

rRNA – (*ribosomal RNA*), rybosomalne RNA

RT – (*room temperature*), temperatura pokojowa

SAM – S-adenozyl-L-metionina

siRNA – (*small interfering RNA*), małe interferujące RNA

snoRNA – (*small nucleolar RNA*), małe jąderkowe RNA

snRNA – (*small nuclear RNA*), małe jądrowe RNA

SPAAC – (*strain-promoted azide – alkyne cycloaddition*), promowana napięciami reakcja cykloaddycji azydowo-alkinowej

srRNA – (*small regulatory RNA*), małe regulatorowe RNA

ta-siRNA – (*trans-acting siRNA*), małe interferujące RNA działające in trans

TPaza – trifosfataza RNA

tRNA – (*transfer RNA*), transferowe RNA

UTR – (*untranslated region*), fragment sekwencji mRNA nieulegający translacji

VACV – (*Vaccinia Virus*), wirus krowianki

WT – (*wild type*), typ dziki, reprezentatywna forma białka

Xrn1 – 5'-egzorybonukleaza 1

2'-O-MTaza – 2'-O-metylotransferaza

5'-poliPH – 5'-polifosfataza

Streszczenie

Enzymatyczna degradacja kapu (ang. *decapping*, dekaping) – charakterystycznej struktury znajdującej się na końcu 5' mRNA, zwanej inaczej czapeczką, jest kluczowym procesem komórkowym, mającym na celu regulację poziomu ekspresji genów. Dekaping polegający na hydrolizie wiązania fosforanowego, zlokalizowanego w mostku łączącym strukturę kapu z dalszą sekwencją nukleotydów w RNA, skutkuje wyeksponowaniem 5'-monofosforylowanego RNA na degradację przez egzorybonukleazy. Obecnie w literaturze opisanych jest około 20 enzymów zdolnych do degradacji kapu, jednak ich preferencje substratowe są jedynie zgrubnie oszacowane. Nadal również niepoznane są dokładne mechanizmy aktywacji tych enzymów. Pewnym jest, że ich rekrutacja wymaga szeregu białek pomocniczych i innych czynników, jak np. kationów dwuwartościowych, które wspólnie ułatwiają przyjęcie odpowiedniej konformacji aktywnego białka i RNA. Dodatkowo, liczne doniesienia literaturowe wskazują na występowanie różnych wariantów kanonicznej struktury kapu 7-metyloguanozynowego (m⁷G) w cząsteczkach RNA niekodujących białek. Pełny obraz metabolizmu RNA stanowi podstawę dla zrozumienia dynamiki komórki i tym samym jest fundamentalnym elementem w rozwoju nowych podejść terapeutycznych. Stworzenie odpowiednich narzędzi do kwantyfikacji i wizualizacji przebiegu procesów degradacji RNA *in vitro* i *in vivo* wydaje się więc być kluczowe do osiągnięcia tego celu.

Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczą syntezy oraz charakterystyki sond fluorescencyjnych, opartych na strukturze RNA i umożliwiających selektywne monitorowanie aktywności enzymów degradujących kap.

Pierwszy etap moich badań polegał na opracowaniu testu fluorescencyjnego (FLINT, ang. *fluorescence intensity*, intensywność fluorescencji), który umożliwia wysokoprzepustową analizę specyficzności substratowej enzymów dekapujących (ang. *decapping enzymes*, DEs). W tym celu przeprowadziłam syntezę siedmiu naturalnych, di- oraz trinukleotydowych analogów kapu, wykorzystując do tego podejście oparte na syntezie chemicznej, łączące chemię fosforu (III) z chemią fosforu (V). Każdy ze związków został poddany dwuetapowemu oczyszczaniu celem zapewnienia jak najwyższej jakości próbki. W kolejnym kroku przygotowane analogi były kotranskrypcyjnie wprowadzane do sekwencji 70-nukleotydowego RNA. Transkrypcja *in vitro* (IVT) była prowadzona na specjalnie zaprojektowanych do tego celu matrycach DNA, kodujących aptamerową sekwencję Broccoli, wzbogaconą o fragment poliA. Optymalizacja całego procesu pozwoliła na uzyskanie czystych frakcji, wolnych od zanieczyszczeń w postaci niekapowanego RNA i z wysoką wydajnością końcową reakcji. Jakość RNA była weryfikowana z wykorzystaniem elektroforezy żelowej. Finalnie RNA wraz z dedykowanym mu fluorogenicznym ligandem DFHBI-1T, zostało wykorzystane do przeprowadzenia fluorescencyjnego testu, w wyniku którego ustalono preferencje substratowe siedmiu wybranych enzymów dekapujących, pochodzących z różnych organizmów. W ramach tej części badań przeprowadzono również pomiary kinetyczne z udziałem enzymu hDcp2 oraz kap-1-RNA, które pozwoliły na wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji. Wykazano też przydatność testu FLINT do poszukiwania inhibitorów enzymów dekapujących. Ustalenie zakresu aktywności poszczególnych enzymów posłużyło mi do opracowania dwuznakowanych sond fluorescencyjnych, ukierunkowanych na pojedynczy cel molekularny, co było przedmiotem drugiego etapu moich badań.

Syntezę podwójnie znakowanych sond fluorescencyjnych rozpocząłam od przygotowania trinukleotydowych analogów kapu, zawierających linkery umożliwiające przyłączenie barwnika. W takiej formie analogi struktury kapu były wprowadzane kotranskrypcyjnie do nici RNA, a w kolejnym kroku znakowane odpowiednimi barwnikami. Drugie podejście obejmowało znakowanie trinukleotydów, a dopiero w następnym etapie przeprowadzanie IVT. Niezależnie od przyjętej strategii, wyznakowane i kapowane RNA, były poddawane znakowaniu na końcu 3' sekwencji, stosując metodę enzymatyczną lub chemiczną. Barwniki zostały dobrane tak, aby tworzyły parę fluorofor-wygaszacz bądź donor-akceptor, umożliwiającą obserwację zjawiska FRET. Sondy fluorescencyjne były poddane charakterystyce metodami biofizycznymi, a te o najkorzystniejszych właściwościach, scharakteryzowane również pod kątem przydatności do monitorowania reakcji enzymatycznych z wybranymi białkami degradującymi kap.

Zaprezentowane w niniejszej pracy sondy oparte na strukturze RNA oraz zaprojektowane na ich podstawie testy umożliwiają szybkie i wysokoprzepustowe analizy preferencji substratowych enzymów dekapujących. Stanowią one niezwykle przydatne narzędzie do pełnej charakterystyki enzymów, umożliwiając ustalenie ich specyficzności i selektywności substratowej oraz identyfikację nowych inhibitorów enzymów. Ma to szczególnie duże znaczenie w kontekście opracowania nowych podejść terapeutycznych bazujących na cząsteczkach RNA, których trwałość i stabilność jest tu kluczowym elementem. Opracowane przeze mnie narzędzia są więc odpowiedzią na rosnące zapotrzebowanie w erze intensywnego rozwoju biotechnologii i medycyny.

1. Wstęp

Degradacja mRNA jest katalizowanym przez enzymy procesem, który odgrywa kluczową rolę w ekspresji i regulacji genów. Unikalne elementy znajdujące się na końcach 5' i 3' mRNA, odpowiednio kap i ogon poliA, są strukturami rozpoznawanymi przez białka zaangażowane w obróbkę i przetwarzanie mRNA. Enzymatyczna hydroliza struktury kapu, znana jako dekaping, ma znaczący wpływ na stabilność mRNA, proces translacji i homeostazę komórki. Doniesienia literaturowe jasno wskazują, że obecność charakterystycznej struktury kapu nie jest ograniczona jedynie do RNA kodujących białka. Zidentyfikowano wiele enzymów dekapujących RNA, o znacznie zróżnicowanych preferencjach substratowych, ale ich dokładna rola biologiczna jest nadal przedmiotem dyskusji. Narzędzia molekularne, które umożliwiają wizualizację aktywności enzymów dekapujących w żywych komórkach podczas zachodzącej degradacji RNA, mogą być nieocenioną pomocą w zrozumieniu ich funkcji, co znacznie przyspieszyłoby i uprościło proces pełnej charakterystyki enzymów oraz analogów naturalnej struktury kapu.

Część literaturowa niniejszej pracy doktorskiej rozpoczyna się od wprowadzenia czytelnika w zagadnienia dotyczące ogólnej budowy kwasu rybonukleinowego (RNA), który jest głównym przedmiotem prowadzonych badań. Mając na uwadze ogromne zróżnicowanie RNA obecnych w komórce i szerokie spektrum ich aktywności, w kolejnych podrozdziałach przedstawiono podział oraz opisano poszczególne klasy RNA. Szczególną uwagę zwrócono na strukturę tych cząsteczek, z zaznaczeniem obecności lub braku analogu kapu na końcu 5', ich biogenezę oraz rolę w maszynierii komórkowej. W kolejnym rozdziale omówiony został proces degradacji RNA w komórkach. Przedstawiono obecny stan wiedzy na temat mechanizmów nim rządzących oraz dostępnych ścieżek. Intensywny rozwój biologii molekularnej w ostatnich latach doprowadził do identyfikacji szeregu enzymów odpowiedzialnych za usuwanie struktury kapu z końca 5'-RNA. Dało to podstawę do dalszych badań, mających na celu określenie ich roli, zależności i specyficzności substratowej. Niewątpliwie, mnogość tych enzymów i złożoność ich funkcji wymagają zaawansowanych narzędzi, które umożliwiają wysoce precyzyjne i dokładne pomiary, ukierunkowane na pojedynczy cel molekularny. Wiarygodne dane, które odzwierciedlałyby w jak najwyższym stopniu stan natywny obiektu biologicznego, z zachowaniem wpływu otoczenia, są obecnie trudne do uzyskania i wymaga to wielotorowego podejścia. Z tego też powodu w pracy tej poświęcono rozdział na przegląd enzymów wykazujących zdolność do hydrolizy struktury kapu zlokalizowanej na końcu 5' RNA. Związłe przedstawienie specyficzności substratowej tych enzymów, miało na celu przygotować czytelnika do analizy wyników uzyskanych w toku prowadzonych badań. Doniesienia literaturowe w temacie aktywności enzymów dekapujących są często niejednoznaczne lub trudne do porównania, co tym bardziej wskazuje na konieczność stworzenia narzędzi dających szansę na wysokoprzepustowe analizy. Oddzielny rozdział w niniejszej rozprawie poświęcono na omówienie podstawowych strategii syntezy oligonukleotydów. Opisano tam najczęściej stosowane i najbardziej korzystne podejścia pod względem wydajności oraz nakładu pracy i środków. Syntetycznie uzyskane RNA mogą być z powodzeniem wykorzystane do tworzenia sond molekularnych, stanowiących narzędzia w analizie aktywności innych biocząsteczek *in vitro* i *in vivo*. Aby wyjaśnić czytelnikowi mechanizmy, które stanowiły podstawę do

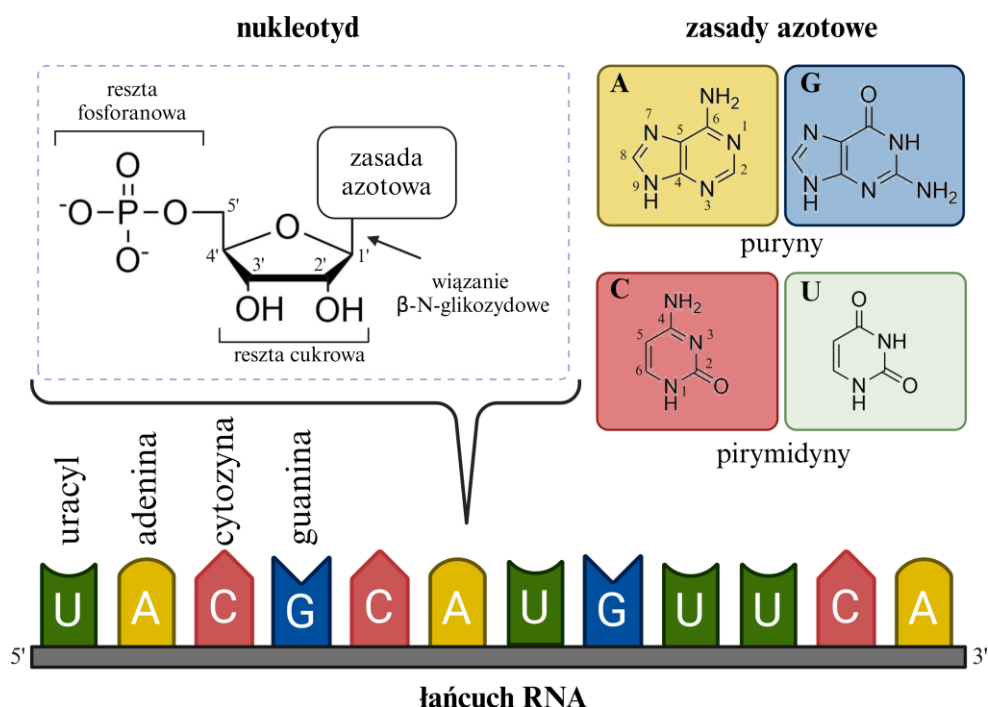
zaprojektowania przygotowanych w ramach tej rozprawy sond molekularnych, omówiono zjawisko fluorescencji i towarzyszących jej efektów.

Niniejszy wstęp literaturowy ma na celu zapoznanie czytelnika z aktualnym stanem wiedzy na temat przebiegu komórkowej degradacji RNA oraz wskazanie elementów czy etapów procesu, wymagających dalszych/pogłębionych badań. Uzyskanie pełnego obrazu dynamiki komórki stanowi bowiem do tej pory duże wyzwanie i wymaga stworzenia odpowiednich narzędzi biochemicznych.

2. Budowa i znaczenie kwasu rybonukleinowego

Kwas rybonukleinowy (RNA) jest linowym biopolimerem występującym powszechnie w żywych organizmach. Częsteczki RNA składają się z monomerów zwanych nukleotydami. Każdy nukleotyd zbudowany jest z reszty fosforanowej, reszty cukrowej oraz zasady azotowej, tworząc razem ester fosforanowy nukleozydu (Rysunek 1).¹ Reszta fosforanowa wraz z pięciowęglowym cukrem – rybozą, która jest połączona z zasadą azotową wiązaniem β -N-glikozydowym, stanowią główny trzon łańcucha, natomiast zasady azotowe są skierowane na zewnątrz szkieletu cukrowo-fosforanowego. W przypadku RNA wyróżniamy cztery kanoniczne zasady azotowe: adeninę (A) i guaninę (G) należące do puryn, oraz cytozynę (C) i uracyl (U), należące do pirymidyn. W zasadach purynowych wiązanie β -N-glikozydowe tworzy azot w pozycji N9, pirymidyny natomiast angażują do tego azot w pozycji N1. Podstawą do utworzenia łańcucha RNA jest wytworzenie wiązania 5',3'-fosfodiesterowego pomiędzy kolejnymi nukleotydami. Konsekwencją takiego układu elementów w strukturze RNA jest kierunkowość łańcucha. Na końcu 5' RNA znajduje się wolna grupa fosforanowa przyłączona do węgla C5' rybozy pierwszego w sekwencji nukleotydu lub jej pochodna. Koniec 3' łańcucha jest natomiast zakończony rybozą posiadającą wolne ugrupowanie *cis*-1,2-diolowe. Biosynteza kwasów rybonukleinowych na drodze transkrypcji polega na katalizowanym przez polimerazę RNA dobudowywaniu kolejnych elementów łańcucha w kierunku 5'→3', zgodnie z sekwencją matrycy DNA. Najkrótsze cząsteczki RNA mogą zawierać kilkanaście nukleotydów w sekwencji, najdłuższe zazwyczaj nie przekraczają kilku tysięcy monomerów. Długość łańcucha RNA oraz jego struktura drugo- i trzeciorzędowa są ściśle związane z jego funkcją w komórce, co zostanie szczegółowo opisane w kolejnych podrozdziałach.

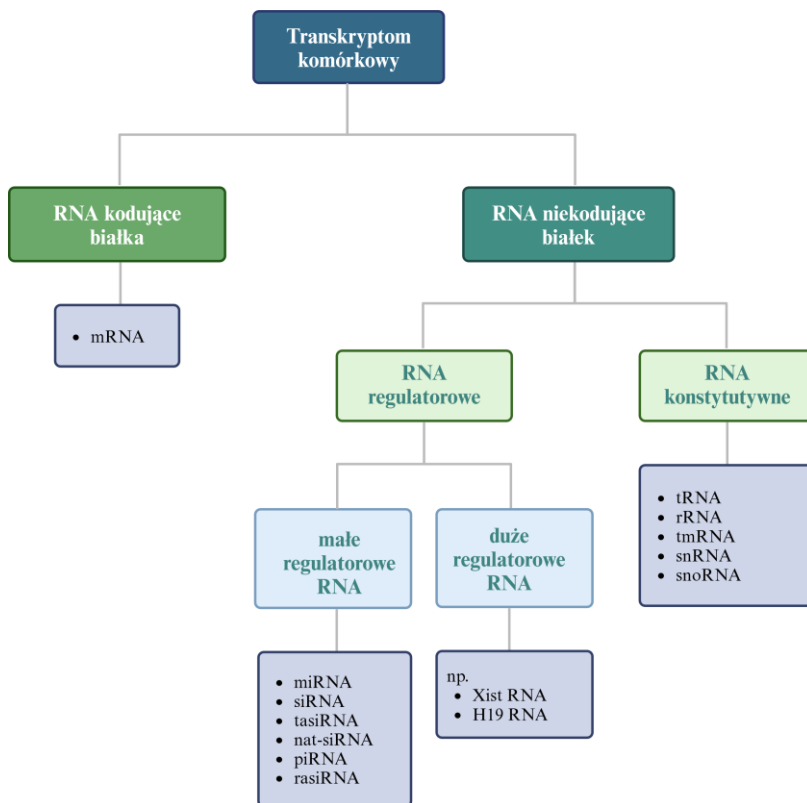
RNA tworzy zazwyczaj jednoniciowe łańcuchy, jednak ze względu na swoją złożoną budowę, lokalnie mogą tworzyć się też fragmenty dwuniciowe. Wysoka reaktywność poszczególnych składowych monomerów oraz ich wrażliwość na pH środowiska powoduje zmianę struktury przestrzennej całego RNA w zależności od otoczenia chemicznego. Każdy z trzech elementów budulcowych nukleotydu ma swój wkład w charakter chemiczny cząsteczki RNA. Tym samym obecność hydrofilowego szkieletu cukrowo-fosforanowego oraz hydrofobowych zasad azotowych, prowadzi do amfifilowego charakteru cząsteczki RNA.



Rysunek 1 Budowa nukleotydów wchodzących w skład RNA.

2.1 Podział kwasów rybonukleinowych

Transkryptom komórkowy, a więc ogół RNA będącego produktem transkrypcji genów możemy podzielić na dwie zasadnicze grupy: RNA zdolne do kodowania białek (według szacunków około 2–4% zawartości całego komórkowego RNA)^{1,2} oraz RNA niekodujące białek (około 96–98% transkryptomu) (Rysunek 2). Do pierwszej grupy zaliczamy informacyjne RNA (ang. *messenger RNA*, mRNA), które choć ma w komórce marginalny wkład ilościowy, to niezaprzeczalnie stanowi kluczowy element maszynarii ekspresji genów. RNA nieposiadające otwartej ramki odczytu (ang. *noncoding RNA*, ncRNA) dzielimy na regulatorowe (z przedstawicielem grupy w postaci miRNA) i konstytutywne (np. rRNA, tRNA). Termin, którego używamy do zdefiniowania tej podgrupy nie oznacza jednak, że takie RNA nie niosą żadnej informacji genetycznej i nie pełnią istotnych funkcji. Wręcz przeciwnie, zdaje się, że rola regulatorowa procesów zachodzących w komórce, która do tej pory przypisywana była wyłącznie białkom, w dużej mierze jest też pełniona przez ncRNA. Kontrolują one różne poziomy ekspresji genów, mają wpływ na architekturę chromatyny, determinują pamięć epigenetyczną, pośrednio uczestniczą w procesie transkrypcji, alternatywnym składaniu RNA oraz translacji.¹ Sieci regulacyjne oparte na ncRNA mogą więc determinować większość złożonych cech organizmów czy odgrywać istotną rolę w rozwoju chorób.^{2,3}



Rysunek 2 Podział RNA wchodzących w skład transkryptomu komórkowego.

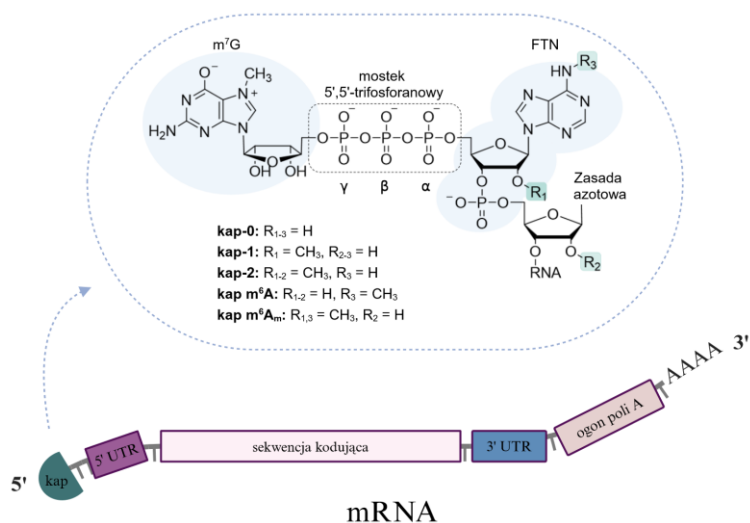
2.2 RNA kodujące białka

2.2.1 Informacyjne RNA

Informacyjne (*inaczej: matrycowe*) RNA jest makromolekułą pełniącą kluczową rolę w procesie ekspresji genów. Zawiera kopię fragmentu informacji genetycznej, która przepisywana na mRNA na drodze transkrypcji, jest następnie tłumaczona na sekwencję aminokwasową w białku. Nukleotydowa sekwencja kodująca białko stanowi centralny element nici mRNA. Jest ona wkomponowana w łańcuch pomiędzy fragmentami 5' UTR i 3' UTR (ang. *untranslated region*), które to nie ulegają procesowi translacji. Dojrzałe eukariotyczne mRNA posiada na swoim 5' końcu charakterystyczną strukturę kapu: 7-metyloguanozynę (m⁷G) połączoną z pierwszym transkrybowanym nukleotydem (FTN, ang. *first transcribed nucleotide*) mostkiem 5',5'- trifosforanowym. Koniec 3' mRNA składa się natomiast z sekwencji około 120 nukleotydów adeninowych, zwanej ogonem poliA (Rysunek 3).⁴ Dla kontrastu, bakteryjne mRNA nie posiada charakterystycznej struktury, odpowiadającej eukariotycznej strukturze kapu, a jego 5'-koniec zakończony jest trifosforanem przyłączonym bezpośrednio do pierwszego w sekwencji nukleotydu.⁵

Proces transkrypcji w komórkach eukariotycznych przebiega w jądrze komórkowym i to tam powstaje prekursorowa cząsteczka pre-mRNA.^{6,7} Na tym etapie, kotranskrypcyjnie

dobudowywana jest struktura kapu do końca 5' łańcucha.^{8,9} Proces ten rozpoczyna się we wczesnym stadium tworzenia transkryptu przez polimerazę RNA II i ma miejsce gdy ten liczy około 25 – 30 nukleotydów.¹⁰ Również w jądrze następuje postranskrypcyjna obróbka mRNA, na którą składa się wycinanie niekodujących fragmentów nukleotydowych (intronów) i sklejanie ze sobą sekwencji kodujących (eksonów)¹¹, a także poliadenylacja końca 3'.¹² Etap tworzenia w pełni funkcjonalnej, polinukleotydowej nici mRNA, nazywamy splicingiem (z ang. *łączenie, splatanie*).¹³ Dojrzała i w pełni uformowana cząsteczka mRNA jest transportowana do cytoplazmy, gdzie następuje proces inicjacji translacji.

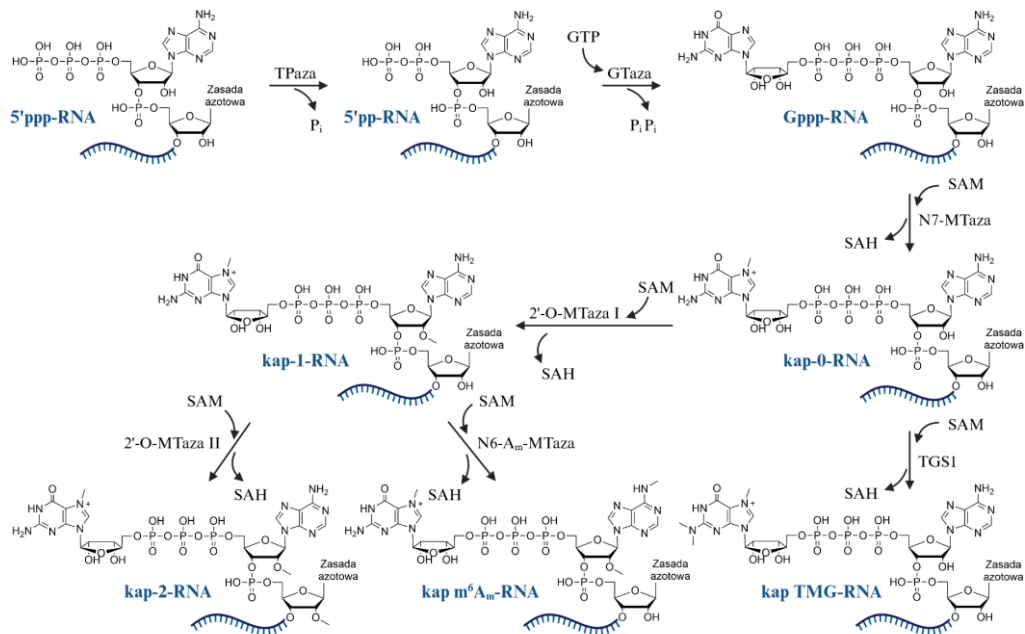


Rysunek 3 Struktura eukariotycznego mRNA i budowa 5'-kapu.

W komórkach eukariotycznych wspomniana wcześniej struktura kapu, znajdująca się na końcu 5' mRNA, nie jest jedynym spotykanym wariantem. Kanoniczny kap-0 (Rysunek 3) stanowi najliczniejszą populację u niższych eukariontów, w tym drożdży, grzybów i ameb.¹⁴ W biosyntezę kapu-0 zaangażowane są trzy główne enzymy: trifosfataza RNA (TPaza), guanylylotransferaza (GTaza) oraz metylotransferaza *N*⁷-guaninowa (*N*⁷-MTaza).¹⁵ Pierwszy z wymienionych enzymów odpowiada za hydrolizę wiązań pirofosforanowego, uwalniając tym samym γ -fosforan z nowo tworzącego się transkryptu. W kolejnym kroku GTaza pośredniczy w przenoszeniu monofosforanu guanozyny (GMP) z trifosforanu guanozyny (GTP) na wolny koniec 5' pre-mRNA, tworząc niemetylowaną strukturę kapu.¹⁶ Na tym etapie tworzony jest unikalny dla mRNA mostek 5',5'-trifosforanowy, łączący kap z FTN. Ostatni z enzymów, *N*⁷-MTaza przeprowadza metylację terminalnej guaniny w pozycji *N*⁷, jako źródło grupy metylowej wykorzystując *S*-adenozyl-L-metioninę (SAM) (Rysunek 4).

W przypadku bardziej złożonych organizmów, w tym ludzi, kap-0 ulega dalszym transformacjom w postaci metylacji rybozy w pozycji 2'-OH pierwszego transkrybowanego nukleotydu, dając w rezultacie kap-1, bądź też pierwszego i drugiego w sekwencji transkrybowanego nukleotydu, dając kap-2 (Rysunek 3). Za pierwszą z tych reakcji odpowiada enzym 2'-O-Metylotransferaza I (2'-O-MTaza I) a jego działanie ogranicza się do jądra komórkowego.¹⁷ Metylacja drugiego transkrybowanego nukleotydu odbywa się natomiast w cytoplazmie i jest katalizowana przez 2'-O-Metylotransferazę II (2'-O-MTaza II).¹⁸ Jeśli

w sekwencji kapowanego mRNA nukleotyd adeninowy stanowi FTN, potencjalnie możliwa jest jego metylacja w pozycji N^6 zasady azotowej, dając odpowiednio kap m^6A lub m^6A_m .¹⁹⁻²¹ Podobnie jak w przypadku metylacji pozycji N^7 kapu, tu również podstawowym źródłem grupy metylowej jest cząsteczka SAM, przekształcana w wyniku reakcji w *S*-adenozyl-L-homocysteinę (SAH).



Rysunek 4 Enzymatyczne szlaki syntezy eukariotycznych wariantów kapu na końcach 5' RNA. Rysunek przygotowany na podstawie Warmiński et al.²²

Zasadniczo stopień złożoności struktur kapu rośnie wraz ze złożonością organizmu. Tak kosztowna energetycznie biosynteza skomplikowanych struktur chemicznych w komórkach eukariotycznych nie jest bezpodstawna i ma swoje uzasadnienie. Powszechnie uznaje się, że główną rolą kapu jest ochrona mRNA przed przedwczesną degradacją przez 5',3'-egzorybonukleazy. Szybka, kotranskrypcyjna dobudowa kapu do nowo tworzącego się transkryptu jest koniecznością, gdy kompleks Polimerazy II nie może już blokować dostępu enzymom degradującym.¹⁴ Okazuje się, że kap pełni istotne funkcje podczas całego procesu dojrzewania mRNA a następnie jego transportu do cytoplazmy i inicjacji translacji.¹⁰ Stabilizuje nowo powstałe transkrypty, ze względu na posiadany ładunek dodatni umożliwia rozpoznanie i związanie mRNA przez kompleks białkowy eIF4F inicjujący translację, a także stanowi ważny element kontroli jakości mRNA. Metylacja w pozycji N^7 struktury kapu zachodzi również u niektórych wirusów. Dopiero brak grupy 2'-O-CH₃ na FTN pozwala na rozpoznanie i zneutralizowanie obcego (wirusowego) RNA przez wrodzony układ immunologiczny.^{23,24} Wirusy wypracowały w toku ewolucji mechanizmy obronne, które pozwalają im jak najdłużej maskować się w komórce gospodarza. Wykorzystują kilka różnych mechanizmów dobudowywania kapu do własnego mRNA, korzystając z maszynarii obecnej w komórce gospodarza.²⁴

2.3 RNA regulatorowe

Grupa regulatorowych RNA wykazuje się dużą różnorodnością zarówno pod względem budowy jak i pełnionych funkcji. Biorą one udział w regulacji ekspresji genów na wszystkich kluczowych etapach – od transkrypcji, przez dojrzewanie i obróbkę, aż po translację. Ich aktywność jest wyzwalana na skutek sygnalizowania przez komórkę aktualnych potrzeb oraz w rezultacie odpowiedzi na czynniki zewnętrzne. Ich działania obejmują zarówno mechanizmy epigenetyczne jak i posttranskrypcyjne, co umożliwia kompleksową, szybką i wyjątkowo skuteczną kontrolę aktywności genów. Wśród RNA regulatorowych wyróżniamy małe regulatorowe RNA: mikro RNA (miRNA), małe interferujące RNA (siRNA), małe interferujące RNA działające *in trans* (ta-siRNA), naturalne siRNA pochodzące z transkryptu antysensownego (nat-siRNA), małe interferujące RNA związane z powtórzeniami (ra-siRNA), RNA oddziałujące z białkami Piwi (piRNA), oraz duże regulatorowe RNA, których przedstawicielami są Xist RNA i H19 RNA. W kolejnych podrozdziałach zaprezentowane zostaną doniesienia literaturowe na temat poszczególnych klas regulatorowych RNA, w szczególności uwzględniając ich budowę, biogenezę oraz pełnioną w komórce rolę. Zrozumienie mechanizmów warunkujących ich cykl życiowy może być kluczowe do stworzenia pełnego obrazu interakcji zachodzących pomiędzy poszczególnymi biokomponentami w komórce.

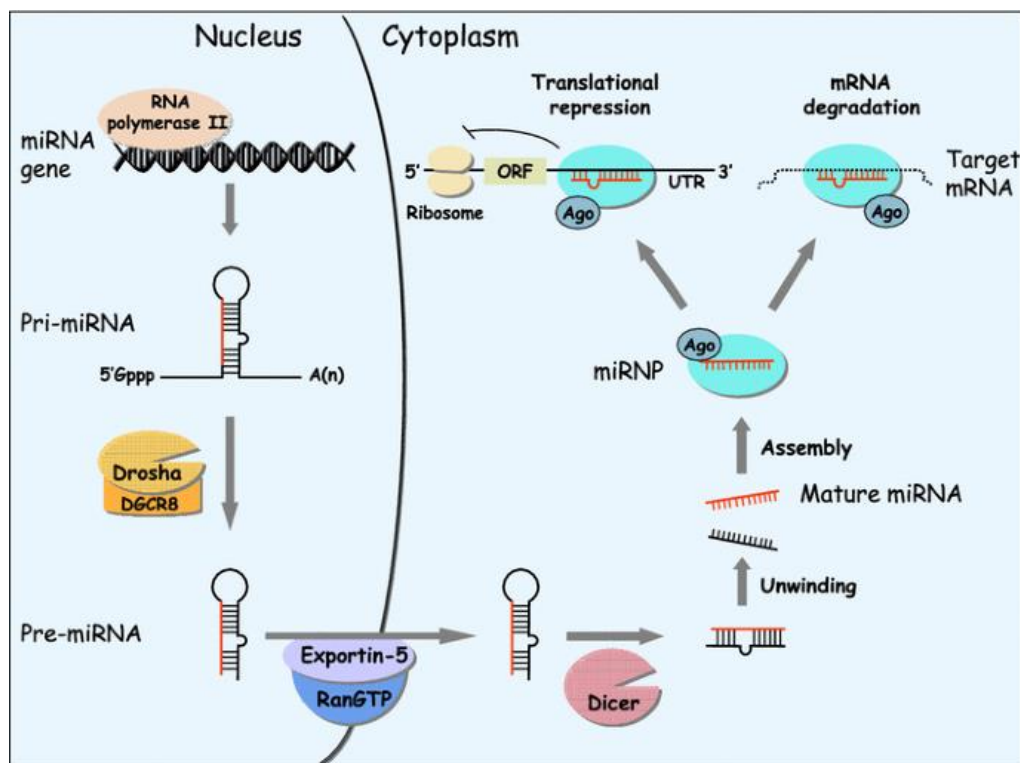
2.4 Małe regulatorowe RNA

Mechanizm biogenezy srRNA (ang. *small regulatory RNA*) jest podobny dla wszystkich przedstawicieli tej grupy. Długie, endo- bądź egzogenne cząsteczki dwuniciowego RNA (ang. *double stranded*, dsRNA) są rozpoznawane i hydrolizowane przez rybonukleazy do około 25-nukleotydowych dupleksów, posiadających na końcu 5' resztę fosforanową a na końcu 3' dwa niesparowane nukleotydy.^{25,26} Tak powstałe fragmenty RNA włączane są następnie w kompleksy białkowe, zależnie od pełnionych przez nie funkcji. Jedna z nici srRNA ulega na tym etapie degradacji a druga odpowiada za selektywne rozpoznawanie kwasów nukleinowych, z którymi docelowo się zwiążą.²⁷ W przypadku, gdy cała sekwencja srRNA jest komplementarna do rozpoznawanego mRNA, cząsteczka regulatorowa prowadzi je na ścieżkę degradacji. Następuje hydroliza wiązania fosfodiesterowego w mRNA, a miejsce cięcia jest uwarunkowane lokalizacją związanego srRNA.²⁸ W konsekwencji z kompleksu srRNA/mRNA uwolniona zostaje cząsteczka przeciętego mRNA, która nie zawiera pełnej ochrony. Fragment zawierający strukturę kapu jest degradowany przez 3'-5' egzonukleazy, natomiast sekwencja posiadająca ogon poliA hydrolizowana jest w cytoplazmie przez enzym egzorybonukleazę 1 (Xrn1).²⁹ Nie zawsze jednak sekwencja srRNA jest idealnie dopasowana do tej występującej w mRNA. Rezultatem takiej interakcji pomiędzy białkowym kompleksem zawierającym srRNA a docelową cząsteczką mRNA jest zahamowanie procesu translacji. Przyjmuje się, że w głównej mierze spowodowane jest to zawadą steryczną – do jednej cząsteczki mRNA przyłącza się zazwyczaj kilka cząsteczek regulatorowego RNA, tym samym uniemożliwiając dostęp maszynierii translacyjnej.³⁰ Istotnym elementem jest również fakt, że białkowy kompleks związany z srRNA może rozpoznawać i wiązać strukturę kapu. Taki stan rzeczy powoduje zahamowanie inicjacji translacji ze względu na współzawodnictwo tego białka z kompleksem białkowym eIF4F.³¹

Małe regulatorowe RNA odgrywają w komórkach eukariotycznych niezwykle istotne i zróżnicowane funkcje. Mają one udział w kotranskrypcyjnej kontroli ekspresji genów poprzez wpływ na modyfikację struktury chromatyny.³² Jednocześnie mogą pełnić funkcję posttranskrypcyjnych regulatorów wyciszania genów, hamując proces translacji i prowadząc mRNA na ścieżkę degradacji.^{30,31} Odgrywają rolę w mechanizmach obronnych organizmu^{33,34} i wpływają na lokalizację mRNA wewnątrz komórek³⁵. Tak szeroki zakres pełnionych funkcji wymusza poddanie głębszej analizie poszczególne klasy małych regulatorowych RNA.

2.4.1 Mikro RNA

Mikro RNA (ang. *micro RNA*, miRNA) należy do jednej z najlepiej poznanych i opisanych biocząsteczek z grupy małych regulatorowych RNA. Obecnie znanych jest kilka tysięcy różnych miRNA pochodzących od zwierząt, roślin i wirusów a ich baza jest nadal aktualizowana (<https://www.mirbase.org>). Dojrzałe miRNA to endogenne biopolimery składający się z nie więcej niż 30 nukleotydów w sekwencji.³⁶ Za transkrypcję genów miRNA w większości przypadków odpowiedzialna jest Polimeraza RNA II.³⁷ Budowa tak powstałych pierwotnych transkryptów miRNA, tzw. pri-miRNA jest zbliżona do budowy mRNA. Koniec 5' pri-miRNA jest wyposażony w strukturę kapu, natomiast na końcu 3' znajduje się ogon poliA. Taki łańcuch może mieć długość powyżej 1000 nukleotydów i zawiera charakterystyczną strukturę spinki do włosów (ang. *hairpin*).³⁶ W jądrze komórkowym ulega on wstępnej obróbce w postaci hydrolizy prowadzonej przez enzym Drosha oraz kofaktor DGCR8/Pasha do postaci zwanej pre-miRNA (około 70 – 80 nukleotydów).³⁸ W kolejnym kroku powstałe pre-miRNA jest transportowane przy udziale białek Eksportyny-5 i RanGTP do cytoplazmy, gdzie następuje jego obróbka do postaci około 22-nukleotydowego dupleksu miRNA, zawierającego monofosforan na końcu 5' każdej z nici oraz 3'-OH na końcach 3'. Za ten etap biogenezy miRNA odpowiada białko Dicer oraz kofaktor TRBP (ang. *TAR RNA-binding protein*).³⁹ Związanie miRNA z białkiem Ago (ang. *argonaute*), wchodzącego w skład kompleksu białkowego RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*) rozpoczyna ścieżkę prowadzącą do degradacji mRNA bądź zahamowania jego translacji (Rysunek 5).⁴⁰



Rysunek 5 Biogeneza miRNA i możliwe ścieżki oddziaływania z mRNA. Rysunek zaczerpnięty z pracy Pang et al.³⁶ Numer licencji: 5756681260293

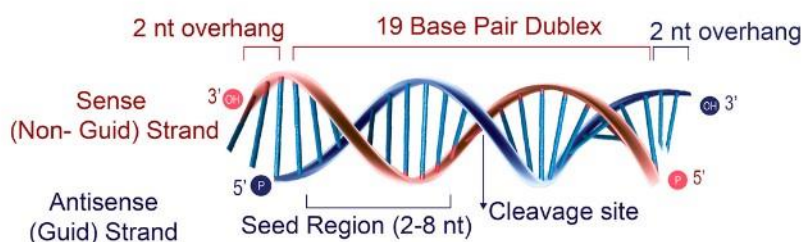
Od odkrycia pierwszej cząsteczki miRNA – lin4 minęło już ponad 30 lat⁴¹ i od tamtego momentu zidentyfikowano szereg funkcji, które mogą pełnić te cząsteczki w komórce. Dojrzałe miRNA odpowiada za posttranskrypcyjną kontrolę jakości mRNA, zapobiega nadmiernemu nagromadzeniu się transkryptów, reguluje wiele procesów biologicznych, w tym proliferację i różnicowanie się komórek, ich zaprogramowaną śmierć (apoptozę) i dojrzewanie.³⁶

2.4.2 Małe interferujące RNA

Małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*, siRNA) jest kolejnym przedstawicielem niekodujących regulatorowych RNA. Prekursorem do powstania siRNA w komórce eukariotycznej jest długi, dwuniciowy fragment RNA o zróżnicowanym pochodzeniu. dsRNA może być wprowadzony do komórki w postaci wirusowego RNA⁴², ale również jego źródłem mogą być centromery, telomery, transpozony⁴³, zbieżne transkrypty mRNA, pary sens-antysens, czy RNA zawierające strukturę spinki do włosów⁴⁴. Proces dojrzewania siRNA przebiega analogicznie do występującego u miRNA. Za rozerwanie wiązań fosfodiesterowych w długich dsRNA odpowiada białko Dicer. Dojrzała i w pełni funkcjonalna cząsteczka siRNA zbudowana jest z dwuniciowego fragmentu nukleotydowego o długości 21-23 nukleotydów, nie posiadającego charakterystycznej dla mRNA struktury kapu, a jedynie monofosforan na końcu 5' obu nici. Każda nić zawiera też charakterystyczny 2-nukleotydowy, niesparowany fragment (zwykle o sekwencji UU) zlokalizowany na końcu 3' (Rysunek 6). Dupleks taki zawiera nić sensowną i antysensowną. W wyniku włączenia siRNA do kompleksu

białkowego RISC, ta pierwsza zostaje uwolniona i zdegradowana.⁴⁵ Nić antysensowna siRNA jest w pełni komplementarna do fragmentu docelowego mRNA.⁴³

siRNA odpowiada w komórce za negatywną regulację posttranskrypcyjną.⁴⁶ Może prowadzić do zahamowania procesu translacji lub/i degradacji mRNA. Zjawisko interferencji genów i w rezultacie ich wyciszenie w wyniku aktywności siRNA stanowi obecnie popularny cel terapeutyczny w leczeniu chorób o podłożu genetycznym.⁴⁷



Rysunek 6 Budowa siRNA. Rysunek zaczerpnięty z pracy Alshaer et al.⁴⁸ Numer licencji: 5757081247709

2.4.3 Działające *in trans* siRNA

W roślinnych komórkach *Arabidopsis* zidentyfikowano małe interferujące RNA działające na mRNA inne niż to, które je koduje, zwane ta-siRNA (ang. *trans-acting siRNA*).⁴⁹ Jest to endogenne siRNA, w którego generowanie zaangażowane są cząsteczki miRNA.⁵⁰ Genom z rodziny TAS jest źródłem transkryptów zawierających sekwencje rozpoznawane przez kompleks białkowy RISC-miRNA. Przecięcie mRNA w miejscu wiązania generuje dwa fragmenty pierwotnego transkryptu: 5' oraz 3', stabilizowane przez białko SGS3 (ang. *Suppressor of Gene Silencing 3*).⁵¹ Do fragmentu 3' rekrutowana jest polimeraza RNA zależna od RNA (RdR6), której zadaniem jest dobudowanie drugiej nici, generując tym samym dsRNA – prekursor ta-siRNA.⁵² Długa, dwuniciowa cząsteczka RNA jest następnie rozpoznawana przez białko DCL4 (ang. *Dicer-like proteins*) i przecinana w równych, 21-nukleotydowych odstępach.⁵³ Charakterystyczna dla siRNA budowa obu końców dupleksu jest tu zachowana w niezmienionej formie. Tak powstałe krótkie dupлекsy siRNA są następnie zdolne do posttranskrypcyjnej negatywnej regulacji genów *in trans* według mechanizmu opisanego powyżej dla siRNA.

2.4.4 Naturalne siRNA pochodzące z transkryptu antysensownego

nat-siRNA (ang. *natural antisense transcript derived siRNA*) to roślinne, endogenne RNA, które w dojrzałej formie osiągają zwykle długość 24 nukleotydów. Obserwuje się u nich, podobnie jak w strukturze siRNA, obecność charakterystycznie zbudowanych końców 5' i 3', w postaci odpowiednio: monofosforanu i dinukleotydowego, niesparowanego fragmentu nici. Zachodzące na siebie sekwencje następujących po sobie genów w chromosomie są źródłem antysensownych transkryptów, częściowo komplementarnych wobec siebie.^{54,55} Ekspresja jednego z genów jest konstytutywna, natomiast druga jest najczęściej indukowana przez czynniki zewnętrzne powodujące stres komórkowy.⁵⁶ Głównym białkiem zaangażowanym w ich transkrypcję jest Polimeraza IV.⁵⁴ Utworzony fragment dsRNA jest wydłużany przez polimerazę RdR6 a następnie cięty przez białka DCL1 i/lub DCL2 do postaci krótkich

dupleksów. Zaobserwowano, że nat-siRNA indukowane w komórkach roślinnych przez patogeny są krótsze i zawierają w sekwencji około 21 nukleotydów.⁵⁷ Niezależnie jednak od tych różnic, rola nat-siRNA jako interferujących RNA w komórce jest zachowana.

2.4.5 Małe interferujące RNA związane z powtórzeniami

ra-siRNA (ang. *repeat-associated small interfering RNA*) zostały zidentyfikowane w komórkach eukariotycznych roślin i niższych zwierząt. Są to cząsteczki endogenne generowane z długich dwuniciowych RNA i osiągające długość w przedziale 25 – 29 nukleotydów.⁵⁸ Podobnie jak w strukturze siRNA, tu również koniec 5' każdej z nici zawiera monofosforan, natomiast na końcach 3' znajduje się charakterystyczny, niesparowany dinukleotyd. W zależności od tego z jaką rodziną białek są związane, mogą powstawać zarówno z sensownej jak i antysensownej nici, jednak drugi z tych przypadków występuje znacznie częściej.⁵⁹ Udowodniono, że u *Drosophila melanogaster* (potocznie: muszka owocowa) ra-siRNA są zlokalizowane głównie w jądrze i pochodzą z różnych powtarzalnych regionów w genomie, takich jak retrotranspozony i regiony heterochromatyczne.^{59,60} Po związaniu z białkami Piwi (ang. *P-element-induced wimpy testis*), odpowiadają za wyciszenie genów, pełniąc tym samym funkcję ochronną dla linii zarodkowej *Drosophila*.⁶⁰ W przypadku modelowego gatunku roślin, *Arabidopsis thaliana*, udowodniono, że w powstawaniu ra-siRNA bierze udział wspomniana już wcześniej polimeraza RdR6 (podrozdział 2.4.3) oraz białko DCL3. W komórce roślinnej ra-siRNA pełni istotną rolę w modyfikacji heterochromatyny poprzez metylację histonów i reszt cytydynowych w DNA.⁶¹

2.4.6 RNA oddziałujące z białkami Piwi

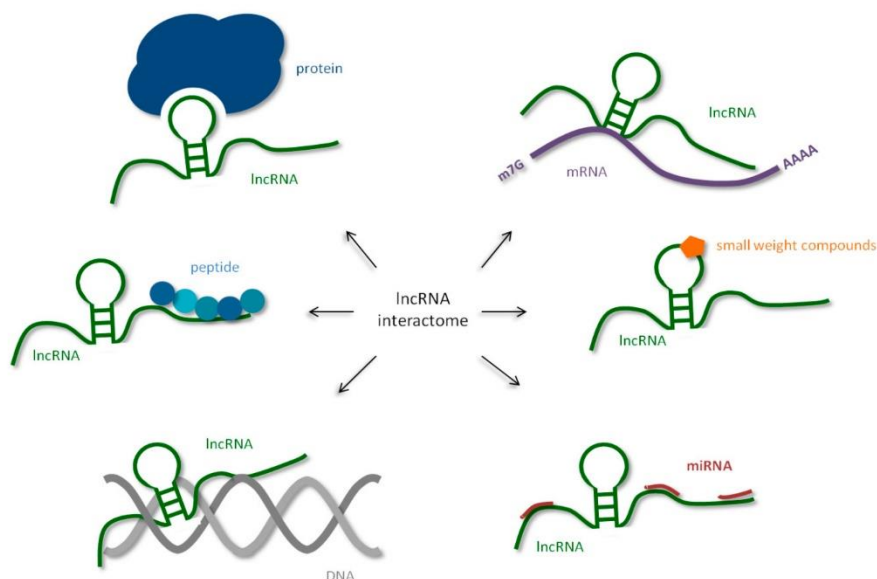
Kolejną grupą cząsteczek oddziałujących z białkami Piwi z rodziny Argonaute, które jednak zachowują swoją odrębność w klasyfikacji, są piRNA (ang. *Piwi-interacting RNA*). Podobnie jak ra-siRNA, są nieco dłuższe, niż pozostałe małe regulatorowe RNA i składają się z 26 – 31 nukleotydów.⁶² Geny kodujące piRNA często stanowią skupiska, dość zróżnicowane pod względem rozmiaru (1 – 100 kpz), a z pojedynczego locus może być wygenerowane nawet 4500 piRNA.⁶³ Sugeruje się, że ich źródłem mogą być długie, pierwotne transkrypty, jednak ścieżka biogenezy jest prawdopodobnie zupełnie różna od tej znanej dla miRNA i do tej pory nie została w pełni poznana.⁶³ piRNA nie posiadają na końcu 5' charakterystycznej struktury kapu, a jedynie monofosforan, który jest kluczowy podczas interakcji z białkami Piwi. Koniec 3' jest z kolei chroniony przed aktywnością egzonukleaz dzięki obecności grupy -O-CH₃ w pozycji 2' ostatniej w sekwencji rybozy. Z badań wynika, że piRNA w białkowym kompleksie, zarówno w przypadku ssaków, jak i niższych organizmów, odrywa ważną rolę w regulacji gametogenezy poprzez utrzymanie wyciszenia transpozonów w genomie linii zarodkowej.^{64,65} Biorąc udział w mechanizmie obronnym przed mutagennymi sekwencjami, piRNA przyczynia się do epigenetycznej regulacji i ochrony genomu.⁶⁶

2.5 Duże regulatorowe RNA

Pod względem budowy znaczna część dużych regulatorowych RNA przypomina cząsteczki mRNA, przez co często stosowane jest też określenie mlncRNA (ang. *mRNA-like noncoding RNA*). Są one bardzo zróżnicowane pod względem rozmiaru i mogą osiągać od dwustu do nawet kilkunastu tysięcy nukleotydów w sekwencji.⁶⁷ Łańcuch lncRNA, podobnie

jak mRNA, posiada na końcu 5' strukturę m⁷G kapu, a jego 3'-koniec może ulegać poliadenylacji.⁶⁸⁻⁷⁰ Częsteczki te powstają na drodze transkrypcji, głównie przy udziale polimerazy RNA II, a transkrypt pierwotny ulega obróbce analogicznie do ścieżki odpowiadającej kodującym RNA. Te podobieństwa stwarzają pewne problemy w poprawnej identyfikacji lncRNA. Kryterium rozmiaru wydaje się być niewystarczającym, biorąc pod uwagę różnorodność transkryptów kodujących. Problem w klasyfikacji RNA pojawił się również gdy odkryto, że niektóre lncRNA, posiadają sekwencje kodujące białka o stosunkowo niewielkich rozmiarach.^{71,72} Co więcej, najnowsze badania wskazują, że niektóre RNA pełnią rolę zarówno mRNA jak i ncRNA, a zjawisko to może być bardziej rozpowszechnione niż nam się wydawało.⁷³ Ostatecznie przyjmuje się, że każdy transkrypt o długości powyżej 200 nukleotydów i nieposiadający otwartej ramki odczytu, zdolnej do kodowania w pełni funkcjonalnego białka, traktowany jest jako lncRNA.⁶⁷ Wydaje się jednak, że kryteria te nie są ostateczne i wraz z rozwojem wiedzy na temat transkryptów kodujących i niekodujących, będziemy w stanie bardziej precyzyjnie określić granicę pomiędzy nimi. Pochodzenie dużych regulatorowych RNA nie sprowadza się do jednego locus w genomie. Badania wskazują, że źródłem takich transkryptów mogą być sekwencje międzygenowe, pseudogeny, a także nici antysensowne, sekwencje powtórzeniowe czy też introny.^{67,74} Transkrypty takie lokalizują się zarówno w jądrze komórkowym jak i cytozolu, zależnie od pełnionych funkcji. Biologiczna rola tak różnorodnych cząsteczek sprowadza się do szeroko pojętej regulacji procesów zachodzących w komórce. Pod tym dość ogólnym zapisem kryje się przede wszystkim regulacja ekspresji genów, zdolność lncRNA do modyfikacji chromatyny i udział w organizacji struktury komórkowej.⁷⁴ Takie aktywności są możliwe dzięki temu, że długie niekodujące transkrypty mogą oddziaływać z innymi cząsteczkami kwasów nukleinowych, zarówno RNA jak i DNA, oraz białkami (Rysunek 7). Często w takie interakcje zaangażowane są również sekwencje powtórzeniowe.⁷⁵ Przykładem długiego regulatorowego RNA, które bierze udział w modyfikacji struktury chromatyny jest Xist RNA (ang. *X-inactive-specific transcript*). Jest to jeden z pierwszych opisanych i lepiej poznanych lncRNA.⁷⁶⁻⁷⁸ W wyniku jego działania inaktywowany jest chromosom X (ang. *X-chromosome inactivation*, XCI) co prowadzi bezpośrednio do wyrównania dawki genów na chromosomie X pomiędzy osobnikami płci żeńskiej (XX) i męskiej (XY).⁷⁹ Xist ulega ekspresji z miejsca określanego jako XIC (ang. *X-inactivation center*), po czym kumuluje się wewnątrz jądra komórkowego. Podczas XCI rola Xist sprowadza się do rekrutowania wielu czynników biologicznych, zdolnych do zmiany organizacji chromatyny i tym samym chromosomu X.^{80,81} Proces XCI obejmuje cały chromosom, jednak nawet 12 – 20% ludzkich genów z nim sprzężonych unika wyciszenia ekspresji.⁸² Sugeruje się, że zjawisko to powiązane jest z wieloma jednostkami chorobowymi, które dotyczą osobniki płci żeńskiej.⁸² Drugim przykładem niekodującego RNA jest H19, który, choć krótszy (2,3 kb, ang. *kilobase*) od opisywanego powyżej Xist (17,5 kb), nadal spełnia warunki, aby zaklasyfikować go jako lncRNA. Częsteczka ta na etapie dojrzewania ulega kapowaniu, poliadenylacji a także *splicingowi*.^{83,84} W swojej sekwencji posiada wiele zmodyfikowanych, w tym przypadku metylowanych, zasad azotowych, w postaci m⁶A i m⁵C, które warunkują stabilność H19 i jego zdolność do wiązania z białkami, np. G3BP1 będącym onkoproteina (białkiem, które przyczynia się do transformacji nowotworowej komórek). H19 powstaje w wyniku ekspresji genu dziedziczonego po matce, co ściśle związane jest z imprintingiem genomowym i przekłada się na udział w chorobach dziedzicznych. Udowodniono rolę H19 w procesie nowotworzenia, przez co transkrypt ten stał się celem terapeutycznym w badaniach onkologicznych.⁸⁵⁻⁸⁷ Dowiedziono również, że transkrypt H19 może pełnić rolę prekursora dla miRNA.⁸⁸ Mimo, że to lncRNA było jednym z pierwszych

odkrytych i opisanych, literatura nadal jest uzupełniana o kolejne funkcje, które może pełnić ten transkrypt oraz potencjalne ich zastosowanie. Warto zwrócić uwagę, że niekodujące RNA przez dość długi czas były traktowane jako „szum transkrypcyjny” i nie przypisywano im żadnej istotnej roli. Teraz, w obliczu coraz nowszych odkryć, pokazuje to dobitnie, jak bardzo nie doceniono ich funkcji.



Rysunek 7 Możliwe oddziaływania lncRNA z biocząsteczkami w komórce. Rysunek zaczerpnięty z pracy Kazimierzczyk et al.⁸⁹

2.6 RNA konstytutywne

RNA konstytutywne stanowią niezwykle zróżnicowaną grupę biocząsteczek, które mają fundamentalne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania maszyneryi komórkowej. Charakteryzują się wyjątkowo stabilną ekspresją, co objawia się ich produkcją na stałym poziomie, niezależnie od typu komórek lub czynników zewnętrznych. Utrzymywanie względnie stałego stężenia konstytutywnych RNA, warunkuje prawidłowy przebieg kluczowych procesów komórkowych, między innymi transkrypcji, translacji czy replikacji DNA. RNA konstytutywne obejmuje kilka strategicznych klas RNA, w tym małe jądrowe RNA (snRNA), małe jąderkowe RNA (snoRNA), rybosomalne RNA (rRNA), transferowe RNA (tRNA), czy też transferowo-informacyjne RNA (tmRNA). Każda z wymienionych grup RNA ma ściśle określoną rolę w komórce, a budowa każdej z cząsteczek jest uwarunkowana pełnioną funkcją. Poznanie dokładnych mechanizmów ich działania nadal stanowi niemałe wyzwanie, jednak dążenie do ich pełnego zrozumienia jest konieczne w kontekście wyjaśniania dynamiki funkcjonowania komórki i rządzących tym zależności. W poniższych podrozdziałach zostały przedstawione dane literaturowe na temat poszczególnych klas konstytutywnych RNA, ze szczególnym uwzględnieniem ich budowy, biogenezy oraz pełnionych funkcji.

2.6.1 Małe jądrowe RNA

Jednym z najlepiej poznanych i opisanych konstytutywnych RNA jest małe jądrowe RNA (ang. *small nuclear RNA*, snRNA). Wyróżniamy dwie główne klasy snRNA, wyodrębnione ze względu na różnice w strukturze cząsteczek i rodzaju ich kofaktorów białkowych: Sm oraz Lsm.⁹⁰ W skład pierwszej z tych klas wchodzi RNA oznaczane jako U1, U2, U4, U4_{atac}, U5, U7, U11 oraz U12, z kolei do drugiej z nich należą jedynie U6 i U6_{atac}. Zasadniczą różnicą w budowie tych kwasów nukleinowych jest struktura znajdująca się na końcu 5' – Sm snRNA zawiera hipermetylowaną guanozynę (m₃^{2,2,7}G), zwaną TMG kapem, podczas gdy Lsm snRNA posiada monometylowany 5'-trifosforan (γ-CH₃ppp).⁹¹ Długość łańcuchów w obu opisywanych przypadkach jest zbliżona i wynosi około 150 nukleotydów.⁹⁰ snRNA nie posiada poliadenylowanego ogona, jak to ma miejsce w przypadku kodującego mRNA. Obie klasy snRNA zawierają jednak na końcu 3' charakterystyczne wewnątrzcząsteczkowe pętle macierzyste, różniące się pod względem struktury II-rzędowej. Dodatkowo dla RNA z klasy Lsm charakterystyczne są krótkie fragmenty poli U, stanowiące miejsce wiązania białek Lsm. Analogiczne miejsce wiązania dla grupy siedmiu białek Sm znajduje się wewnątrz cząsteczki Sm snRNA.^{91,92} Różnice pomiędzy klasami snRNA występują też na etapie transkrypcji – w syntezę Sm snRNA zaangażowana jest polimeraza RNA II, podczas gdy dla Lsm jest to polimeraza RNA III.

Biogeneza Lsm snRNA z udziałem polimerazy RNA III jest ograniczona lokalizacyjnie do jądra komórkowego.⁹⁰ Sygnałem do zakończenia transkrypcji jest fragment poli U na końcu 3' nowoutworzonego RNA. Ten fragment sekwencji stanowi miejsce przejściowego wiązania z białkiem La, które to zapewnia stabilizację transkryptu, chroni go przed egz nukleazami i ułatwia tworzenie kompleksów rybonukleoproteinowych (ang. *ribonucleoprotein*, RNP).⁹³ W kolejnym kroku białko La jest zastępowane przez białka Lsm tworzące kompleks z niedojrzałym jeszcze, 5'-trifosforylowanym snRNA. Wykazano, że tworzenie kompleksu z białkami Lsm jest czynnikiem warunkującym kierowanie RNA do jąderka, gdzie następuje etap 2'-O-metylacji i pseudourydylacji oraz do ciała Cajala, gdzie metylowana jest grupa 5'-fosforanowa. Tak uformowane Lsm snRNA jest transportowane do jego docelowego miejsca aktywności.

Proces powstawania i dojrzewania Sm snRNA wydaje się być bardziej skomplikowany niż opisywany powyżej przypadek. Biogeneza RNA klasy Sm obejmuje zarówno nukleoplazmę jak i cytoplazmę a ekspresja genów snRNA rozpoczyna się od transkrypcji, w której uczestniczy polimeraza RNA II.⁹⁴ Jeszcze w jądrze ma miejsce dołączanie do 5'-końca RNA struktury kapu w postaci kanonicznego m⁷G a następnie transkrypt wiąże się w kompleks z białkami umożliwiającymi jego transport do cytoplazmy: receptorem CRM1 (ang. *chromosome region maintenance-1*), PHAX (ang. *hyperphosphorylated adaptor for RNA export*), CBC (ang. *cap-binding complex*), oraz Ran GTPazą.^{90,95} Tak zbudowany struktura, po przejściu przez kompleks porów jądrowych, ulega dysocjacji, a proces ten jest inicjowany przez defosforylację PHAX oraz hydrolizę RAN GTPazy. W cytoplazmie kompleks białkowy SMN (ang. *survival of motor neurons*) wspomaga snRNA w rekrutacji siedmiu białek Sm, oznaczanych jako: B, B', D1, D2, D3, E, F oraz G.⁹⁶ Etap ten jest konieczny do przeprowadzenia przez metylotransferazę Tgs1 hipermetylacji kanonicznego kapu m⁷G do kapu TMG (m₃^{2,2,7}G) oraz obróbki końca 3' Sm snRNA. Prawidłowy przebieg procesu inicjuje rekrutację białek odpowiedzialnych za ponowny transport kompleksu do nukleoplazmy: snurportynę-1 (SPN1) oraz importynę β (Imp-β). Białka te w nukleoplazmie oddysocjują od kompleksu Sm snRNA,

który kierowany jest do ciałek Cajala. Tam kompleks rybonukleoproteiny (Sm snRNP) ulega dojrzewaniu poprzez rekrutację specyficznych białek i finalnie kierowany jest do włókien perichromatynowych (ang. *perichromatin fibrils*, PF) celem udziału w splicingu, bądź też gromadzony w międzychromatynowych skupiskach (ang. *interchromatin granule clusters*, IGC), stanowiących swoistą poczekalnię dla Sm snRNP.⁹⁷

Główną funkcją wszystkich snRNA jest czynny udział w obróbce i dojrzewaniu pre-mRNA. Grupa snRNA tworzy, razem z ponad 200 białkami, spliceosom – ogromną maszynę komórkową odpowiedzialną za splicing pierwotnych transkryptów docelowego mRNA. Wyjątkiem jest U7 RNA, który odpowiada za obróbkę końca 3' histonowego pre-mRNA.⁹¹ snRNP tworzą z docelowym pre-mRNA kompleksy typu RNA-RNA, rozpoznając sekwencję intronu oraz stabilizując centrum aktywne spliceosomu. Badania wskazują, że to U1 snRNA jest odpowiedzialny za inicjację tego procesu – po wyciszeniu genu U1 zaobserwowano nagromadzenie się pre-mRNA, które nie miało wyciętych intronów, mimo obecności pozostałych snRNP.⁹⁸

Zaburzenia na jakimkolwiek etapie ekspresji genów snRNA oraz ich biogenezy, mogą skutkować występowaniem poważnych chorób genetycznych. Przykładem jest mutacja genu SMN1, która prowadzi do rdzeniowego zaniku mięśni.^{99,100}

2.6.2 Małe jąderkowe RNA

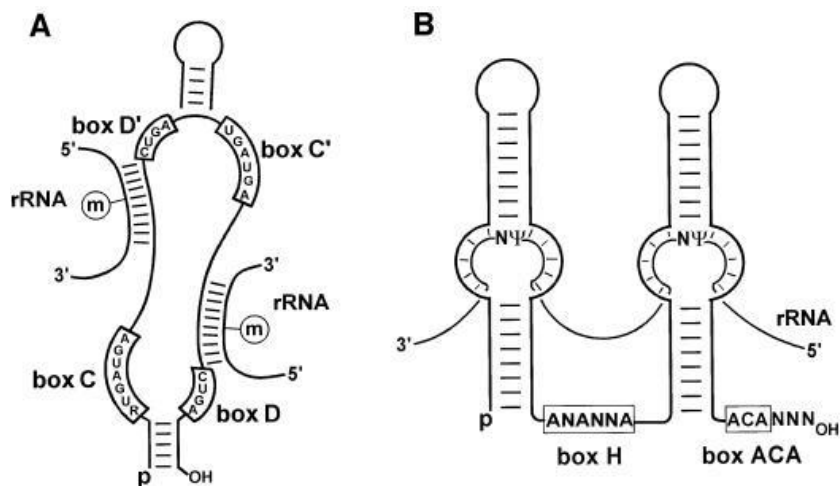
Jedną z najliczniejszych grup niekodujących konstytutywnych RNA są małe jąderkowe RNA (ang. *small nucleolar RNA*, snoRNA), które obejmują dwie rodziny: C/D i H/ACA RNA. Długość transkryptów waha się między 60 a 300 nukleotydów w sekwencji¹⁰¹ a ich głównym źródłem są introny. Nie posiadają one struktury kapu na końcu 5' ani poliadenylowanego ogona na końcu 3' (Rysunek 8A). Początkowo zakładano, że lokalizacja snoRNA ogranicza się w komórce do jąderka i na tej też podstawie nadano nazwę nowo odkrytemu RNA. Wraz z rozwojem badań nad niekodującymi transkryptami, okazało się, że założenie to jest błędne a przedstawicieli snoRNA można znaleźć również w nukleoplazmie i cytoplazmie.

snoRNA z grupy C/D zawierają w swojej strukturze dwie charakterystyczne sekwencje – znajdującą się w pobliżu końca 5' sekwencję C: 5'-RUGAUGA-3', gdzie R to dowolna puryna, oraz znajdującą się w pobliżu końca 3' sekwencję D: 5'-CUGA-3'.¹⁰² Dodatkowo C/D snoRNA mają też dwie domeny, będące często nieidealną kopią domen C i D: C': 5'-UGAUGA-3' i D': 5'-CUGA-3', zlokalizowane w centralnej części cząsteczki i oddzielone od siebie sekwencją 3-9 nukleotydów (Rysunek 8A).¹⁰³ Fragmenty sekwencji znajdujące się pomiędzy motywem C/D' oraz D/C' stanowią miejsce wiązania rRNA. Dokładna pozycja wyżej opisanych elementów warunkuje specyficzność snoRNA wobec cząsteczek z którymi oddziałują oraz poprawne złożenie aktywnej rybonukleoproteiny. Druga grupa snoRNA – H/ACA charakteryzuje się strukturą opartą na dwóch elementach zwanych *spinką do włosów* (ang. *hairpin*) oraz dwóch jednoniciowych fragmentach – H: 5'-ANANNA-3', oraz ACA: 5'-ACANNN-3', gdzie N to dowolny nukleotyd (Rysunek 8B).^{104,105} Wewnętrzne pętle motywów *spinki do włosów* stanowią miejsce wiązania rRNA.¹⁰³

Małe jąderkowe RNA charakteryzują się dużą różnorodnością komórkowych procesów biologicznych, w których uczestniczą. snoRNA są ściśle powiązane z rRNA i są zdolne do modyfikacji ich kluczowych centrów aktywności.^{106,107} Są niezbędne dla przebiegu splicingu pre-mRNA oraz translacji białek, odpowiadają za 2'-O-metylację rybozy w rRNA

i snRNA oraz pseudourydylację w tRNA, rRNA i snRNA. Rola znacznej ilości snoRNA obecnych w komórce nadal jest niepoznana. Tak zwane *sieroce* snoRNA posiadają sekwencje, które nie są komplementarne do poznanych dotąd RNA.¹⁰⁸

Mnogość procesów biologicznych, w których swój udział zaznaczają jąderkowe RNA powoduje, że stały się one obiektem zainteresowań naukowców, szczególnie w kontekście poszukiwania markerów chorobowych. Mutacje z pozoru związane z najmniej istotnym elementem szlaku biogenezy mogą stać się przyczyną poważnych chorób organizmu. Przykład stanowi mutacja w obrębie H/ACA snoRNA, która jest przyczyną dyskeratozy wrodzonej – dziedzicznego zespołu niewydolności szpiku kostnego. Jest to stosunkowo rzadkie schorzenie, charakteryzujące się występowaniem zmian na skórze, w błonie śluzowej oraz na paznokciach. W zaawansowanym stadium choroby następuje całkowita niewydolność szpiku kostnego i proces nowotworzenia.⁹¹ Zespół Pradera-Williego jest schorzeniem rozwijającym się na skutek wyciszonej ekspresji genów C/D snoRNA. Chorzy cierpią z powodu skrajnej otyłości wywołanej niepochamowanym głodem, towarzyszącej temu cukrzycy i upośledzenia umysłowego. Charakterystyczny jest dla nich niski wzrost, zaburzenia pracy mięśni i problemy poznawczo-behawioralne.⁹¹ Choroba ta występuje znacznie częściej niż opisywana wyżej dyskeratoza i dotyka 1 na 12000 osób. Intensywnie prowadzone są również badania nad zastosowaniem snoRNA do diagnostyki raka piersi. Wykazano, że nieprawidłowa ekspresja genów snoRNA promuje proces nowotworzenia. Ponieważ ekspresja w warunkach normalnych i chorobowych prowadzi do powstania znacząco różnej ilości snoRNA, mierzenie ich poziomu może stanowić skuteczną metodę do przewidywania wystąpienia raka piersi na wczesnym etapie.¹⁰⁹



Rysunek 8 Schematyczne przedstawienie budowy snoRNA (A) C/D snoRNA (B) H/ACA snoRNA. Rysunek zaczerpnięty z pracy Tamás Kiss.¹⁰³

2.6.3 Rybosomalne RNA

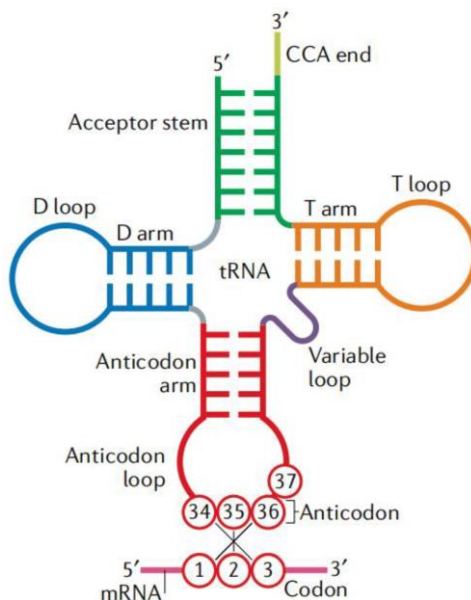
Rybosomalne RNA (ang. *ribosomal RNA*, rRNA) jest produktem transkrypcji, która odbywa się w jąderku, głównie z udziałem polimerazy RNA I. Na etapie dojrzewania pre-rRNA

nukleotydy wchodzące w skład sekwencji rRNA mogą ulegać modyfikacjom w postaci 2'-O-metylacji oraz pseudourydylacji, za co odpowiedzialne są opisane w poprzednim podrozdziale snoRNA.^{91,110} Finałnym etapem prowadzącym do powstania w pełni funkcjonalnych rRNA jest precyzyjne rozcinanie pre-rRNA, w którym udział bierze około 200 różnych białek.^{111,112} Rybonukleoproteiny utworzone na potrzeby przeprowadzenia cięcia pre-mRNA nazywamy *procesomem*, i ze względu na ich ogromny rozmiar, można je zaobserwować przy pomocy mikroskopu elektronowego. Dojrzałe rRNA, które jest uwalniane z takiego kompleksu, posiada już przyłączone białka rybosomowe, co bezpośrednio prowadzi do utworzenia odpowiednio małych i dużych podjednostek rybosomowych.^{113,114} Pojedynczy prekursor u ssaków koduje trzy rodzaje cząsteczek rRNA, które wchodzą w skład rybosomu. Elementem małej podjednostki rybosomu (40S) jest 18S rRNA, natomiast 5.8S rRNA i 28S rRNA stanowią wkład do dużej podjednostki rybosomu (60S). Dodatkowo u eukariontów występuje też 5S rRNA, wchodzące w skład dużej podjednostki – w odróżnieniu od pozostałych, transkrybowane jest przy udziale polimerazy RNA III i stanowi oddzielny transkrypt. U prokariotów w skład małej podjednostki wchodzi 16S rRNA, natomiast w skład dużej – 5S rRNA oraz 23S rRNA. Rybosomy w komórce odpowiadają za jeden z najważniejszych procesów biologicznych – biosyntezę białka na matrycy mRNA. Badania dowodzą, że aktywność katalityczną w tym procesie zapewnia właśnie rRNA, natomiast białka mu towarzyszące pełnią rolę pomocniczą, odpowiadając między innymi za stabilizację kompleksu. Mutacje, które występują na etapie ekspresji genów kodujących rRNA mogą spowodować niepoprawne składanie kompleksów rybonukleoprotein bądź też je dezaktywować a to prowadzi do nieprawidłowości w mechanizmie translacji białek. Dodatkowo badania wskazują, że zaburzenia biosyntezy rRNA prowadzą do śmierci komórek nerwowych, a co za tym idzie stanowią cechę charakterystyczną dla zaburzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, czy też stwardnienie zanikowe boczne.^{115–117}

2.6.4 Transferowe RNA

Cząsteczki transferowego RNA (zwane też transportowym RNA, ang. *transfer RNA*, tRNA) w komórkach eukariotycznych powstają na drodze transkrypcji z udziałem polimerazy RNA III.¹¹⁸ Dojrzałe tRNA osiągają wielkość w przedziale 70 – 90 nukleotydów w sekwencji a ich struktura drugorzędowa przypomina kształtem liść koniczyny.¹¹⁹ Cząsteczka tRNA zawiera pięć charakterystycznych elementów: trzon akceptorowy, ramię i pętlę D, ramię i pętlę antykodonu, region zmienny oraz ramię i pętlę TΨC (Rysunek 9). 5'-koniec tRNA jest monofosforylowany, natomiast na końcu 3' znajduje się sekwencja 5'-CCA-OH-3', która stanowi miejsce przyłączania aminokwasów. Trzon akceptorowy wraz z ramieniem D odpowiadają za rozpoznawanie enzymów zaangażowanych w rekrutację aminokwasów – syntetaz aminoacylo-tRNA. Rolą ramienia TΨC jest z kolei oddziaływanie z rybosomami, co warunkuje wydajny proces translacji.¹¹⁹ Biologiczną funkcją tRNA jest dostarczanie aminokwasów w celu włączenia ich do łańcucha polipeptydowego, zgodnie z sekwencją warunkowaną przez trinukleotydowe kodony w mRNA. Taki mechanizm biosyntezy białek wymusza obecność pętli zawierającej antykonon, który parowany jest z kodonem mRNA poprzez wiązania wodorowe typu Watsona i Cricka.¹²⁰ Sekwencje wszystkich tRNA zawierają stosunkowo wysoki udział modyfikowanych nukleotydów, zazwyczaj od 7 do 15 na jedną cząsteczkę, głównie w postaci jednej bądź dwóch dodatkowych grup metylowych. Rolą tych modyfikacji jest prawdopodobnie stabilizacja struktury i wpływ na rozpoznawanie odpowiednich kodonów.¹¹⁹ Badania wskazują, że oprócz udziału z biosyntezie białek, tRNA

jest istotnym źródłem innych małych niekodujących RNA.¹²¹ Obecność takich ncRNA została powiązana z licznymi schorzeniami, takimi jak choroby neurodegeneracyjne, nowotwory czy choroby upośledzające układ odpornościowy.¹²¹ Częsteczki te mogą pełnić rolę biomarkerów, jednak do ustalenia pozostaje czy są one przyczyną czy efektem stanów chorobowych.



Rysunek 9 Schematyczne przedstawienie struktury cząsteczki tRNA. Rysunek zaczerpnięty z pracy Ding et al.¹²²

2.6.5 Transferowo-informacyjne RNA

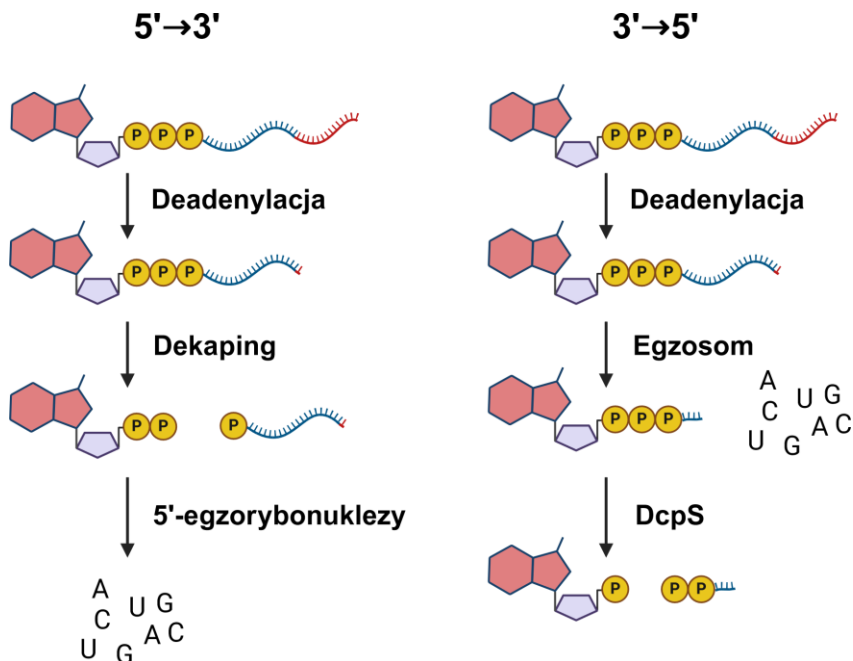
Komórki bakteryjne posiadają specyficzny rodzaj ncRNA, które mają cechy funkcjonalne zarówno tRNA, jak i mRNA. Są to cząsteczki transferowo-informacyjnego RNA (ang. *transfer-messenger RNA*, tmRNA), zwane też 10Sa lub SsrA RNA, których główną rolą jest degradacja wadliwych transkryptów, nieposiadających kodonu STOP.¹²³ Zazwyczaj mają one długość 250 – 425 nukleotydów w sekwencji a ich struktura przestrzenna jest zbliżona do struktury tRNA.^{123,124} tmRNA posiada fragment zwany TDL (ang. *tRNA-like domain*), który zawiera sekwencję 5'-CCA-OH-3', oraz MDL (ang. *mRNA-like domain*) z otwartą ramką odczytu, zawierającą najczęściej kilkanaście kodonów, w tym kodon STOP.¹²⁵ tmRNA w rybnukleoproteinowym kompleksie z białkiem SmpB (ang. *small protein B*) uczestniczy w tak zwanej trans-translacji. Jest to proces rozpoczynający się związaniem tmRNP z rybosomem, który zatrzymał się na sekwencji mRNA nieposiadającej kodonu STOP. Zadaniem tmRNA jest umożliwienie rybosomom dokończenia translacji poprzez zapewnienie zapasowego szablonu, oznaczenie polipeptydu utworzonego z wadliwego transkryptu oraz ułatwienie degradacji uszkodzonego mRNA.^{126–128}

2.7 Terapeutyczne zastosowania RNA

Różnorodność RNA pod względem pełnionych w komórce funkcji i ich wysoka specyficzność działania, otwierają szereg nowych możliwości na polu terapeutycznym. Rozwój biotechnologii i medycyny już teraz pozwala na skuteczne wykorzystanie siRNA w terapiach genowych podczas wyciszania nieprawidłowo funkcjonujących genów lub aktywacji genów kodujących pożądane białka. Ma to szczególnie istotne znaczenie podczas opracowywania strategii walki z chorobami o podłożu genetycznym, zakaźnym i neurologicznym. Równie rewolucyjnym okazało się opracowanie opartej na gRNA (ang. *guide RNA*) metody CRISPR-Cas9, umożliwiającej edycję genomu z nieosiągalną do tej pory precyzją. Technologia ta poszerza zestaw dostępnych narzędzi molekularnych użytecznych w genetyce, co otwiera nowe perspektywy w badaniach podstawowych, mających na celu dokładne poznanie funkcji genów. Ze względu na pełnione funkcje w komórce, również syntetyczne miRNA wykazują ogromny potencjał terapeutyczny. Prowadzone są liczne badania (również na etapie klinicznym) w kontekście wykorzystania miRNA jako markera rozwoju nowotworów, w szczególności krwi (białaczka, chłoniak). mRNA znalazło swoje praktyczne zastosowanie w projektowaniu szczepionek przeciw COVID-19, co niezaprzeczalnie ujawniło ogromny wpływ technologii opartych na kodującej cząsteczce RNA w ograniczaniu rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych. Obiecujące wyniki, uzyskiwane są także w nowatorskich terapiach przeciwnowotworowych, co potwierdzają liczne badania w fazie klinicznej i przedklinicznej. Wszystkie te zastosowania udowadniają niezwykle rolę i potencjał RNA, jako podstawowego elementu stojącego u podstaw rozwoju nowych, innowacyjnych podejść terapeutycznych. Niewątpliwie jednak kluczem do postępu w tej dziedzinie jest dokładne poznanie cyklu życia komórkowego RNA i warunków zapewniających jego stabilność. Kluczowym elementem wydaje się być aktywność enzymów degradujących RNA, które w dużej mierze zapewniają kontrolę jakości transkryptów.

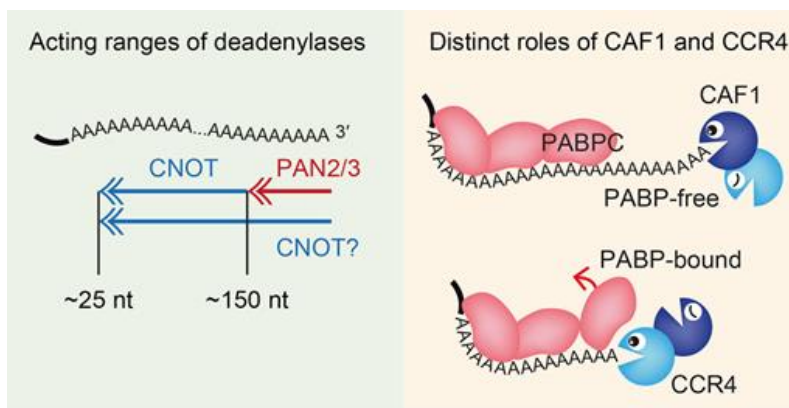
3. Enzymatyczna degradacja RNA

Rozpad RNA kodujących białka, jak i krótszych niekodujących transkryptów jest istotnym elementem post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Obecnie stan wiedzy na temat ścieżek degradacji mRNA jest znacznie bogatszy niż ma to miejsce w przypadku ncRNA, jednakże nadal nie jest to wiedza kompletna. Literatura wskazuje, że u wielu organizmów głównymi wykonawcami procesu degradacji RNA, zarówno kodujących, jak i niekodujących, są te same białka, często wspomagane przez kofaktory, jednak czynniki warunkujące ich specyficzność są nieznane.¹²⁹ W komórkach eukariotycznych system kontroli jakości mRNA nie pozwala na dopuszczenie wadliwego transkryptu do procesu translacji. Uszkodzenie mRNA jest wykrywane przez skomplikowane białkowe mechanizmy kontrolne, a następnie transkrypt kierowany jest na ścieżkę degradacji. W przypadku prawidłowo zbudowanego mRNA ochronę przed przedwczesną degradacją przez egzorybonukleazy zapewnia obecność kompleksu białkowego inicjującego translację – eIF4F, który wiąże się z końcem 5' mRNA, oraz białka PABP związanego z ogonem poliA na końcu 3' transkryptu. Zachodząca „pseudocykularyzacja” cząsteczki mRNA dodatkowo utrudnia dostęp enzymom degradującym, jednocześnie inicjując proces translacji. Odsłonięcie kluczowych elementów struktury mRNA naraża cząsteczkę na atak enzymów degradujących, przebiegający według dwóch podstawowych ścieżek: w kierunku 5'→3' oraz 3'→5' (Rysunek 10).



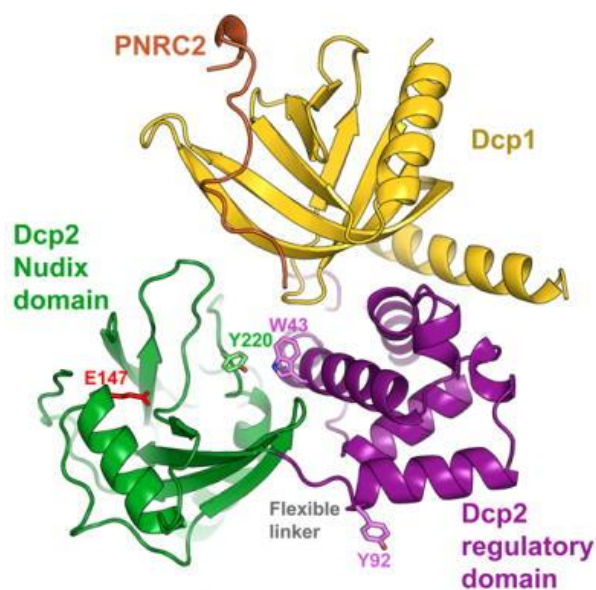
Rysunek 10 Schematyczne przedstawienie ścieżki degradacji mRNA w kierunku 5' → 3' oraz 3' → 5'.

Degradacja w komórkach eukariotycznych ma miejsce głównie w cytoplazmie i niezależnie od ścieżki, rozpoczyna się skróceniem ogona poliA wadliwego transkryptu. Enzymy odpowiedzialne za deadenylację tworzą wielopodjednostkowe kompleksy białkowe CCR4 – CAF1-NOT (CNOT) oraz PAN2-PAN3, których elementy ściśle ze sobą współpracują.¹³⁰ CCR4 i CAF1 stanowią katalityczne podjednostki kompleksu CNOT i wykazują różne aktywności: CAF1 przycina wolne fragmenty poliA a jego aktywność jest blokowana przez białko PABP związane z ogonem poliA, podczas gdy CCR4 jest aktywowany do deadenylacji tak chronionych transkryptów.¹³¹ CCR4 wspomaga oddysocjowanie PABP od poliadenylowanego transkryptu i umożliwia dalszą degradację. Jednorazowo CNOT jest w stanie usunąć fragment zawierający 27 nukleotydów, co odpowiada długości ogona poliA związanej z jednym białkiem PABP. Długie ogony poliA (tj. zawierające co najmniej 110 A) są rozpoznawane i degradowane przez kompleks PAN2-PAN3. Podobnie jak w przypadku CNOT, jednorazowo usuwane są fragmenty zawierające około 27 nukleotydów, jednak do samej inicjacji deadenylacji konieczne są przynajmniej dwie cząsteczki PABP związane z ogonem. Aktywność kompleksu PAN2-PAN3 spada wraz z długością ogona poliA.¹³² Przyjmuje się, że PAN2-PAN3 odpowiada za wstępne skracanie ogona podczas zainicjowanej deadenylacji (Rysunek 11).¹³¹



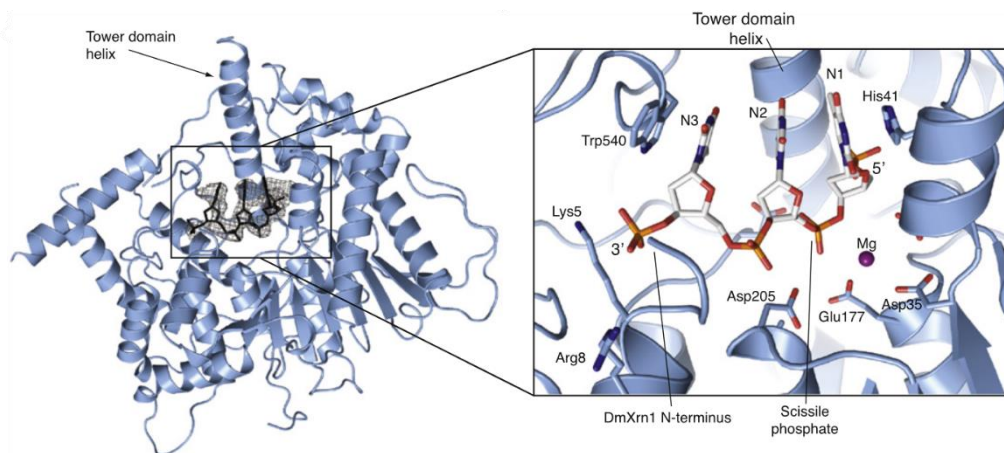
Rysunek 11 Schematyczne przedstawienie aktywności kompleksu CNOT oraz PAN2-PAN3. Rysunek zaczerpnięty z pracy Yi et al.¹³¹

W kolejnym kroku degradacja na ścieżce 5'→3' wymaga usunięcia struktury kapu z 5'-końca mRNA, a proces ten nazywamy dekapowaniem (ang. *decapping*). Białka LSM1-7/Pat1 wiążą się z końcem 3' mRNA i rekrutują kompleks dekapujący.¹³³ Kanoniczna struktura kapu m⁷G jest rozpoznawana i hydrolizowana przez enzym z rodziny Nudix – Dcp2. Podczas degradacji kapu cięcie następuje pomiędzy pozycją α i pozycją β w mostku 5',5'-trifosforanowym, uwalniając tym samym m⁷GDP oraz transkrypt zawierający 5'-monofosforan, podatny na degradację przez 5'-egzorybonukleazy. Skuteczne działanie Dcp2 jest uwarunkowane obecnością białek pomocniczych, odpowiadających za zmiany konformacyjne kompleksu, tj. Dcp1 i Edc1 (ang. *enhancer of decapping*), oraz białka wspomagającego proces hydrolizy wiązania fosforanowego w strukturze kapu – PNRC2 (ang. *proline-rich nuclear receptor coregulatory protein*) (Rysunek 12).¹³⁴ Dekapowanie przy udziale enzymu Dcp2 jest uznawany za najpowszechniej występujący wariant w komórkach eukariotycznych, jednak obecnie znanych i opisanych w literaturze jest około 20 enzymów zdolnych do degradacji kanonicznego kapu m⁷G lub jego naturalnych analogów. Szczegółowa charakterystyka najistotniejszych z nich zostanie przedstawiona w kolejnych podrozdziałach.



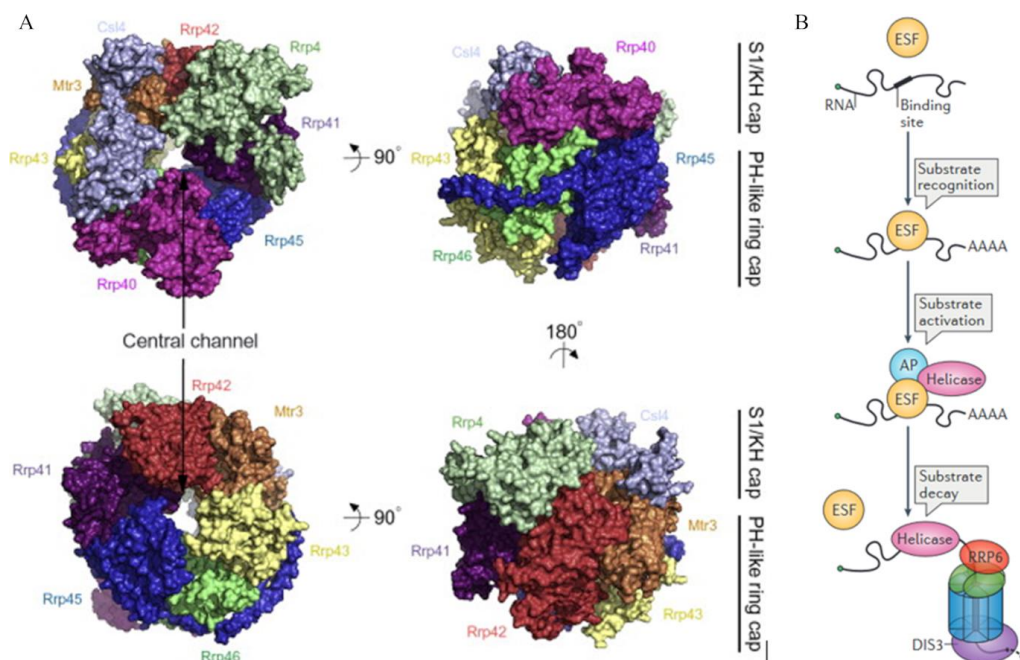
Rysunek 12 Struktura krystalograficzna kompleksu białkowego *S.pombe* Dcp1-Dcp2-PNRC2, Protein Data Bank (PDB) ID: 5KQ4. Rysunek zaczerpnięty z pracy Mugridge et al.¹³⁴

5'-monofosforylowane RNA, powstałe na skutek aktywności DEs, są substratami dla egzorybonukleaz. Xrn1 jest procesywną 5'-egzorybonukleazą o masie 175 kDa i charakteryzuje się wysoce konserwowaną ewolucyjnie strukturą, od drożdży aż po ssaki.^{135,136} Aktywność tego enzymu jest uwarunkowana obecnością jonów dwuwartościowych i ukierunkowana na substrat zawierający monofosforan na końcu 5' co najmniej 4-nukleotydowego jednoniciowego fragmentu RNA (Rysunek 13). Produktem takiej degradacji są 5'-monofosforany nukleozydów.¹³⁷ Działanie Xrn1 ogranicza się do cytoplazmy, a dokładniej do ciała-P, gdzie kolokalizuje wraz z kompleksem dekapującym Dcp1/2 oraz aktywatorami dekapingu LSM1-7/Pat1.¹³⁸ Wysoka specyficzność Xrn1 wobec 5'-monofosforylowanych substratów oraz zdolność do procesywnej degradacji zapewniają, że enzym celuje jedynie w mRNA, które zostało skierowane na drogę degradacji oraz warunkują kompletną hydrolizę, bez uwalniania tylko częściowo zdegradowanych transkryptów.¹³⁵ W komórkach eukariotycznych występuje paralog enzymu Xrn1, który jest zlokalizowany w jądrze – Xrn2 (u drożdży znany jako Rat1).¹³⁹ Jest on odpowiedzialny za degradację nieprawidłowych prekursorów mRNA, jak również dojrzewanie rRNA, terminację transkrypcji oraz kontrolę jakości kapowania mRNA.¹³⁵ W komórkach roślinnych rolę 5'-egzorybonukleazy przejął ortolog Xrn2, zwany Xrn4, który zlokalizowany jest w cytoplazmie i funkcjonuje analogicznie do Xrn1.¹⁴⁰



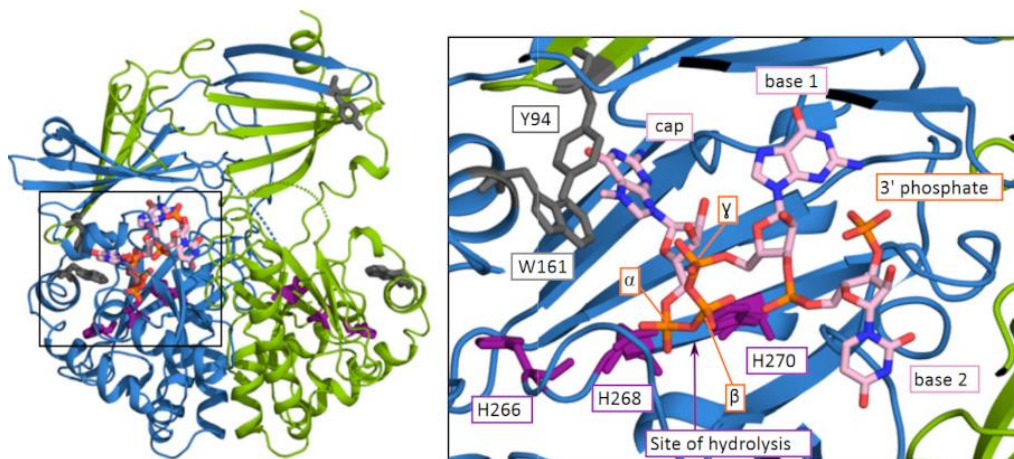
Rysunek 13 Struktura krystalograficzna *Drosophila melanogaster* Xrn1 w kompleksie z trinukleotydowym ligandem, Protein Data Bank (PDB) ID: 2Y35. Rysunek zaczerpnięty z pracy Jinek et al.¹³⁵

W degradację prowadzoną na ścieżce w kierunku 3'→5' zaangażowany jest egzosom. Jest to kompleks enzymatyczny składający się z niekatalitycznego rdzenia utworzonego z 6 podjednostek wykazujących podobieństwo do RNazy PH (Mtr3, Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45 i Rrp46) oraz 3 podjednostek wykazujących podobieństwo do białek posiadających domeny wiążące S1/KH RNA (Rrp4, Rrp40 i Csl4) (Rysunek 14A).¹⁴¹ Za działanie katalityczne odpowiadają dwie dodatkowe nukleazy – Rrp6 (RNaza D) oraz Rrp44 (znana też jako Dis3; RNaza II). Wiążąc się z rdzeniem egzosomu umożliwiają rozpoznanie a następnie wiązanie substratów. Schematyczny model procesu, w wyniku którego następuje degradacja RNA przez egzosom przedstawia Rysunek 14B. Na początkowym etapie procesu czynnik specyficzności egzosomu (ang. *exosome specificity factor*, ESF) rozpoznaje miejsce wiązania zlokalizowane na RNA, które może zależeć od struktury I i II rzędowej RNA a także od obecnych w sekwencji modyfikacji. Następnie bezpośrednio lub przy udziale białek pomocniczych (ang. *accessory proteins*, APs) rekrutowany jest kompleks aktywujący egzosom, który zawiera helikazę RNA. Rozwinięcie struktury RNA ułatwia egzosomowi dostęp do końca 3' transkryptu i umożliwia tym samym degradację w kierunku 3'→5'.^{142,143} W komórkach eukariotycznych egzosom pełni istotną rolę w kontroli jakości mRNA. Cytoplazmatyczna degradacja mRNA zależna od egzosomu jest ściśle powiązana z procesem translacji i obejmuje usuwanie cząsteczek, w sekwencji których zlokalizowane zostały błędy w postaci przedwczesnego kodonu STOP (ang. *nonsense-mediated Decay*, NMD) lub jego braku (ang. *non-stop Decay*, NSD). W przypadku zatrzymania translacji, egzosom odpowiada również za uwolnienie maszyneryi translacyjnej związanej w trwały kompleks z uszkodzonym mRNA (ang. *no-go decay*, NGD). Degradacja z udziałem egzosomu zachodzi również w jądrze komórkowym i jest ściśle zależna od transkrypcji. Badania wskazują, że podatność transkryptów na jądrowy wariant degradacji jest warunkowany ko-transkrypcyjnie. Nie wiadomo jednak, jak szybko od rozpoznania błędu w nowo formowanej nici, kompleks egzosomu jest w stanie rozpocząć degradację i czy jej przebieg ogranicza się tylko do wąskiego okna czasowego, na które przypada transkrypcja.^{142,143}



Rysunek 14 Struktura ludzkiego 9-członowego rdzenia egzosomu. (A) Widok poszczególnych podjednostek kompleksu: od góry (lewy górny rysunek), od dołu (lewy dolny rysunek) oraz dwie reprezentacje z boku (prawy górny i dolny rysunek). PDB ID: 2NN6. Rysunek zaczerpnięty z pracy Wasmuth *et al.*¹⁴¹ Numer licencji: 5800160464773. (B) Schematyczny model etapów prowadzących do degradacji substratu egzosomu. Rysunek zaczerpnięty z pracy Kilchert *et al.*¹⁴³

Produktem degradacji zależnej od egzosomu są krótkie, kapowane fragmenty RNA, za których usuwanie odpowiedzialny jest enzym DcpS (ang. *Decapping Scavenger*). Jest to dimer należący do rodziny Triad Histydynowych (ang. *Histidine Triad*, HIT), zdolny do specyficznej hydrolizy m⁷G-kapowanych transkryptów o długości nie większej niż 10 nukleotydów (Rysunek 15).¹⁴⁴ Produktem hydrolizy wiązania pirofosforanowego w pozycji zlokalizowanej między β i γ fosforanem, jest m⁷GMP i fragment RNA zakończony 5'-difosforanem.¹⁴⁵ Wysoka specyficzność enzymu zapewnia ochronę przed nagromadzeniem się w komórce krótkich kapowanych fragmentów mRNA, które mogą być toksyczne.¹⁴⁶



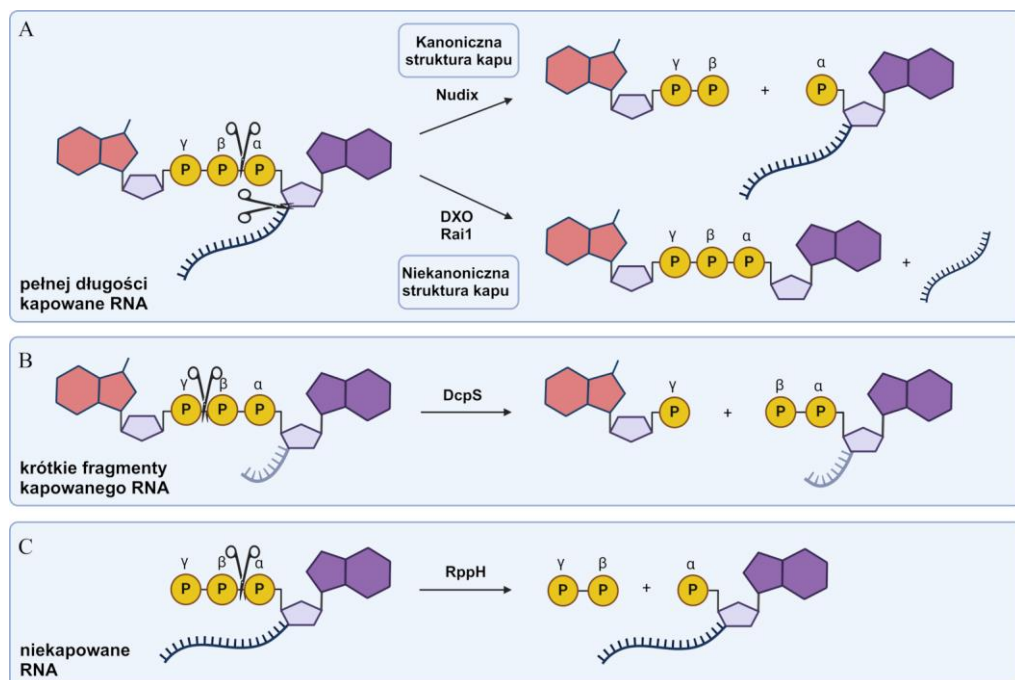
Rysunek 15 Struktura krystalograficzna enzymu DcpS w kompleksie z ligandem – $m^7GpppGpU$, PDB ID: 6TRQ. Rysunek zaczerpnięty z pracy Fuchs *et al.*¹⁴⁷

3.1 Przegląd wybranych enzymów dekapujących

Hydroliza czapeczki 5' katalizowana jest przez wiążące RNA, hydrolityczne białka zwane enzymami dekapującymi. Najlepiej scharakteryzowaną rodziną tych białek są hydrolazy Nudix (ang. *Nucleoside Diphosphate linked to another moiety X*), których najbardziej znanym i pierwszym opisanym członkiem jest Dcp2.^{148–150} Każdy z tych enzymów posiada charakterystyczny motyw Nudix, który składa się z sekwencji 23 aminokwasów $GX_5EX_5[UA]XREX_2EEXGU$, gdzie *U* reprezentuje alifatyczną, hydrofobową resztę, a *X* jest dowolnym aminokwasem. Sekwencja ta jest zawarta w strukturalnym motywie *pętla-helisa-pętla*, a reszty kwasu glutaminowego obecne w sekwencji REX_2EE są kluczowe dla wiązania dwuwartościowych kationów niezbędnych do wydajnej hydrolizy.¹⁵¹ W ludzkim genomie znaleziono 22 geny kodujące białka z rodziny Nudix, które wykazują aktywność dekapingu oligonukleotydów, przynajmniej *in vitro*, ale ich specyficzność substratowa nie została w pełni scharakteryzowana.¹⁵² Obecnie uważa się, że hydrolazy Nudix są w stanie przetwarzać tak różne substraty, jak kapowane mRNA¹⁵³, trifosforany (deoksy)nukleotydów¹⁵⁴, kanoniczne i niekanoniczne analogi kapu¹⁵⁵, polifosforany diadenozyny¹⁵⁶, czy prekursor fosfolipidów¹⁵⁷. Niektóre wirusy eukariotyczne kodują własne enzymy dekapujące, takie jak enzymy D9 i D10 wirusa krowianki, które również należą do rodziny Nudix. Hydrolazy Nudix zostały również zidentyfikowane u bakterii: RppH wykazuje aktywność wobec RNA trifosforanowego (Rysunek 16C), a NudC preferencyjnie hydrolizuje RNA z czapeczką NAD i dpCoA.^{158,159}

Inną grupą enzymów o aktywności dekapującej jest rodzina DXO, która wydaje się być zaangażowana w kontrolę jakości mRNA poprzez degradację niekompletnie zmetylowanych, tj. nieprawidłowych, struktur czapeczki, w celu uwolnienia dinukleotydów, np. GpppG z GpppG-RNA (Rysunek 16A).¹⁶⁰ Wykazano, że enzymy te posiadają wiele aktywności, w tym dekaping w ramach ścieżki degradacji w kierunku 5'→3', aktywność egzorybonukleolityczna¹⁶¹ i tak zwana aktywność deNADdingu. Niedawno wykazano, że DXO ssaków (mDXO) i jego drożdżowy homolog Rail usuwają niektóre inne niekanoniczne struktury kapu, takie jak FAD i dpCoA.¹⁶² W każdym z wymienionych przypadków powstałym

produktem jest 5'-monofosforan RNA, który jest narażony na dalszą degradację przez egzonukleazy.



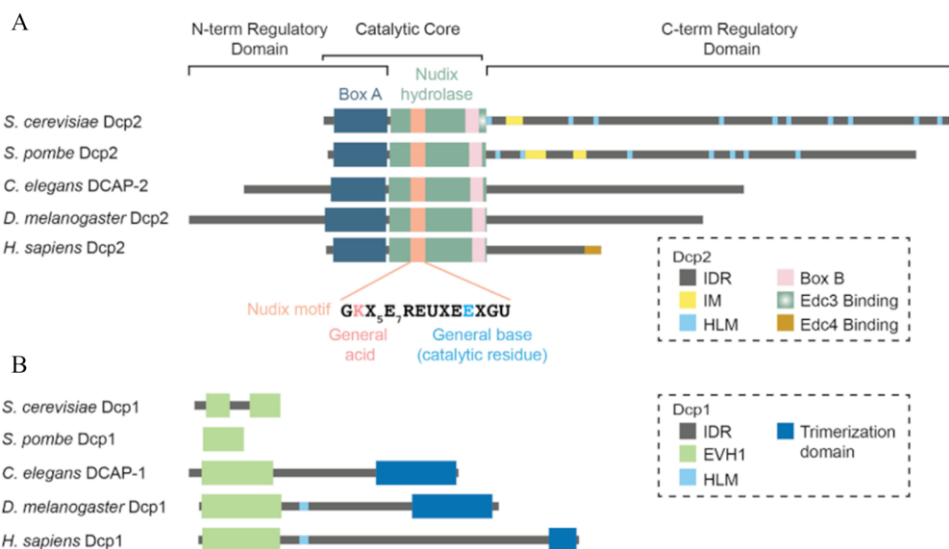
Rysunek 16 Różne miejsca rozszczepienia mRNA przez enzymy dekapujące w zależności od natury substratu: (A) mRNA o pełnej długości zawierający kanoniczną strukturę czapeczki lub niekanoniczną / nieprawidłową (B) krótki (<10 nt) fragment mRNA; (C) mRNA bez czapeczki.

3.1.1 Dcp2

Proces dekapingu, w który zaangażowany jest Dcp2 to krytyczny element wielu komórkowych szlaków rozpadu RNA. Dotyczy to nie tylko degradacji 5'→3' mRNA^{163,164}, ale również usuwania transkryptów na drodze NMD^{165–167}, degradacji promowanej przez miRNA¹⁶⁸, usuwania mRNA zawierających tzw. nieoptymalne kodony¹⁶⁹, degradacji mRNA indukowanej przez sekwencje bogate w AU¹⁷⁰ oraz wyzwalanej przez 3'-poliurydyłację¹⁷¹ czy też degradacji lncRNA¹⁷².

Enzym ten hydrolizuje mostek 5',5'-trifosforanowy w strukturze czapeczki (Rysunek 16A), uwalniając m⁷GDP i 5'-monofosforylowany RNA, który jest następnie trawiony przez 5'-egzorybonukleazy, takie jak Xrn1.¹⁵⁰ Co ciekawe, enzym Dcp2 nie jest wrażliwy na konkurencję ze strony wolnych struktur kapu, będących produktem degradacji RNA od końca 3', co sugeruje, że substratem dla Dcp2 nie jest sama cząsteczka kapu, a do wydajnej hydrolizy konieczna jest dłuższa sekwencja RNA.¹⁷³ W roku 2017 ukazała się praca naukowa autorstwa Mauer *et al.*¹⁷⁴, w której badacze zasugerowali, że modyfikacja m⁶A_m (gdzie A to FTN) promuje stabilność transkryptów poprzez zwiększenie odporności na aktywność enzymu Dcp2. W późniejsze badania¹⁷⁵, sugerują jednak, że status metylacji pozycji N⁶ nie wpływa znacząco na selektywność tego enzymu, przynajmniej *in vitro*. Jest to jeden z licznych przykładów rozbieżności, jakie pojawiają się podczas przeprowadzanej charakterystyki specyficzności

substratowej DE, a które nie wynikają z błędów eksperymentalnych, a z niedostosowania narzędzi i technik badawczych do skomplikowanych układów biologicznych, do jakich niewątpliwie należą białka degradujące RNA. Enzym Dcp2 składa się z rdzenia katalitycznego oraz N- i C-końcowych domen regulatorowych (Rysunek 17A). Rdzeń katalityczny zawiera domenę hydrolazy Nudix oraz Box A, połączone krótkim ale elastycznym fragmentem umożliwiającym przyjmowanie otwartej konformacji, oraz dodatnio naładowany fragment, zdolny do wiązania RNA (tzw. Box B). Reszty kwasu glutaminowego obecne w domenie Nudix koordynują dwuwartościowe jony (Mg^{2+}/Mn^{2+}), które są konieczne do katalizy.¹⁷⁶ N- i C-końcowe domeny regulatorowe charakteryzują nieuporządkowane wewnętrzne regiony, które mogą różnić się długością i składem sekwencji pomiędzy różnymi gatunkami.¹⁷⁷ Dcp2 w kompleksach z licznymi partnerami wiążącymi, które działają jako wzmacniacze dekapingu (np. Dcp1, PNRC2, Edc3 itp.), jest uważany za główny komórkowy enzym dekapujący u eukariontów, zaangażowany w masową degradację mRNA. Główny aktywator Dcp2 – Dcp1 charakteryzuje się obecnością domeny EVH1 oraz mocno zróżnicowanymi pod względem długości regionami wewnątrznie nieuporządkowanymi. Dcp1 u wielokomórkowych organizmów posiada zlokalizowaną na C-końcu domenę zdolną do tworzenia trymerów (Rysunek 17B).

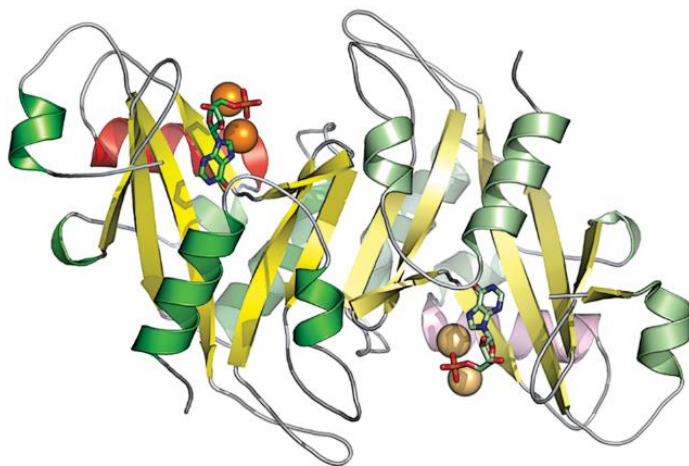


Rysunek 17 Organizacja domen kompleksu dekapującego Dcp1/Dcp2 u różnych organizmów (A) Dcp2 (B) Dcp1. Skróty: IDR: region nieuporządkowany wewnętrznie, ang. Intrinsically Disordered Region; IM: motywy inhibycyjne, ang. Inhibitory Motif; HLM, helikalny motyw bogaty w leucynę, ang. Helical Leucine-rich Motif; EVH1, ang. Enabled/Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Homology 1. Rysunek zaczerpnięty z pracy Vidya et al.¹⁷⁷

3.1.2 hNUDT16

Przedstawicielem rodziny Nudix jest również enzym ludzki hNUDT16, w przypadku którego udowodniono dość szeroki zakres preferencji substratowych. Podobnie jak Dcp2, jest metaloenzymem i wymaga obecności kationów dwuwartościowych do wydajnej hydrolizy (Rysunek 18). Badania wskazują, że w zależności od rodzaju skoordynowanych kationów, jego powinowactwo do substratów znacznie się zmienia.¹⁷⁸ hNUDT16 powszechnie uznawany jest

za jądrową difosfatazę nukleozydową, zlokalizowaną głównie w jąderku i nukleoplazmie, która jest zdolna do dekapingu RNA zakończonego hipermetylowanym analogiem kapu występującym w snoRNA – m₃^{2,2,7}G.¹⁷⁹ Dalsze badania nad tym enzymem wykazały, że w obecności kationów Mg²⁺ oraz Mn²⁺ hNUDT16 hydrolizuje mRNA skierowane na ścieżkę degradacji 5'→3' i zawierające kanoniczny kap m⁷G. W przypadku obu substratów podczas hydrolizy uwalniane są difosforany metylowanych nukleozydów oraz 5'-monofosforylowane fragmenty RNA, będące substratami dla Xrn1 (Rysunek 16A).¹⁸⁰ Badania *in vitro* wykazały, że hNUDT16 jest też w stanie procesować niemetylowane dinukleotydy analogi kapu.¹⁵⁵ Rola hNUDT16 zlokalizowanego w cytoplazmie pokrywa się częściowo z funkcją Dcp2. O ile usuwanie transkryptów na drodze NMD jest preferencyjnie przeprowadzane przez Dcp2, to degradacje promowane przez miRNA oraz indukowane przez sekwencje bogate w AU, mogą być zamiennie realizowane przez obie hydrolazy.¹⁸¹

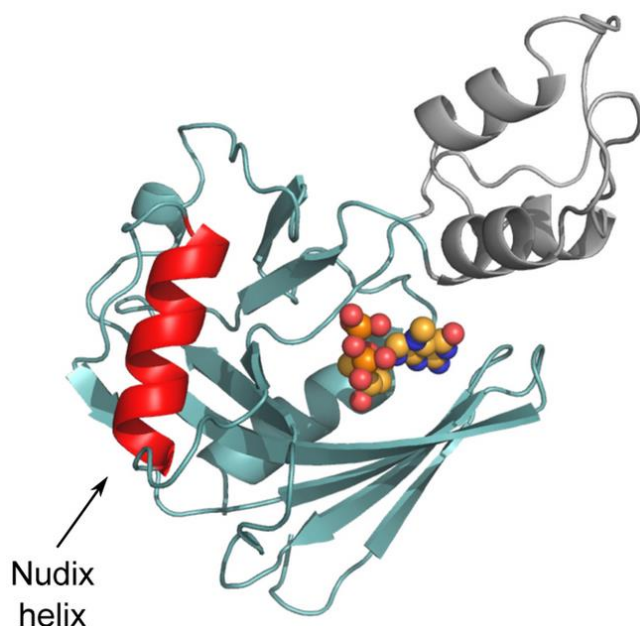


Rysunek 18 Struktura enzymu hNUDT16 z ligandem IMP w obecności jonów Mg²⁺, PDB ID:2XSQ. Rysunek zaczerpnięty z pracy Trésaugues et al.¹⁸¹

3.1.3 VACV D9/VACV D10

Wirus krowianki (ang. *Vaccinia Virus*, VACV), należący do rodziny pokswirusów, posiada własną maszynę odpowiadającą za dekaping mRNA gospodarza i promowanie translacji własnych transkryptów. Koduje on dwa enzymy dekapujące z rodziny Nudix: D9 i D10, które biorą udział w degradacji mRNA na ścieżce 5'→3', doprowadzając do zablokowania syntezy białek komórkowych przy jednoczesnym podtrzymaniu syntezy białek wirusa.¹⁸² Dodatkowo zaobserwowano, że oba enzymy wykazują zdolność do usuwania czapeczek z dwuniciowych wirusowych RNA. Zjawisko to może wydawać się niekorzystne z perspektywy VACV, jednak jest częścią mechanizmu obronnego wirusów. Na skutek replikacji wirusa generowana jest duża ilość kapowanych dsRNA. Usuwanie części z tych transkryptów zapobiega ich nadmiernej akumulacji w komórce i tym samym sprawia, że stają się niewidoczne dla maszyneryi związanej z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną.^{183,184} Ekspresja genów kodujących VACV D9 rozpoczyna się już na wczesnych etapach infekcji, podczas gdy synteza VACV D10 jest inicjowana dopiero po zakończeniu replikacji wirusowego DNA w komórkach gospodarza. Sugeruje to, że każdy z enzymów, pomimo dużego podobieństwa w budowie, może pełnić swoje funkcje na różnych etapach cyklu VACV.

Dodatkowym argumentem jest fakt, że jedynie homologi D10 są kodowane u wszystkich przedstawicieli pokswirusów, podczas gdy homologi D9 są obecne u większości pokswirusów infekujących kręgowce.¹⁸⁵ Enzym VACV D9 do wydajnej hydrolizy kapowanego RNA wymaga nieco dłuższych substratów (powyżej 30 nukleotydów w sekwencji RNA) niż VACV D10.¹⁸⁶ Testy *in vitro* wykazały, że enzymy te nie są aktywne wobec RNA kapowanych niemetylowanymi analogami czapeczki (Gppp), natomiast niekapowane RNA inhibują ich aktywność. Nieco słabszymi inhibitorami VACV D9 okazały się: dinukleotyd $m^7\text{GpppG}$ oraz mononukleotydy – $m^7\text{GTP}$ i $m^7\text{GMP}$ (Rysunek 19).¹⁸⁷

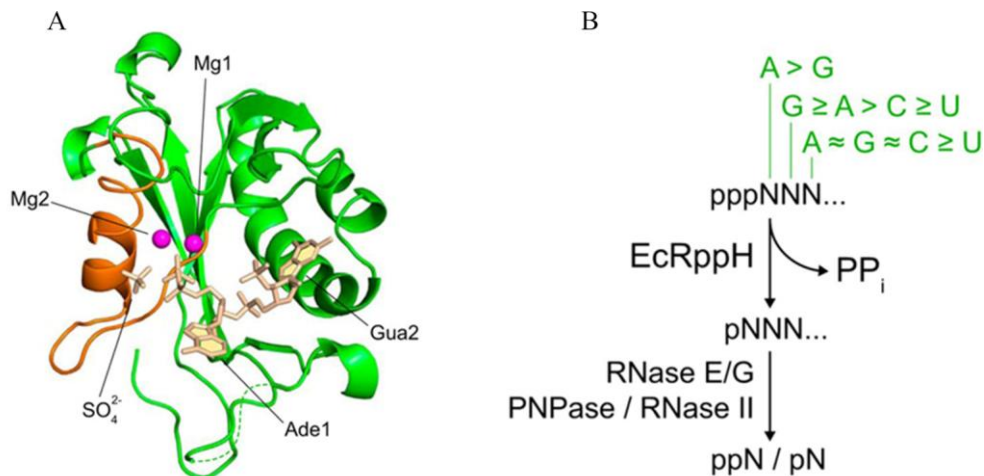


Rysunek 19 Struktura enzymu VACV D9 w kompleksie z $m^7\text{GDP}$, PDB ID:7SEZ. Rysunek zaczerpnięty z pracy Peters *et al.*¹⁸⁸

3.1.4 EcRppH

U *Escherichia Coli* degradacja mRNA zależna od końca 5' opiera się głównie na aktywności pirofosfohydrolazy RNA (RppH) – enzymu należącego do rodziny Nudix (Rysunek 20A). Wyzwała on szlak degradacji poprzez usunięcie pirofosforanu (PPi) z trifosforylowanego 5'-końca RNA, wystawiając tym samym 5'-monofosforylowany RNA na atak endorybonukleaz (Rysunek 20B).¹⁸⁹ Pomimo faktu, że miejsce cięcia tych enzymów (głównie RNAzy E i G) jest zlokalizowane wewnątrz transkryptu, 5'-monofosforanowy substrat, poprzez wiązanie się w dyskretnej kieszeni na powierzchni RNAzy E/G (tzw. regulacja allosteryczna), przyspiesza wewnętrzną hydrolizę RNA przez katalityczne miejsce aktywne tego samego enzymu.¹⁹⁰ Badania wskazują, że aktywność EcRppH stymulowana jest przez DapF, epimerazę zaangażowaną w biosyntezę aminokwasów i ścian komórkowych.¹⁹¹ Do wydajnej hydrolizy konieczna jest obecność jonów dwuwartościowych, podobnie jak ma to miejsce u pozostałych przedstawicieli rodziny Nudix. Wykazano, że obecność kationów Mg^{2+} promuje nukleofilowy atak wody na fosforan w pozycji β .¹⁹² Preferencje substratowe EcRppH nie są jednoznaczne, a autorzy prac naukowych wskazują na wiele czynników, które determinują zdolność enzymu

do rozpoznawania substratów. Według badań przeprowadzonych przez *Foley et al.*, EcRppH wymaga co najmniej dwóch niesparowanych nukleotydów na końcu 5' RNA, przy czym wykazuje wyższe powinowactwo gdy ich liczba wzrasta do 3 i więcej. Foley zaznacza, że umiarkowany wpływ ma również rodzaj nukleotydu w pierwszej (preferencyjnie A) oraz drugiej (A lub G) pozycji w sekwencji.¹⁹³ Badania nad EcRppH w kompleksie z DapF wskazują, że w tej formie enzym znacznie zwiększa swoją reaktywność w miarę wydłużania łańcucha nukleotydowego substratu.¹⁹¹ Co ciekawe, udowodniono też aktywność EcRppH wobec difosforylowanych RNA. Autorzy pracy pod kierownictwem profesora Belasco sugerują, że to właśnie 5'-pp-RNA są głównymi substratami dla RppH, natomiast za początkową hydrolizę trifosforylowanych transkryptów odpowiada inne, niezidentyfikowane jeszcze białko.¹⁹⁴ Niezależnie od zacytowanych tu pozycji, nadal bardzo silnie uwidacznia się problem braku badań, w której w jednoznaczny sposób autorzy przedstawiliby dane porównawcze dla zbioru RNA o różnych długościach i posiadających różne końce 5'. Większość badań jest prowadzona *in vitro* w warunkach, które nie odzwierciedlają naturalnych, a ich zróżnicowanie znacznie utrudnia porównanie wyników prowadzonych w obrębie różnych grup badawczych. Wreszcie, brak odpowiednich narzędzi badawczych i stosownych próbek kontrolnych, powoduje, że generowane są sprzeczne wyniki.



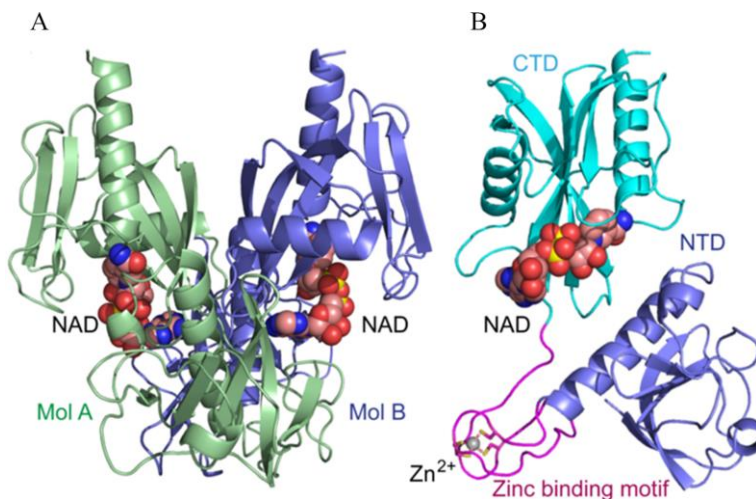
Rysunek 20 *E. coli* RppH (A) Struktura kompleksu EcRppH z ppcpAGU (B) Preferencje substratowe EcRppH podczas degradacji zależnej od końca 5' mRNA. Rysunek przygotowany na podstawie pracy Vasilyev et al.¹⁹²

W badaniach biologicznych powszechnie stosowany jest rekombinowany enzym 5'-polifosfataza RNA (5'-poliPH). Wykazuje on silne powinowactwo do 5'-ppp-RNA i sekwencyjnie usuwa fosforany γ i β z sekwencji transkryptu. 5'-poliPH nie jest aktywna wobec 5'-monofosforylowanych RNA ani RNA zakończonych kanonicznym kapem m⁷G. Wysoka wydajność enzymu jest uwarunkowana obecnością kationów Mg^{2+} .

3.1.5 NudC

Powszechne przekonanie, że organizmy prokariotyczne posiadają RNA zakończone wyłącznie 5'-trifosforanem, zostało podważone w momencie odkrycia koniugatów NAD-RNA u *E. coli* i *S. venezuelae*.^{195–197} Początkowo rola tych transkryptów była sprowadzana

jedynie do udziału w reakcjach redoks, podczas których NAD-RNA miało odpowiednio lokalizować i pozycjonować NAD do reakcji z różnymi substratami.¹⁹⁵ Z czasem, doniesienia o obecności tak kapowanych RNA u bakterii Gram-dodatnich¹⁹⁷ oraz w komórkach eukariotycznych (*Arabidopsis thaliana* i *Saccharomyces cerevisiae*)^{198,199} zainicjowały dyskusję na temat możliwych funkcji niekanonicznych kapów. Badania te pozwoliły na powiązanie aktywności NudC – enzymu z rodziny Nudix, z procesem degradacji puli RNA zawierających NADowe czapeczki (Rysunek 21), definiując go jako bakteryjny enzym dekapujący. Udowodniono, że u prokariotów NudC selektywnie rozpoznaje i hydrolizuje wiązanie pirofosforanowe w strukturze kapu NAD, zlokalizowanego na końcu 5' srRNA, w wyniku czego uwalniany jest mononukleotyd nikotynamidowy (NMN) oraz 5'-pA-RNA. Monofosforylowany transkrypt jest poddawany dalszej degradacji przez RNAzę E. Badania wykazały, że NudC nie jest w stanie hydrolizować 5'-ppp-RNA i tym samym nie stanowi konkurencji dla bakteryjnego enzymu RppH. Biochemiczna analiza mutacji pozwoliła na jednoznaczne określenie motywu Nudix jako centrum katalitycznego NudC, które musi funkcjonować w postaci homodimerycznej, ponieważ kieszeń katalityczna składa się z aminokwasów pochodzących z obu monomerów (Rysunek 21A).²⁰⁰ NudC jest specyficzny wobec jednoniciowych RNA i preferuje obecność jednej z puryn (A/G) w pozycji 5'-końcowego nukleotydu. W badaniach *in vitro* wykazano, że enzym, jako swój substrat, silnie preferuje NAD-RNA nad dinukleotydem NAD(H). Praca tej samej grupy badawczej wskazuje, że NudC wiąże się ze zróżnicowanym zestawem komórkowych RNA w niespecyficzny sposób.²⁰⁰ Praca opublikowana kilka lat później przez Zhou *et al.* uzupełniła zestaw substratów dla EcNudC o RNA kapowane dpCoA, przy czym autorzy zaznaczyli, że preferencyjnie enzym ten hydrolizuje też inne dinukleotydowe analogi kapu, zawierające w strukturze ugrupowanie AMP.¹⁵⁸

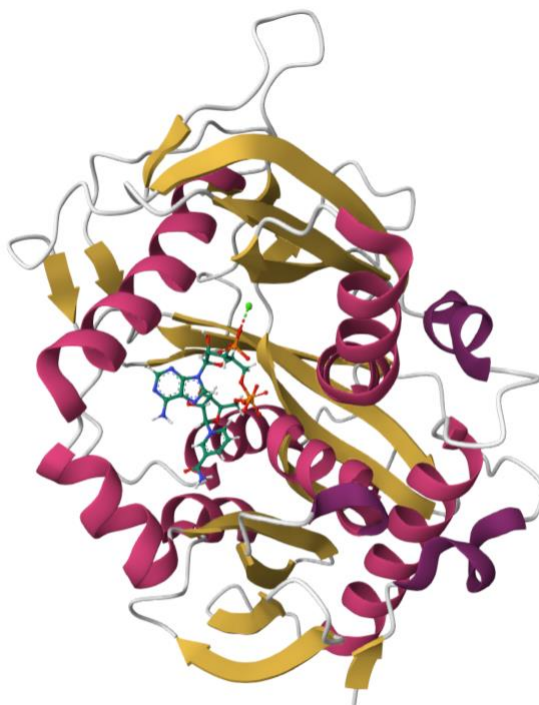


Rysunek 21 Struktura krystaliczna *E. coli* NudC w kompleksie z ligandem NAD (A) Ogólna struktura dimeru NudC – dwa monomery NudC (Mol A i Mol B) są zabarwione na kolor niebieski i zielony. Związane cząsteczki NAD są przedstawione jako sfery (B) Szczegółowa struktura monomeru kompleksu NudC-NAD. N-terminalna domena, motyw wiążący cynk i C-terminalna domena są zabarwione odpowiednio na kolory: niebieski, różowy i turkusowy, PDB ID: 5IW4. Rysunek zaczerpnięty z pracy Höfer *et al.*²⁰⁰

3.1.6 mDXO/Rai1

Zintensyfikowane badania dotyczące kontroli ekspresji genów w organizmach eukariotycznych, doprowadziły do przełomowych wniosków w kontekście mechanizmu i skuteczności kapowania mRNA. Dotychczas zakładano, że proces ograniczania pierwotnych transkryptów na końcu 5' jest niemal bezbłędny i zawsze sprowadza się do enzymatycznej syntezy kanonicznego kapu m⁷G, który chroni pre-mRNA przed przedwczesną degradacją. Nie brano pod uwagę możliwych błędów podczas tworzenia struktur czapeczki, bądź też kapowania niekanonicznymi analogami kapu. W komórkach drożdży zidentyfikowano dwa enzymy mające kluczowe znaczenie dla degradacji niekompletnie zmetylowanych struktur czapeczki: jądrowy Rai1 oraz cytoplazmatyczny Dxo1/Ydr370C. Udowodniono, że oba te enzymy mają szeroki zakres aktywności. Rai1 jest w stanie rozpoznawać niemetylowane struktury kapu, w wyniku czego uwalniane są dinukleotydy i 5'-monofosforylowane RNA, oraz ma aktywność pirofosfohydrolazy wobec 5'-ppp-RNA. Aktywując 5'→3' egzorybonukleazę Rat1, w kompleksie Rai1-Rat1/Xrn2 bierze udział w degradacji egzorybonukleolitycznej.²⁰¹ Dxo1/Ydr370C, oprócz aktywności katalitycznych właściwych dla Rai1, za wyjątkiem powinowactwa do 5'-ppp-RNA, wykazuje też zdolność do dekapingu transkryptów zawierających metylowany kap.^{160,202} W komórkach ssaczych odnotowano obecność enzymu Dom3Z, znanego obecnie jako DXO, który stanowi swoistą hybrydę Rai1 i Dxo1/Ydr370C. Enzym ten funkcjonuje głównie w jądrze komórkowym i posiada bardzo szerokie spektrum działania. Początkowo udowodniono, że rozpoznaje on i usuwa niemetylowane końce 5' pre-mRNA, umożliwiając dalszą degradację transkryptów przez Xrn1, bądź też doprowadzając degradację do końca, dzięki wykazanej aktywności egzorybonukleolitycznej. DXO zdaje się być enzymem szczególnie wrażliwym na obecność szeroko pojętych *nieprawidłowych kapów*. Przy odpowiednich warunkach degraduje 5'-trifosforanowe RNA, bierze udział w usuwaniu hipermetylowanych struktur kapu obecnych w snoRNA, a także jest głównym białkiem kontrolnym i wykonawczym dla RNA skierowanych na ścieżkę degradacji poprzez oflagowanie ich NAD-kapem (Rysunek 22).^{203,204} Ta ostatnia aktywność DXO, ze względu na jej ogromne znaczenie dla mechanizmu kontroli ekspresji genów, doczekała się swojej własnej nazwy i jest nią „deNADding”.²⁰⁵ Dodatkowo, jedne z najnowszych badań wskazują na wysoką podatność transkryptów zakończonych kapem FAD i dpCoA na degradację przez DXO oraz jego homolog Rai1.¹⁶²

Proces eksportu prekursorów mRNA z jądra do cytoplazmy stanowi, oprócz jądrowego DXO, dodatkowy punkt kontrolny dla jakości czapeczek na końcach 5' transkryptów. Taki podwójny mechanizm weryfikacyjny zapobiega przedostawaniu się do cytoplazmy nieprawidłowo kapowanych mRNA i tym samym blokuje biosyntezę białka. Zróżnicowana lokalizacja komórkowa enzymów z rodziny DXO u drożdży podyktowana jest brakiem dobrze rozwiniętych mechanizmów kontrolnych jakości kapowania RNA u tych organizmów. Oprócz aktywnego w jądrze Rai1, braki te kompensowane są przez obecność cytoplazmatycznego odpowiednika, który pełni nadzór poza jądrem.¹⁶⁰



Rysunek 22 Struktura krystaliczna mysiego DXO w kompleksie z 3'-NADP⁺ oraz jednym jonem Ca²⁺, PDB ID: 5ULI. Rysunek przygotowany na podstawie pracy Jiao et al.²⁰⁵

3.2 Znaczenie i perspektywy badań nad enzymami dekapującymi

Wiele enzymów dekapujących jest ważnymi regulatorami ekspresji genów, a deregulacja ich aktywności została powiązana z licznymi chorobami ludzkimi, w tym z rdzeniowym zanikiem mięśni (SMA)²⁰⁶, upośledzeniem umysłowym^{207,208}, chorobą Lafory²⁰⁹, rakiem jelita grubego²¹⁰, czerniakiem²¹¹, czy białaczką limfoblastyczną²¹². Pomimo ważnych funkcji biologicznych enzymów dekapujących, które sprawiają, że niektóre z nich są obiecującymi celami terapeutycznymi, wciąż istnieje wiele pytań bez odpowiedzi na temat tej zróżnicowanej grupy białek. Ostatnie doniesienia na temat potencjalnych biologicznych ról niekanonicznych struktur kapu, jak również różnorodności kanonicznych wariantów, stwarzają potrzebę bezpośredniego porównania aktywności różnych enzymów dekapujących w stosunku do RNA zawierających różne kapy. Taka analiza *back-to-back* przyniosłaby ogromne korzyści w dziedzinie biologii RNA, ale obecnie dostępne narzędzia nie są odpowiednie do takich badań na dużą skalę. Większość opisanych do tej pory w literaturze testów dekapowania opiera się na bardzo pracochłonnych i czasochłonnych metodach, takich jak elektroforeza żelowa i chromatografia cienkowarstwowa, zwykle w połączeniu ze znakowaniem radioizotopowym.

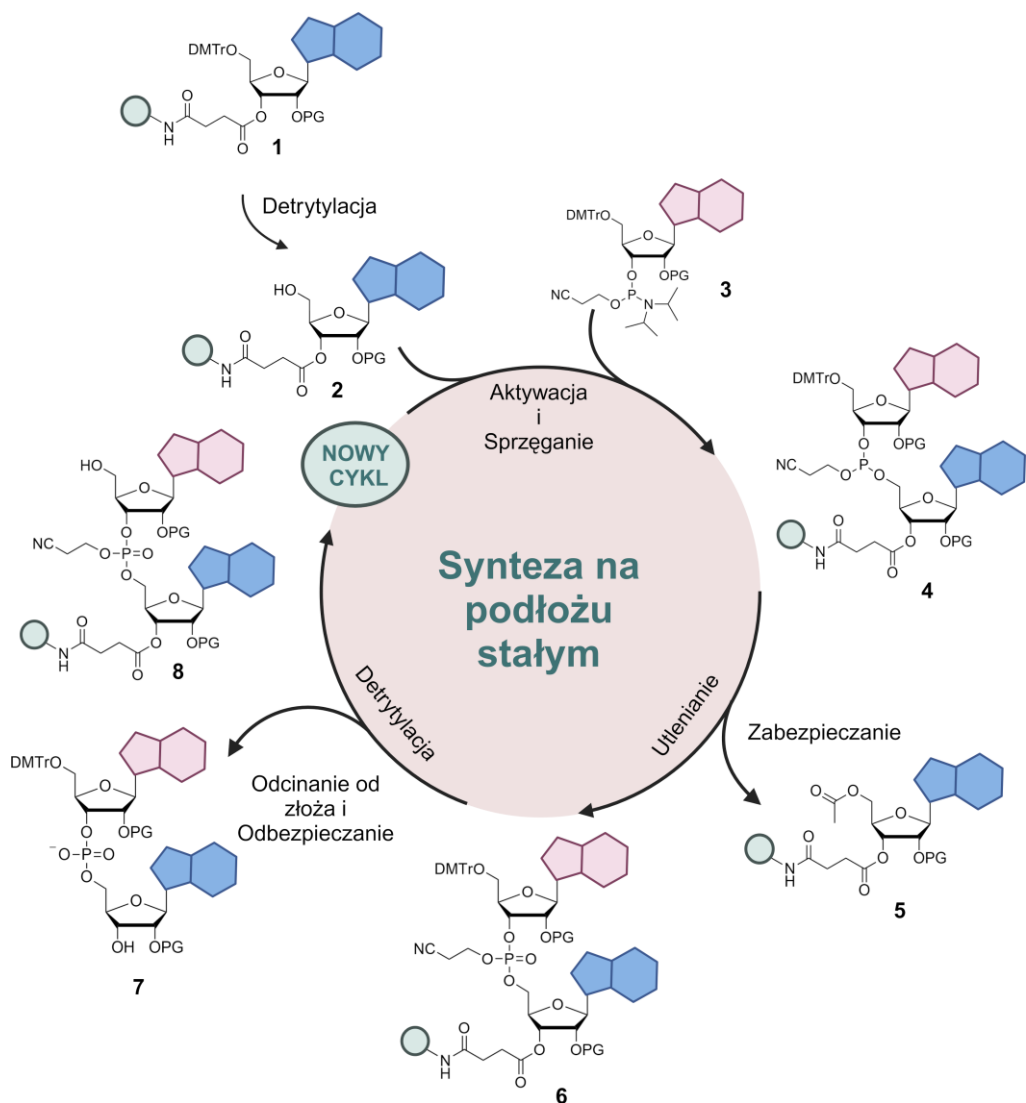
4. Strategie syntezy oligonukleotydów

Opracowywanie nowych technologii opartych na syntetycznym RNA wiąże się z koniecznością zastosowania metod syntezy oligonukleotydów, które gwarantują wysoką jakość uzyskanego produktu i pozwolą na wyprowadzanie modyfikacji w ściśle ustalone pozycje. Ze względu na złożoność struktury RNA, już ten etap badań może stwarzać duże trudności, szczególnie jeśli docelowa cząsteczka ma niestandardową sekwencję. Współczesne strategie syntezy kwasów nukleinowych na niewielką skalę (μg – mg) obejmują głównie syntezę chemiczną oraz enzymatyczną. Pierwsze z wymienionych podejść wykorzystuje najczęściej reakcję przeprowadzaną na podłożu stałym i jest oparte na konsekwentnym dołączaniu kolejnych podjednostek nukleotydowych do nukleotydu osadzonego na złożu. Pozwala to zachować bardzo dużą kontrolę nad sekwencją oligonukleotydową, zapewniając tym samym wysoką jakość produktu końcowego. Podstawą do przeprowadzenia syntezy enzymatycznej jest z kolei aktywność polimeraz i ligaz RNA. Wydłużanie nici RNA w reakcji *in vitro* transkrypcji jest procesem najbardziej zbliżonym do zachodzącej naturalnie w komórce produkcji RNA. Niezaprzeczalną zaletą jest szeroki zakres długości uzyskiwanych sekwencji RNA, umożliwiający syntezę nawet w pełni funkcjonalnego mRNA. Każda z metod ma swoje ograniczenia, a wybór odpowiedniej jest zależny od stopnia złożoności struktury oraz funkcji, jakie ma pełnić cząsteczka. Oba wymienione podejścia wykorzystano podczas badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy i z tego powodu zostały przybliżone nieco bardziej w kolejnych podrozdziałach.

4.1 Otrzymywanie oligonukleotydów metodą syntezy na podłożu stałym

Synteza chemiczna oligonukleotydów DNA została opracowana w latach 80-tych na Uniwersytecie w Kolorado i nadal jest jedną najczęściej stosowanych metod otrzymywania łańcuchów nukleotydowych o ściśle ustalonej sekwencji.²¹³ Opiera się ona na chemii amidofosforynów – ulepszonej i zaadaptowanej do oligo(deoksy)rybonukleotydów metodzie sprzęgania, opracowanej przez Letsingera i współpracowników²¹⁴, polegającej na zastosowaniu stabilnych, odpornych na hydrolizę i utlenianie powietrzem, choć nadal reaktywnych związków pośrednich.²¹³ Duży sukces w zastosowaniu chemii amidofosforynów do syntezy fragmentów DNA, zachęcił badaczy do zastosowania powyższej metody w celu uzyskania zbliżonych pod względem właściwości i budowy krótkich fragmentów RNA. W praktyce, pierwsze podejścia były zupełnie nieskuteczne, jak się później okazało, ze względu na obecność reaktywnej grupy $-OH$ w pozycji 2' rybozy. Prostem i skutecznym rozwiązaniem problemu okazało się zastosowanie grup ochronnych, umieszczonych zarówno na reaktywnej grupie 2'-OH jak i grupach aminowych obecnych w strukturach zasad azotowych.²¹⁵ Obecnie, rutynowo i z dużą wydajnością otrzymywane są zarówno oligonukleotydy DNA, jak i RNA a konieczne do syntezy monomery są powszechnie dostępne handlowo. Najczęściej stosowana jest synteza na podłożu stałym, opracowana już w latach 60-tych przez Bruce'a Merrifielda, za którą w roku 1984 otrzymał on Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Podejście to było szeroko stosowane w syntezie peptydów, oligosacharydów i w końcu oligonukleotydów. Podczas syntezy fragmentów kwasów nukleinowych na podłożu stałym, wykorzystywane są rybonukleozydy związane kowalencyjnie ze stałym, nierozpuszczalnym podłożem w formie polistyrenu lub małych, porowatych fragmentów szkła. Do takiego monomeru, w powtarzającym się cyklicznie kilkusetapowym procesie (Rysunek 23), dodawane są kolejne podjednostki łańcucha, które

finalnie, po odcięciu od złoza, zapewniają uzyskanie zaplanowanej z góry sekwencji.²¹⁶ Rozwój technologii a także optymalizacja chemii amidofosforynów, pozwoliły na zautomatyzowanie tego pracochłonnego procesu. Zastosowanie automatycznych syntetyzerów w syntezie oligonukleotydów do minimum sprowadza ryzyko nieprawidłowo wbudowanych monomerów, a także ze względu na zamknięty obieg (rozwiązanie zapewniane przez producentów niektórych syntetyzerów, np. ÄKTA OligoPilotTM) i ograniczenie dostępu do powietrza atmosferycznego, znacznie zwiększa końcową wydajność, przy minimum zużytych odczynników, co ma szczególne znaczenie dla wieloetapowych reakcji.

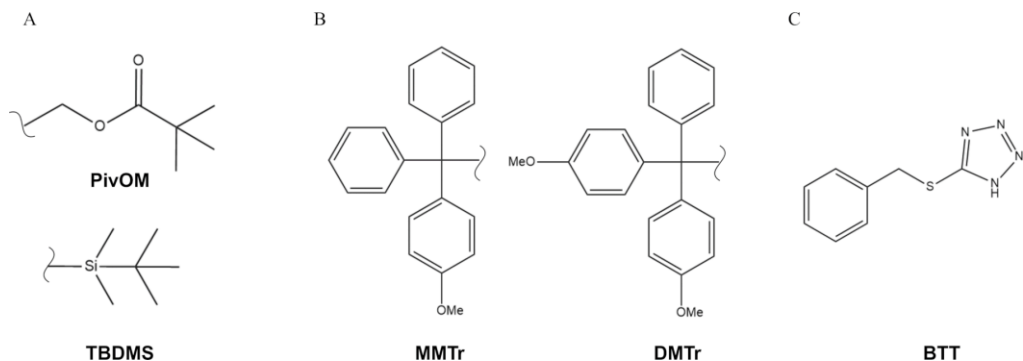


Rysunek 23 Schemat cyklu syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym metodą amidofosforynową. Zasady azotowe zostały przedstawione schematycznie i oznaczone kolorem niebieskim i różowym; złoże (faza stała) zostało reprezentacyjnie przedstawione jako wypełniony kolorem zielonym okrąg; DMTr to grupa dimetoksytrytylowa, zabezpieczająca pozycję 5'-OH; PG reprezentuje grupę zabezpieczającą rybozę w pozycji 2'-OH.

4.1.1 Etapy syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym

Dostępny handlowo substrat (1), osadzony na stałym podłożu, ma wyjściowo zabezpieczone pozycje 2'-OH oraz 5'-OH ortogonalnymi względem siebie grupami zabezpieczającymi. Pierwsza z wymienionych pozycji pozostaje nienaruszona w całym cyklu syntezy, aż do momentu końcowego odbezpieczania. Najczęściej w celu jej zamaskowania stosuje się TBDMS (ang. *tert*-butyldimethylsilyl), TOM (ang. *triisopropylsilyloxymethyl*) lub

PivOM (ang. *Pivaloyloxymethyl*) (Rysunek 24A). Grupa 5'-OH jest powszechnie blokowana przez pochodne trifenylometylowe (trytylowe): MMTr (ang. *Monomethoxytrityl*) lub DMTr (ang. *Dimethoxytrityl*) (Rysunek 24B), co zapobiega polimeryzacji podczas funkcjonalizacji podłoża. W pierwszym etapie cyklu (*Detrytylacji*) zabezpieczenie to jest usuwane w warunkach kwasowych (2), w wyniku czego pozycja 5'-OH jest eksponowana i gotowa do pierwszego sprzęgania z kolejną w sekwencji podjednostką.



Rysunek 24 Grupy zabezpieczające (A) pozycję 2'-OH amidofosforynu (B) pozycję 5'-OH amidofosforynu, powszechnie wykorzystywane w syntezie oligonukleotydów. (C) Struktura chemiczna aktywatora BTT.

Przed przystąpieniem do sprzęgania konieczne jest przeprowadzenie aktywacji grupy amidofosforynowej (3), do czego często stosowany jest BTT (ang. 5-(Benzylthio)-1H-Tetrazole) (Rysunek 24C) lub inne pochodne tetrazolu. Badania mające na celu porównanie skuteczności różnych aktywatorów wykazały, że to właśnie BTT przyczyniał się do uzyskania produktów o najwyższej czystości, przy stosunkowo wysokiej wydajności.²¹⁷ W wyniku reakcji powstaje produkt przejściowy, który posiada bardzo dobrą grupę opuszczającą, uwalnianą podczas nukleofilowego ataku grupy 5'-OH podjednostki oznaczonej numerem (2). Prawdłowo przeprowadzona reakcja sprzęgania prowadzi do wytworzenia wiązania fosfortriestrowego i utworzenia heterodimeru (4).

Synteza na podłożu stałym umożliwia wykorzystywanie nadmiarów substratów i odczynników, koniecznych do przeprowadzania kolejnych przyłączeń, i łatwe usuwanie ich pozostałości. Jest to jeden z elementów strategii przyczyniającej się do uzyskania prawie 100% wydajności w pojedynczym etapie sprzęgania. Warto zwrócić uwagę, że nawet strata 1% wydajności na każdym etapie, w przypadku oligonukleotydów o długości kilkudziesięciu podjednostek, w rezultacie skutkuje niewielką ilością końcowego związku (otrzymanie 110-nukleotydowego RNA z wydajnością na poziomie 5,5% jest wyjątkowo dobrym rezultatem²¹⁷). Kontrolowane wydłużanie łańcucha odbywa się między innymi poprzez blokowanie pozycji 5'-OH nieprzereagowanych substratów (5) tak, aby niemożliwa była dalsza elongacja z ich udziałem. Zapobiega to otrzymaniu w mieszaninie końcowej produktów o nieprawidłowych sekwencjach, które byłyby praktycznie niemożliwe do oddzielenia od pożądanego oligonukleotydu. Handlowo dostępnym odczynnikiem, który jest powszechnie stosowany do estryfikacji i tym samym blokowania grupy 5'-OH jest mieszanina bezwodnika octowego, lutydyny i DMAP (4-(dimetyloamino)pirydyny).

Utlenianie fosfortriestru, który powstaje na etapie sprzęgania, do stabilnej formy fosforanu(V) (6), jest ostatnim elementem pojedynczego cyklu syntezy. Zazwyczaj osiąga się to poprzez zastosowanie roztworu jodu w mieszaninie pirydyny z wodą.

W celu dalszego dobudowywania monomerów do rosnącego łańcucha, tuż po etapie utleniania należy ponownie przystąpić do detrytylacji (8) i powtórzyć opisany cykl. Zakończenie przyłączania kolejnych podjednostek i izolacja produktu (7) wymagają odbezpieczenia pozycji 5'-OH i następnie odcięcia od złoza w warunkach zasadowych. Jednocześnie na tym etapie usuwane są zabezpieczenia zasad azotowych oraz grupy cyjanoetylowe. Grupy silylowe (TBDMS) z pozycji 2'-OH są usuwane za pomocą komercyjnie dostępnego odczynnika $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ lub TBAF.

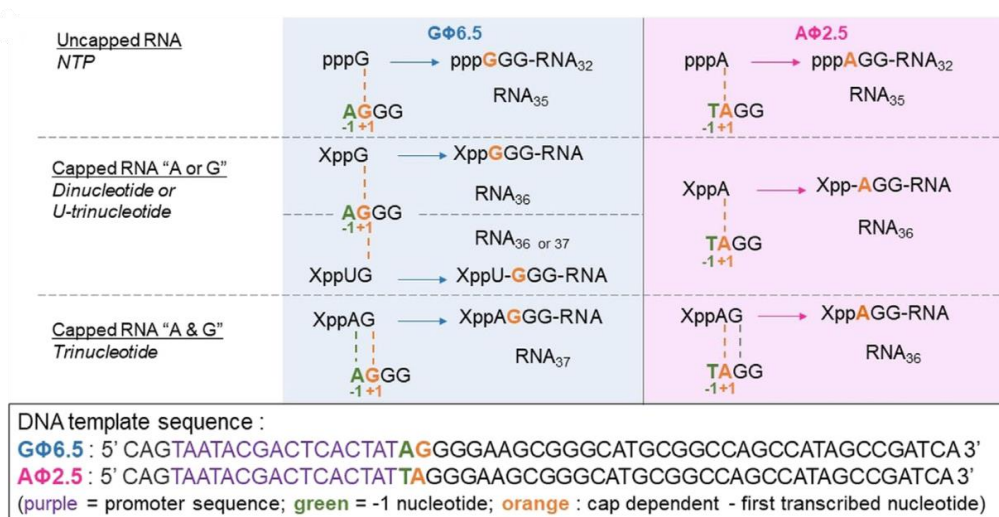
4.2 Transkrypcja *in vitro*

Opisana w poprzednim rozdziale synteza na podłożu stałym ogranicza się do otrzymywania dość krótkich fragmentów kwasów nukleinowych. W wydajny sposób można dzięki niej otrzymać oligonukleotydy (także modyfikowane) do długości wynoszącej około 60 podjednostek w łańcuchu, a próbka końcowa charakteryzuje się bardzo wysoką czystością. W przypadku dłuższych sekwencji, w szczególności pełnowymiarowych mRNA, na ten moment jedyną skuteczną metodą syntezy jest wykorzystanie enzymatycznej reakcji transkrypcji *in vitro* (ang. *in vitro transcription*, IVT), przy udziale enzymu polimerazy RNA zależnej od DNA. Skala reakcji IVT jest nieporównywalnie mniejsza od standardowej reakcji na podłożu stałym, a końcowa próbka może zawierać transkrypty o nieco dłuższych lub krótszych łańcuchach niż oczekiwane, zależnie od jakości matrycy DNA oraz wydajności enzymu. Sporym wyzwaniem okazuje się jednak skuteczne i wydajne oczyszczanie takich RNA.

4.2.1 Matryce DNA w reakcji transkrypcji *in vitro*

Obecnie dostępne narzędzia pozwalają na bardzo precyzyjne zaplanowanie sekwencji matrycy DNA, na podstawie której komplementarnie dobudowywana będzie nić RNA. W przypadku, gdy celem jest synteza łańcucha o długości nieprzekraczającej 100 monomerów, najczęściej stosowaną matrycą jest chemicznie syntezowany oligonukleotyd DNA, zawierający dwuniciowy fragment promotora. Takie matryce charakteryzują się wysoką czystością (często dwukrotnie doczyszczane przez producenta za pomocą HPLC), co znacząco wpływa na wydajność reakcji IVT i decyduje o homogenności końcowej próbki RNA. Dłuższe transkrypty, w szczególności pełnowymiarowe mRNA, powszechnie otrzymuje się z wykorzystaniem matryc uzyskanych w wyniku enzymatycznego cięcia wektorów plazmidowych. Koliste cząsteczki DNA poddaje się linearyzacji odpowiednio dobranym enzymem restrykcyjnym, a miejsce cięcia warunkuje sekwencję potencjalnego produktu. Reakcje IVT z matrycą plazmidową mogą być przeprowadzane w stosunkowo dużej skali, jednak nie generują zupełnie homogennego produktu, na co w dużej mierze wpływa sposób przygotowania matryc. Niejednorodna pod względem długości łańcuchów próbka stanowi mieszaninę, którą należy poddać dalszemu oczyszczaniu i kontroli jakości. Alternatywą dla takiego podejścia są matryce uzyskane przy pomocy reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR). Otrzymane na ich podstawie mRNA charakteryzuje się wyższą czystością, jednak na ich niekorzyść przemawia niewielka skala reakcji. Należy pamiętać, że niezależnie od pochodzenia

matrycy DNA, rodzaj zastosowanej sekwencji promotora, znajdującej się tuż przed pożądaną sekwencją, powoduje nieco odmienny przebieg inicjacji transkrypcji. Promotor, jako sekwencja DNA umiejscowiona bezpośrednio przed transkrybowanym regionem kodującym, pełni kluczową rolę w rekrutacji polimerazy RNA zależnej od DNA, determinując tym samym efektywność i precyzję inicjacji syntezy RNA. Ostatni nukleotyd w sekwencji promotora odpowiada pierwszemu transkrybowanemu (oznaczany jako +1), co bezpośrednio ogranicza wybór potencjalnych sekwencji nukleotydów inicjujących reakcję. Zagadnienie to zostało to bardzo klarownie i obrazowo przedstawione w pracy *Depaix et al.*²¹⁸ Udowodniono, że w zależności od użytego nukleotydu inicjującego, zmiana jednego nukleotydu w sekwencji promotora skutkować będzie inną długością i początkową sekwencją otrzymanego transkryptu (Rysunek 25).



Rysunek 25 Przewidywany przebieg inicjacji transkrypcji dla promotorów ϕ 2.5 oraz ϕ 6.5 i polimerazy T7 RNA w kontekście różnych nukleotydów inicjujących. Rysunek zapożyczony z pracy *Depaix et al.*²¹⁸

4.2.2 Polimeraza RNA

Niezbędnym elementem każdej reakcji IVT jest enzym odpowiedzialny za rozpoznawanie poszczególnych substratów i konsekwentne wydłużanie łańcucha RNA na podstawie sekwencji nukleotydowej matrycy. Wspomniana we wcześniejszych podrozdziałach polimeraza T7 RNA, zależna od DNA, jest jednym z wielu możliwych do zastosowania enzymów pochodzenia bakteriofagowego. Innymi, nadal powszechnie wykorzystywanymi w IVT przedstawicielami tych enzymów są polimerazy T3 i SP6. Każda z nich osiąga rozmiar około 100 kDa i funkcjonuje bez udziału białek pomocniczych.^{219,220} Optymalizacje warunków reakcji przeprowadzanych z udziałem polimerazy RNA, umożliwiły otrzymywanie (m)RNA z powtarzalnie wysoką wydajnością, niezależnie od długości łańcuchów (mogą wahać się między 30 a 10000 nukleotydów w sekwencji).²²⁰ Obecnie z powodzeniem wykorzystuje się mutanty polimerazy w celu uzyskania enzymów zdolnych do generowania homogennych transkryptów, bez dodatkowych produktów ubocznych w postaci dwuniciowych RNA. Dodatkowym aspektem może być zwiększenie podatności zmutowanej polimerazy do

akceptowania niekanonicznych substratów, w postaci syntetycznych analogów NTPów (ang. *nucleoside triphosphate*).

4.2.3 Synteza zmodyfikowanych RNA za pomocą reakcji transkrypcji *in vitro*

Wprowadzanie modyfikacji do łańcucha RNA można przeprowadzać zarówno kotranskrypcyjnie, jak i posttranskrypcyjnie, przy czym najczęściej obejmuje to dwie kluczowe lokalizacje: koniec 5' i koniec 3' transkryptu.

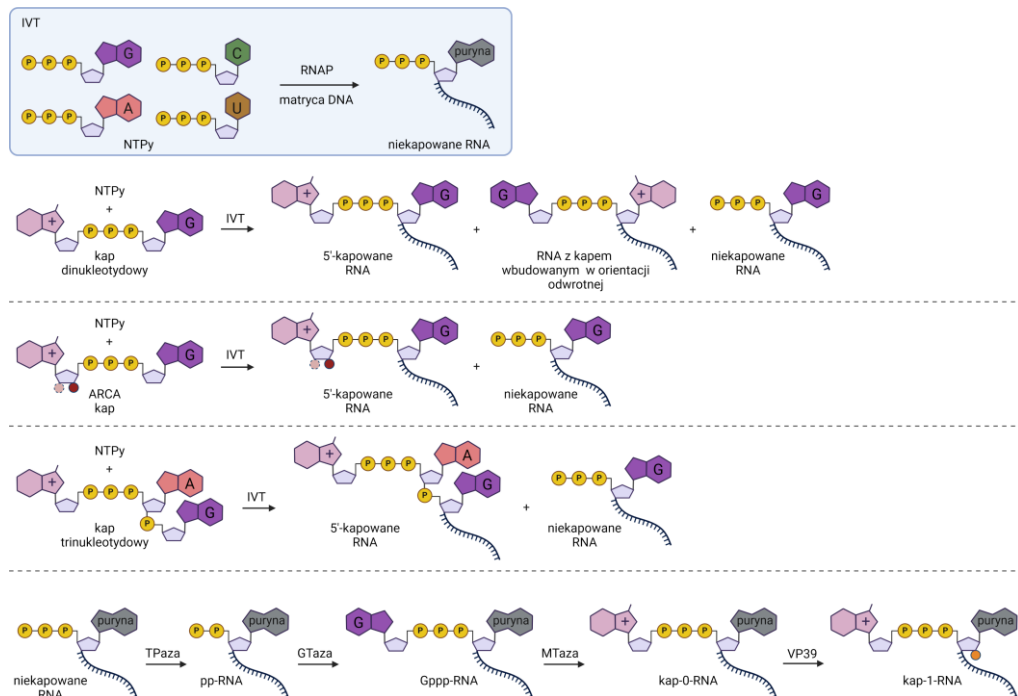
Odpowiedni dobór substratów do reakcji transkrypcji pozwala na manipulowanie strukturą nowo powstającego RNA, zarówno w kontekście zmian wprowadzanych na końcach transkryptu, jak i wewnątrz łańcucha (Rysunek 26). Kotranskrypcyjne wprowadzanie analogów struktury kapu do łańcucha RNA jest strategią alternatywną dla podejścia enzymatycznego i upraszcza proces do jednoetapowej reakcji z użyciem odpowiednich inicjatorów transkrypcyjnych. Wraz z rozwojem technologii chemicznej zaczęto opracowywać różne warianty struktury kapu (inicjatorów IVT), które umożliwiłyby zwiększenie wydajności reakcji i uzyskanie homogennych transkryptów o określonych właściwościach, takich jak wyższa stabilność czy potencjał transkrypcyjny. Pierwsze próby zastosowania dinukleotydowych analogów kapu (np. m^7GpppG) jako starterów dla polimerazy RNA były bardzo obiecujące. Zastosowanie matryc DNA zawierających kompatybilny z polimerazą promotor zapewniało wysoki poziom wbudowania analogu kapu do łańcucha, niemniej jednak, znaczna część uzyskanych transkryptów posiadała dinukleotyd wbudowany w odwrotnej orientacji, co finalnie prowadziło do obniżonej efektywności syntezy funkcjonalnych RNA. Rozwiązaniem tego problemu okazało się zablokowanie kluczowej pozycji 3'-O rybozy w m^7G , w wyniku czego otrzymano $m_2^{7,3'}GpppG$ (ang. *anti-reverse cap analog*, ARCA).²²¹ Kotranskrypcyjne kapowanie RNA, chociaż bardziej złożone ze względu na konieczność przeprowadzenia syntezy analogu kapu, pozwoliło na uzyskiwanie transkryptów o nietypowych strukturach, co otworzyło nowe możliwości w badaniach molekularnych.^{222–224} Jeszcze lepsze rezultaty, prowadzące do wysokich wydajności IVT i równie wysokiego poziomu kapowania RNA uzyskano, stosując trinukleotydowe warianty kapu. To nowatorskie podejście polegające na wykorzystaniu czapeczki $m^7GpppA_{mp}G$ (CleanCap[®]) do inicjacji IVT zostało z powodzeniem zastosowane na dużą skalę w syntezie szczepionek mRNA przeciw COVID-19, produkowanych przez firmę Pfizer.²²⁵ Sam CleanCap[®] jest obecnie związkiem komercyjnie dostępnym (TriLink Biotechnologies), i jak podaje producent, pozwala na uzyskanie 99% wydajności kapowania RNA. Wykorzystując podejście kotranskrypcyjne, możliwe jest również dostosowanie długości ogona poliA. Mimo że precyzyjne zaprojektowanie sekwencji matrycy DNA, uwzględniającej docelową długość poliA, jest możliwe, to niestety nie zapewnia homogenności uzyskanego produktu RNA, co w niektórych badaniach może znacznie ograniczać skuteczność tej metody. Z powodzeniem jednak można wprowadzać zmiany obejmujące łańcuch polinukleotydowy RNA. Zastosowanie w IVT odpowiednio zmodyfikowanych analogów kanonicznych NTPów (np. 5'-trifosforanu *N1*-metylo pseudourydyny zamiast 5'-trifosforanu urydyny) prowadzi do jednorodnych zmian w całej sekwencji transkryptu, podczas gdy modyfikacje w losowych pozycjach można otrzymać stosując mieszaninę obu składników.^{226,227} Modyfikacja ta jest szeroko stosowana w celu zmniejszenia immunogenności tak otrzymanego mRNA, co jednocześnie prowadzi do zwiększenia jego potencjału translacyjnego.²²⁸

Większość drobnych zmian, stanowiących modyfikacje w obrębie zasady azotowej lub rybozy jest z powodzeniem akceptowana przez polimerazę typu dzikiego. Często wydajność

takich reakcji IVT jest tylko nieznacznie niższa niż w przypadku naturalnych substratów, a produkt końcowy wykazuje wyższą czystość. W przypadku analogów NTPów, które w znacznym stopniu odbiegają swoim charakterem chemicznym od naturalnych substratów, konieczne jest zastosowanie mutantów polimerazy RNA, ukierunkowanych na konkretny substrat.²²⁹

Podejście posttranskrypcyjnego modyfikowania RNA uzyskanego w wyniku IVT było równie intensywnie rozwijane, co wspomniane wyżej strategie kotranskrypcyjne. Prace nad metodami wprowadzania struktury kapu do łańcucha RNA uzyskanego w wyniku reakcji IVT sięgają lat 80-tych XX wieku. Pierwsze metody opierały się na zastosowaniu enzymów naturalnie występujących w komórkach, takich jak GTazy, które katalizowały dodanie struktury m⁷G do RNA oraz MTazy, które umożliwiały dodanie grupy metylowej do kolejnych nukleotydów w sekwencji.²³⁰ Enzymy te były izolowane z różnych organizmów, a następnie wykorzystywane do kapowania RNA *in vitro*. Kolejnym krokiem w rozwoju była izolacja kompleksu enzymatycznego z wirusa krowianki (*Vaccinia Virus*, VACV), który posiadał zarówno aktywność GTazy i MTazy.^{231,232} Podejście to znacznie poprawiło wydajność kapowania RNA i usprawniło przebieg reakcji, co przyczyniło się do jego szerokiego zastosowania, w tym w nowoczesnych technologiach, takich jak współczesne szczepionki mRNA przeciw COVID-19 firmy Moderna.²³³ W 2022 r. firma New England Biolabs opracowała zaawansowany system kapowania oparty na enzymie wyizolowanym z *Faustowirusa*, który charakteryzuje się szerszym zakresem temperaturowym i wyższą aktywnością w porównaniu z kompleksem enzymatycznym wyizolowanym z VACV.²³⁴ Przykłady te dowodzą, że enzymatyczne metody kapowania RNA wciąż cieszą się dużym zainteresowaniem, mimo trudności związanych z przeprowadzaniem wieloetapowych reakcji oraz koniecznością dodatkowego oczyszczania transkryptów. Analogiczne podejście zostało również rozwinięte w kontekście wprowadzania niewielkich ugrupowań atomów zlokalizowanych w obrębie analogu kapu. Modyfikowane pozycje najczęściej jednak odpowiadają miejscom, w których zidentyfikowano naturalnie występujące zmiany. Dobrze opisanym w literaturze przykładem jest zastosowanie MTaz do funkcjonalizacji adenozyiny (stanowiącej FTN) w pozycji N⁶.²³⁵ Podejście posttranskrypcyjne oferuje też szeroki zakres potencjalnych modyfikacji końca 3' RNA, zarówno metodami chemicznymi, jak i enzymatycznymi. Dobrym przykładem jest powszechnie stosowana enzymatyczna reakcja z udziałem ligazy T4 RNA 1, która katalizuje proces tworzenia się wiązania 3'→5' fosfodiesterowego, z jednoczesną hydrolizą ATP do AMP i PPi. Warunkiem koniecznym zajścia reakcji jest obecność wolnej grupy hydroksylowej w pozycji 3' transkryptu (akceptora) oraz występowanie wolnej grupy fosforanowej na końcu 5' oligonukleotydu (donora), zawierającego pożądaną modyfikację. Substratami dla ligazy T4 RNA 1 są jednoniciowe RNA oraz DNA, przy czym zaobserwowano, że wykazuje ona preferencję wobec ostatnich w sekwencji nukleotydów akceptora: A > G ≥ C > U, oraz pierwszych w sekwencji nukleotydów donora: C > U > A > G.²³⁶ Największym wyzwaniem okazuje się synteza chemiczna wspomnianego wcześniej donora. Ligacja przebiega z dużą wydajnością nawet dla stosunkowo długich oligonukleotydów, co jest niezaprzeczalnie jej dużym atutem. Równie skuteczne jest zastosowanie jedynie krótkich dinukleotydów, zawierających odpowiednio sfunkcjonalizowany linker. Stwarza to wiele możliwości do posttranskrypcyjnego wprowadzenia dużych, nienukleotydowych związków do łańcucha RNA. Wspomniany w poprzednim akapicie problem braku homogenności końców 3' RNA uzyskiwanych podczas IVT pojawia się również podczas przeprowadzania posttranskrypcyjnej reakcji enzymatycznej z użyciem polimerazy

poliA. Jest to powszechnie stosowane i zarazem skuteczne podejście do wprowadzania poliadeninowej sekwencji do końca 3' RNA, jednak nie zapewnia pełnej kontroli nad ilością przyłączanych monomerów.²³⁷ Co ciekawe bakteryjna polimeraza poliA, w odróżnieniu od wariantu drożdżowego, akceptuje jako substraty wszystkie cztery NTPy, a nie tylko ATP, co potencjalnie pozwala na uzyskanie różnych wariantów homopolimerów.²³⁸



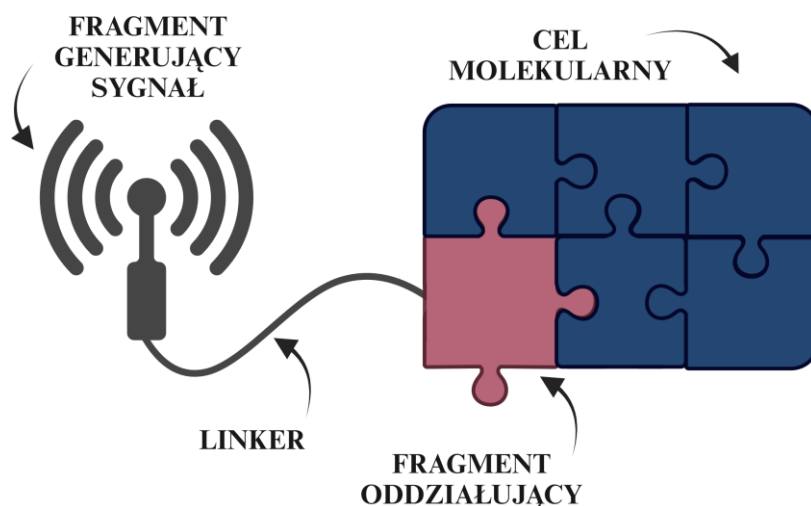
Rysunek 26 Laboratoryjne metody wprowadzania struktury kapu na koniec 5'-(m)RNA. (A) Schemat reakcji transkrypcji in vitro, prowadzącej do otrzymania niekapowanego RNA. (B) Kotranskrypcyjne wprowadzanie czapeczki w postaci dinukleotydu. Produktami takiej reakcji, oprócz właściwego, kapowanego RNA, są RNA posiadające kap nieprawidłowo wbudowany i RNA niekapowane. (C) Kotranskrypcyjne wprowadzanie kapu z zablokowaną pozycją 2'/3'-O 7-metyloguanozyny, tzw. kapu ARCA (ang. anti-reverse cap analog). Modyfikacja ta zapobiega powstawaniu RNA z odwrotnie wbudowaną czapeczką. (D) Kotranskrypcyjne wprowadzanie czapeczki w postaci trinukleotydu. Zapobiega to powstawaniu RNA z odwrotnie wbudowanym kapem oraz znacznie ogranicza powstawanie niekapowanego RNA. (E) Posttranskrypcyjna metoda kapowania RNA z wykorzystaniem białkowego kompleksu kapującego, wyizolowanego z wirusa krowianki, VCE (ang. vaccinia capping enzyme). Rysunek przygotowany na podstawie pracy Warmiński et al.²³⁹

Koncepcja modyfikacji RNA za pomocą metod enzymatycznych może być również efektywnie połączona z podejściem chemicznym. Dzięki wysokiej selektywności enzymów możliwe jest wydajne wprowadzenie bioortogonalnej grupy funkcyjnej, co poprzedza etap znakowania chemicznego. Podejście to opiera się w głównej mierze na kilku uniwersalnych reakcjach chemicznych, które ze względu na łagodne warunki, do minimum ograniczają potencjalną degradację RNA. Powszechnie stosowane są reakcje z zakresu chemii *click*, takie jak cykloaddykcje katalizowane miedzią I (CuAAC) lub promowane naprężeniami (SPAAC) oraz reakcje Dielsa-Aldera (iEDDA), przy czym warto zauważyć, że wybór metod kowalencyjnego znakowania RNA jest znacznie szerszy.^{240–242} Nowatorskim podejściem

okazała się opracowana w 2022 roku metoda chemicznej modyfikacji naturalnego końca 3' mRNA, polegająca na zastosowaniu nadjodanu sodu do utleniającego rozszczepienia ugrupowania 2'/3'-diolowego rybozy z następczym aminowaniem redukcyjnym przy udziale NaBH_3CN (ang. periodate oxidation and reductive amination, PORA). Strategia ta swoje początki miała już w latach 50-tych XX wieku, jednak dopiero 70 lat później zoptymalizowano ją pod kątem wykorzystania do modyfikacji długich, kodujących mRNA.²⁴³ Jej ogromną przewagą nad pozostałymi strategiami jest krótki czas prowadzenia reakcji i ze względu na selektywność, potencjalnie możliwe stosowanie podczas jednoczesnego znakowania obu końców transkryptu w reakcji typu „one pot”.

5. Sondy molekularne

Poznanie charakteru wielu procesów biochemicznych, a także zrozumienie mechanizmów nimi rządzących wiązało się z koniecznością opracowania narzędzi molekularnych ukierunkowanych na konkretny badany obiekt. Jedną ze strategii jest wykorzystanie selektywnych sond molekularnych. Sondą molekularną nazywamy cząsteczkę lub grupę cząsteczek, które wykazują powinowactwo do zadanego celu molekularnego i pozwalają na wizualizację konkretnego procesu.²⁴⁴ Sonda taka składa się z elementu odpowiedzialnego za rozpoznawanie celu i oddziaływanie z nim, oraz fragmentu generującego sygnał analityczny, który można zarejestrować. Oba fragmenty połączone są najczęściej linkerem, którego długość i charakter chemiczny są dostosowane do konkretnego układu badanego (Rysunek 27). Fragment oddziałujący to najczęściej mała cząsteczka lub nieco większa biomolekuła (oligonukleotyd, peptyd, przeciwciężło itp.), projektowana na bazie naturalnych substratów lub ligandów badanego celu molekularnego, odpowiednio zmodyfikowana i sfunkcjonalizowana linkerem. Element odpowiadający za generowanie sygnału warunkuje strategię syntezy takiej sondy oraz późniejszy sposób detekcji i analizy. Dużą popularnością cieszą się sondy opierające się na sygnale optycznym, do których analizy wykorzystywane są techniki spektroskopowe (oscylacyjna: IR i ramanowska, elektronowa: fluorescencji, fosforescencji i absorpcji czy też NMR). Do kolejnej grupy należą sondy, których użyteczność warunkowana jest obecnością w ich strukturze radioizotopów. W zależności od rodzaju emitowanych cząstek elementarnych i promieniowania, swoje zastosowanie znajdują one w technikach tomografii emisyjnej: SPECT – tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów, czy też PET – pozytonowej tomografii emisyjnej. Szeroki zakres dostępnych technik, jakie można wykorzystać, daje możliwość takiego doboru elementów składowych sondy, które będą optymalne dla badanego procesu. W przypadku skomplikowanych układów możliwe jest też zastosowanie technik łączonych.²⁴⁵



Rysunek 27 Schematyczne przedstawienie elementów budowy sondy molekularnej.

Istotnym jest aby wprowadzana sonda nie ingerowała w naturalnie zachodzące reakcje badanego układu a uzyskiwane dane odpowiadały w jak największym stopniu warunkom natywnym. Dodatkowym aspektem limitującym podczas projektowania sondy jest trudność syntezy tak złożonych układów. Stworzenie sondy idealnej jest praktycznie niemożliwe, choćby ze względu na złożoność procesów zachodzących w układach biologicznych, w których sondy mają zastosowanie. Istnieją jednak pewne uniwersalne cechy, których obecność jest wymagana, aby móc rozpatrywać potencjalne zastosowanie diagnostyczne czy terapeutyczne sond molekularnych. Autorzy cytowanej już wcześniej przeze mnie pracy naukowej²⁴⁵ wymienili 7 najważniejszych w ich opinii punktów, które należy wziąć pod uwagę podczas opracowywania sondy do bioobrazowania (kolejność przypadkowa):

- Wysoka specyficzność względem celu molekularnego – istotą wykorzystania sond jest chęć zbadania jednego, konkretnego procesu czy mechanizmu. Podstawą do tego jest wybiórczość sondy i oddziaływanie tylko z zadaniem celem, bez angażowania do tego cząsteczek towarzyszących. W przypadku diagnostyki chorób, sondy, które nie mają dokładnie zdefiniowanego celu mogą być wykorzystane do zobrazowania pewnej ogólnej zmiany, np. w przepływie krwi. Dopiero specyficznie ukierunkowane układy pozwalają na śledzenie konkretnych elementów, np. biomarkerów chorobotwórczych. Specyficzność sondy gwarantuje też miejsce jej dystrybucji i ogranicza ryzyko wychwytu przez komórki innych tkanek niż docelowe.
- Wysokie powinowactwo wiązania do celu molekularnego – niezależnie od tego w jaki sposób osiągane jest oddziaływanie pomiędzy sondą a celem molekularnym, istotna jest wysoka wydajność tego procesu. To, z jakim powinowactwem wiążą się oba elementy, opisuje m.in. stała asocjacji/dysocjacji kompleksu. Odpowiednio dobrane parametry takiego oddziaływania pozwalają na obrazowanie procesu w niedługim czasie po aplikacji sondy, co zwiększa szanse na uzyskanie sygnału o wysokiej jakości.
- Wysoka czułość sondy molekularnej – zastosowanie możliwie niskiego stężenia sondy w celu zobrazowania jakiegoś procesu jest kluczowe, szczególnie w kontekście diagnostycznym. Wczesne wykrywanie zmian chorobowych wiąże się ze stosunkowo

niewielką ilością materiału użytecznego w detekcji. Wysoka czułość sondy zapewnia wykrycie nawet pojedynczych nieprawidłowych elementów.

- Niski poziom tła – dane uzyskane w wyniku analizy sygnałów o wysokim stosunku szumu do sygnału właściwego mogą być trudne lub nawet niemożliwe do prawidłowej interpretacji. Znacznie lepszą jakość obrazowania uzyskamy w wyniku użycia sondy dającej sygnał właściwy o niższej intensywności, przy jednocześnie minimalnym sygnale pochodzącym od szumu, niż sondy zbierającej równie wysokie sygnały pochodzące od celu molekularnego i tła.
- Wysoka stabilność sondy molekularnej – pomiary przeprowadzane w układach biologicznych wiąże się z ryzykiem degradacji sondy jeszcze w trakcie zbierania sygnałów. Utrzymanie sondy w jej nienaruszonym stanie aż do zakończenia obrazowania gwarantuje poprawność zebranych danych.
- Niska toksyczność i immunogenność – aspekt ten ma szczególne znaczenie w przypadku badań prowadzonych na złożonych układach komórkowych i żywych organizmach. Zarówno sama sonda jak i jej metabolity muszą być neutralizowane i usuwane w bezpieczny sposób. Stosowanie bezpiecznych sond zapewnia nienaruszalność układu zarówno podczas zbierania sygnałów jak i po zakończeniu tego procesu.
- Niski koszt produkcji sondy – ten ostatni punkt ma w zasadzie kluczowe znaczenie dla szerokiej dostępności i użyteczności sondy molekularnej. Nawet przy zapewnieniu wszystkich sześciu opisanych powyżej aspektów, to łatwość syntezy i niska cena substratów będą warunkowały to, czy może być rutynowo stosowana w badaniach.

Spełnienie wszystkich tych wymagań powoduje, że zaprojektowanie a następnie synteza i optymalizacja sond molekularnych jest niezwykle trudnym i pracochłonnym przedsięwzięciem. Opisane powyżej wytyczne sprzyjają syntezie idealnych sond molekularnych, niemniej jednak, procedury te są głównie wykorzystywane do tworzenia narzędzi efektywnych w diagnostyce. Na etapie badań podstawowych stanowią one jedynie punkt wyjścia do dalszych optymalizacji. Warto jednak mieć na uwadze, że osiągnięty na tym polu sukces może znacznie przyspieszyć rozwój biotechnologii i pozwolić na zrozumienie mechanizmów, których dokładnego przebiegu się jedynie domyślamy.

5.1 Sondy aptamerowe

W roku 1990 dwie niezależne grupy badawcze ze Stanów Zjednoczonych, wyselekcjonowały techniką przesiewową z dużej biblioteki losowych sekwencji oligonukleotydowych, grupę RNA zdolnych do specyficznego wiązania się z celem molekularnym.^{246,247} Dwa lata później Ellington i Szostak opublikowali pracę, w której opisali izolację jednoniciowych sekwencji DNA, które w analogiczny sposób były zdolne do wiązania ligandów. Z czasem ta charakterystyczna grupa kwasów nukleinowych otrzymała miano aptamerów, a określenie to pochodzi od łacińskiego słowa *aptus*, oznaczającego *pasować* oraz greckiego *méros*, co tłumaczy się jako *część*.²⁴⁸ Sam proces selekcji, określany jako SELEX (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) przyczynił się do wygenerowania *in vitro* tysięcy aptamerów ukierunkowanych na niezwykle różnorodne cele molekularne (aminokwasy, peptydy, białka, wirusy, bakterie, cząsteczki organiczne i nieorganiczne, jony metali, całe komórki a nawet zwierzęta).^{249,250} Aptamery znalazły dość szybko zastosowanie w analityce, bioobrazowaniu, diagnostyce oraz w terapiach, jako sondy

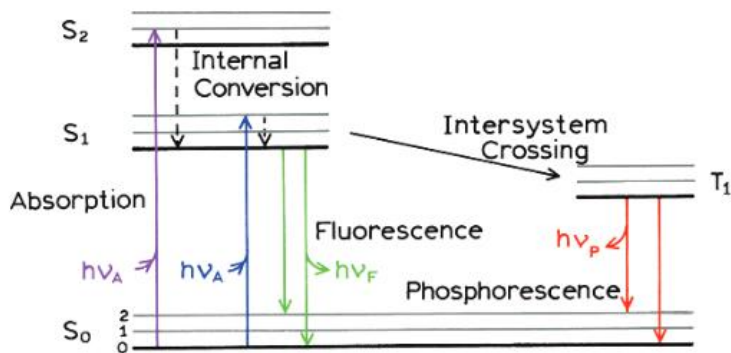
powinowactwa i stały się wygodną alternatywą dla wykorzystywanych powszechnie przeciwciał.²⁵⁰ Aptamery mogą oddziaływać ze swoimi ligandami według wielu różnych mechanizmów. Mogą to być wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe, siły van der Waalsa, oddziaływania pomiędzy pierścieniami aromatycznymi (tzw. π -stacking) czy oddziaływanie na podstawie kompatybilności struktur.²⁵¹ Swoją popularność zawdzięczają wysokiej stabilności chemicznej, małym rozmiarom i stosunkowo niskim kosztom syntezy. Co istotne, charakteryzują się dużą elastycznością i prostotą w projektowaniu ich struktur, co zaowocowało szybkim rozwojem na ich podstawie biosensorów o wysokiej czułości, selektywności i dostępności.²⁴⁹ Badania wykazały, że odpowiednio zaprojektowane sondy aptamerowe są w stanie przekraczać barierę krew-mózg²⁵² i wykazują brak lub bardzo niski poziom immunogenności^{253,254}. Cechy te wykorzystano między innymi do opracowania fluorescencyjnie znakowanych aptamerów β 55, ukierunkowanych na wykrywanie charakterystycznych zmian w mózgu, zachodzących w wyniku rozwoju choroby Alzheimera. β 55 wiąże się zarówno do blaszek starczych, jak i samego β -amyloidu w ludzkiej tkance mózgowej badanej *ex vivo*, jak i u transgenicznym myszy APP/PS1 *in vivo*.²⁵⁵ Takie rezultaty dają nadzieję na opracowanie technik, które pozwolą przeciwdziałać rozwojowi choroby, a nie jedynie analizować stopień uszkodzenia tkanek *post mortem*, jak ma to miejsce obecnie. Biosensory oparte na aptamerowych strukturach są również intensywnie badane w kontekście wykorzystania do wysoce specyficznej diagnostyki nowotworowej. W roku 2014 w pracy Zeng *et al.* została opisana sonda aptamerowa, specyficzna wobec markera nowotworowego chłoniaka – CD30. Krótki, 39-nukleotydowy aptamer sprzężono z barwnikiem IRD800CW z zakresu bliskiej podczerwieni i po ogólnoustrojowym podaniu myszom, obserwowano sygnał fluorescencyjny pochodzący z okolic rozwiniętego guza.²⁵⁶ Na podstawie bardzo dokładnej analizy biodystrybucji oraz pozytywnej ocenie czasu działania, czułości i stabilności sondy, autorzy pracy wydają się być przekonani o jej dużym potencjale do wykorzystania w dalszych badaniach.

5.2 Sondy znakowane fluorescencyjnie

5.2.1 Zjawisko fluorescencji

Pierwsza wzmianka na temat zjawiska fluorescencji datowana jest na drugą połowę XVI wieku, gdy to hiszpański botanik i lekarz, Nicolás Monardes odnotował obserwację emisji niebieskiego światła z naparu z tzw. drewna nerkowego (*Lignum nephriticum*).²⁵⁷ Samo pojęcie *fluorescencji* zostało jednak wprowadzone dopiero w połowie XIX wieku, a jego autorstwo przypisuje się profesorowi matematyki na Uniwersytecie w Cambridge – Stokesowi. Uproszczony mechanizm fluorescencji można zobrazować przy pomocy diagramu Jabłońskiego (Rysunek 28). Proces wzbudzenia elektronowego rozpoczyna się, gdy cząsteczka znajdująca się singletowym stanie S_0 , zaabsorbuje foton o odpowiedniej energii, promując tym samym przejście do wyższego stanu singletowego, tu: S_2 . W kolejnym kroku następuje bardzo szybka relaksacja wibracyjna oraz bezpromienista konwersja wewnętrzna, które prowadzą w rezultacie do pierwszego, singletowego stanu wzbudzonego S_1 . Przejście ze stanu S_1 do S_0 może odbyć się przy jednoczesnej emisji fotonu o energii równej różnicy energii pomiędzy tymi dwoma stanami, co nazywamy fluorescencją, lub w sposób bezpromienisty. Ten ostatni może wystąpić wskutek takich zjawisk jak wibracje lub rotacje wiązań, fotoindukowany transfer elektronów czy zderzenia molekularne.²⁵⁸ Możliwe jest też wystąpienie zabronionego przejścia

międzysystemowego (ang. *intersystem crossing*) do trypletowego stanu wzbudzonego T_1 , a dopiero później relaksacji połączonej z emisją fotonu, nazywanej fosforescencją. Ze względu na zmianę multipletowości stanów elektronowych podczas fosforescencji, zjawisko to jest znacznie wolniejsze (mikrosekundy), niż opisana wyżej fluorescencja, której czas trwania mierzy się w nanosekundach.



Rysunek 28 Diagram Jabłońskiego. Rysunek zaczerpnięty z pracy Lakovicz²⁵⁹

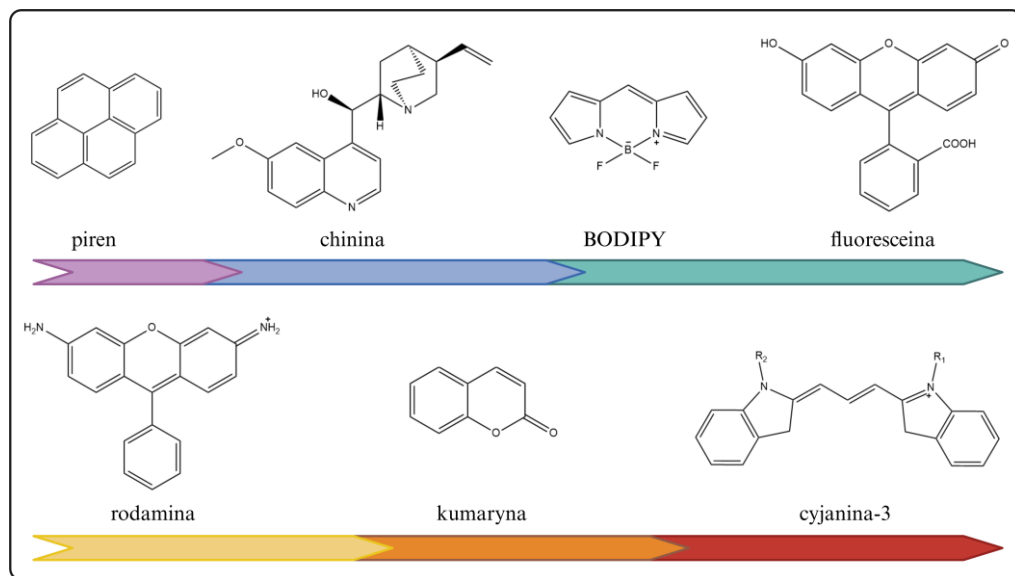
5.2.2 Barwniki fluorescencyjne

Związki, które wykazują właściwości fluorescencyjne nazywane są fluoroforami i ze względu na swoje unikalne cechy, znajdują szerokie zastosowanie w syntezie sond molekularnych. Fluorofory dość powszechnie występują w naturze, choćby pod postacią aminokwasów aromatycznych (tryptofan, fenyloalanina i tyrozyna) czy innych niewielkich związków organicznych posiadających układ wiązań sprzężonych, np. chinina. Inne naturalne fluorofory obejmują takie związki jak kofaktory nikotynamidowe (NADH), flawiny (FMN), porfiryny i pochodne pirydoksalu. Wszystkie wyżej wymienione należą do grupy fluoroforów endogennych. Bardzo często wykorzystywanym w badaniach podzbiorem są wielopierścieniowe związki aromatyczne, do których można zaliczyć pochodne naftalenu, pirenu, antracenu czy perylenu. Oddzielnymi grupami są również kumaryny, barwniki chinolinowe i indolowe, BODIPY (ang. *boron difluoride dipyrromethene*), rodaminy, cyjaniny i pochodne ksantenu, na czele z fluoresceiną (Rysunek 29).²⁵⁸ Intensywny rozwój technik opartych na znakowaniu fluorescencyjnym otworzył ścieżkę do chemicznej syntezy barwników, które charakteryzowałyby się ściśle określonymi właściwościami. Istnieją parametry, za pomocą których można scharakteryzować każdy znacznik fluorescencyjny, oraz ocenić jego potencjalne zastosowanie w sondach molekularnych²⁵⁷:

1. Wydajność kwantowa (ang. *quantum yield*, Φ) – stanowi stosunek liczby wyemitowanych fotonów do liczby fotonów zaabsorbowanych;
2. Czas życia fluorescencji (τ) – pozwala określić czas trwania fluorescencji, inaczej: czas życia molekuly w stanie wzbudzonym;
3. Długość fali odpowiadająca maksimum absorpcji i emisji – wartości charakterystyczne dla każdego barwnika, mogące się nieznacznie różnić w zależności od rodzaju rozpuszczalnika;

4. Przesunięcie Stokesa – różnica (w nm) pomiędzy długością fali odpowiadającą maksimum absorpcji oraz emisji, najczęściej wartości te oscylują w przedziale 50 – 70 nm;
5. Molowy współczynnik ekstynkcji (ϵ) – wartość stała dla danego fluoroforu, związana z pochłanianiem promieniowania przez ośrodek i zależna od długości fali absorpcji, wyraża się w jednostce: $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Związki wykazujące fluorescencję są bardzo zróżnicowaną grupą, choćby ze względu na rozmiar cząsteczek czy ich charakter chemiczny. To jednak stanowi istotną zaletę przy doborze fluoroforu do zaplanowanych eksperymentów, w kontekście specyficznych wymagań układu, w którym ma on być zastosowany.



Rysunek 29 Struktury wybranych, powszechnie stosowanych barwników fluorescencyjnych.

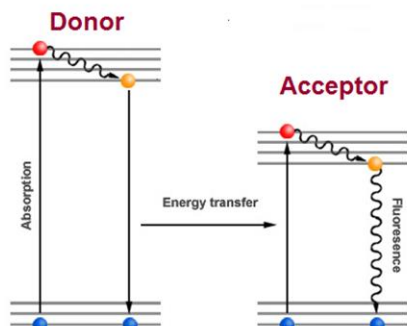
5.2.3 Rezonansowy transfer energii Förstera

Rezonansowy transfer energii Förstera (ang. *Förster resonance energy transfer*, FRET) jest zjawiskiem, w którym chromofor donorowy w stanie wzbudzonym przenosi energię do chromoforu akceptorowego na sposób nieradiacyjny poprzez sprzężenie rezonansowe (Rysunek 30A).²⁶⁰ Wydajność tego procesu jest ściśle powiązana z odległością pomiędzy tymi chromoforami i uwarunkowana nakładaniem się widm emisji fluorescencji donora z widmem wzbudzenia akceptora (Rysunek 30B). Aby doszło do efektywnego sprzężenia, widma muszą nakładać się w co najmniej 30% swojej powierzchni. Jeśli para fluoroforów spełnia powyższe kryteria, wzbudzenie donora prowadzi do emisji fluorescencji akceptora, przy jednoczesnym wygaszaniu fluorescencji donora. Efektywność transferu energii (E) bardzo szybko spada wraz ze zwiększającą się odległością pomiędzy dwoma fluoroforami i jest wyrażana za pomocą wzoru:

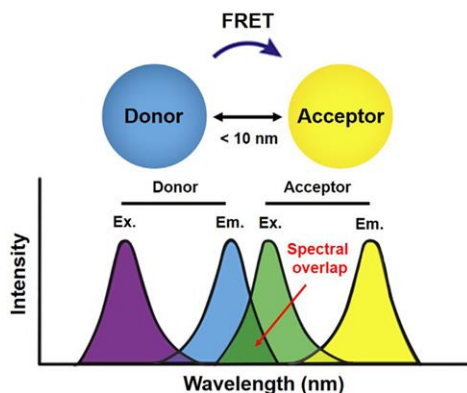
$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

gdzie R_0 to promień Förstera, a r określa rzeczywistą odległość pomiędzy donorem i akceptorem. R_0 definiuje odległość, przy której 50% wzbudzonych donorów efektywnie przekaże energię do akceptorów.

A



B



Rysunek 30 Rezonansowy transfer energii Förstera (A) Schematyczne przedstawienie diagramu Jabłońskiego ilustrujące przebieg FRET (B) Szczególne warunki wstępne konieczne do zajścia FRET: widmo emisji (Em.) donora musi nakładać się widmo wzbudzenia (Ex.) akceptora. Wydajność FRET jest najwyższa, gdy energia przenoszona jest na odległości do 10 nm. Rysunek na podstawie pracy Hussain et al.²⁶¹ oraz Chen et al.²⁶²

Zjawisko FRET zostało opisane już w pierwszej połowie XX wieku, jednak dopiero na początku XXI wieku zaczęto je powszechnie wykorzystywać w praktyce laboratoryjnej. Potencjał FRET został dostrzeżony i zastosowany podczas projektowania narzędzi molekularnych do wizualizacji wielu wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych.^{260,263,264} Sondy oparte na zjawisku FRET przyczyniły się do detekcji licznych procesów zachodzących między białkami²⁶⁵, umożliwiły śledzenie lokalizacji białek^{266,267} czy też ułatwiły wykrycie zjawiska plastyczności synaptycznej – mechanizmu wyjaśniającego modulację siły i liczby połączeń synaptycznych.²⁶⁸

5.2.4 Wygaszanie fluorescencji

Opisywane w poprzednim podrozdziale zjawisko przeniesienia energii pochodzącej od donora na akceptor nie jest jedyną formą prowadzącą do zmian intensywności fluorescencji. Każdy proces, który prowadzi do jej obniżenia nazywamy wygaszaniem, niezależnie od tego, jaki charakter miał czynnik wygaszający (wygaszacz). Wygaszanie fluorescencji może być skutkiem wielu różnych oddziaływań statycznych i dynamicznych, w tym transferu energii, zmian w elektronowej strukturze cząsteczek, czy w ich otoczeniu oraz tworzeniu kompleksów. Czynniki takie jak wysoka temperatura mogą przyspieszać proces wygaszania, prowadząc do zwiększonej ruchliwości cząstek i wymuszając większą częstość ich kolizji. Zbyt długa ekspozycja cząsteczek na działanie światła może prowadzić z kolei do nieodwracalnych uszkodzeń w strukturze fluoroforu i tym samym obniżyć jego zdolność do fluorescencji. Zjawisko to nazywamy fotobłaknięciem (ang. *photobleaching*) i zazwyczaj stanowi poważne

ograniczenie w eksperymentach przeprowadzanych z użyciem fluorescencji, nakładając na nie warunki zapewniające powtarzalność pomiarów. Wygaszanie fluorescencji może również wystąpić z powodu zastosowania zbyt wysokiego stężenia fluoroforu. Zbyt duże zatłoczenie i wzajemne interakcje cząsteczek prowadzą do tzw. wygaszania wewnętrznego. W zależności od warunków eksperymentalnych i specyficznych właściwości używanych fluoroforów i wygaszaczy, wymienione rodzaje wygaszania fluorescencji mogą występować samodzielnie lub ich działanie może się nakładać, często wzmacniając omawiany tu efekt.

Wygaszanie dynamiczne, zwane inaczej kolizyjnym, jest wynikiem zderzenia cząsteczki fluoroforu będącej w stanie wzbudzonej z cząsteczką wygaszacza. Rezultatem tego jest przeniesienie energii wzbudzenia do wygaszacza, przy jednoczesnej dezaktywacji stanu wzbudzonego fluoroforu, z pominięciem emisji fotonu. Warunkiem koniecznym do wystąpienia kolizji jest zbliżenie się obu molekuł a częstość zderzeń warunkuje stężenie wyjściowe molekuł oraz opisana już wcześniej temperatura (im wyższa temperatura tym większa częstość zderzeń) i lepkość ośrodka (im niższa lepkość medium tym większa częstość zderzeń). Wygaszanie dynamiczne jest opisywane przez równanie Sterna-Volmera:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q]$$

gdzie I_0 to intensywność fluorescencji bez wygaszacza, I odpowiada intensywności fluorescencji w obecności wygaszacza, K_{SV} jest stałą Sterna-Volmera, związaną z częstością kolizji a $[Q]$ wyraża stężenie wygaszacza. Klasycznym przykładem wygaszacza dynamicznego jest tlen cząsteczkowy, który skutecznie wygasza fluorescencję większości znanych fluoroforów.²⁶⁹

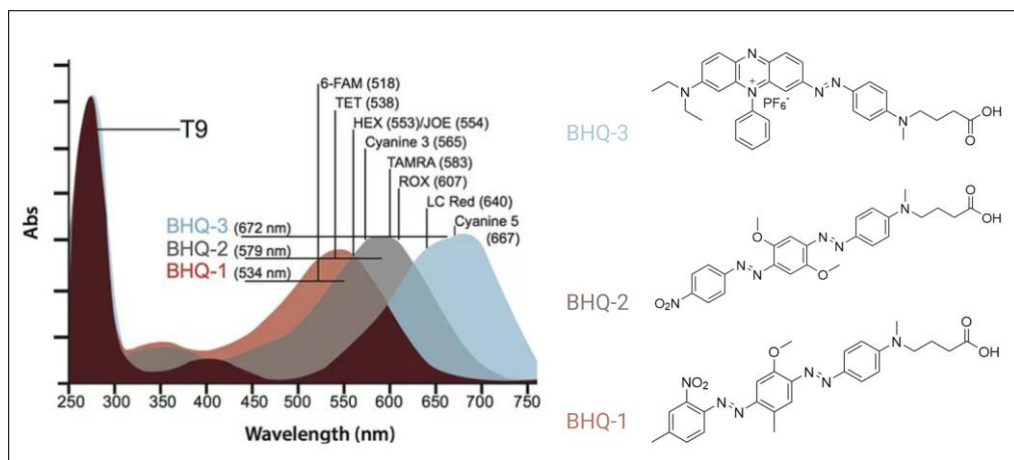
Wygaszanie statyczne opiera się na mechanizmie tworzenia kompleksów pomiędzy fluoroforem a wygaszczem w stanie podstawowym. Kompleksy te powstają na etapie poprzedzającym wzbudzenie fluoroforu i w takiej postaci nie prowadzą do emisji fluorescencji. W odróżnieniu od wygaszania dynamicznego, tu temperatura nie wpływa na przebieg procesu, jednak ogólne warunki sprzyjające tworzeniu się kompleksów, przekładają się pośrednio na wydajność procesu. Efektywność wygaszania statycznego jest ściśle związana z wartością stałej asocjacji kompleksu fluorofor-wygaszcz. Zależność ta jest wyrażana równaniem Sterna-Volmera, pod postacią:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_a [Q]$$

gdzie K_a oznacza stałą asocjacji kompleksu fluorofor-wygaszcz. Wygaszacze statyczne stanowią bardzo dużą i zróżnicowaną grupę. Stabilne kompleksy z fluoroforami mogą tworzyć nukleotydy, jony metali przejściowych, białka, polisacharydy i lipoproteiny, pochodne kwasów karboksylowych czy związki aromatyczne.

Efekt wygaszenia fluorescencji może być uzyskany poprzez mechanizm FRET, gdy w układzie donor-akceptor ten ostatni będzie pozbawiony własnej fluorescencji. Obowiązują tu te same warunki wyjściowe, które były konieczne do transferu energii pomiędzy dwoma fluoroforami. Różnicę stanowi efekt końcowy w postaci braku emisji fluorescencji akceptora po zaabsorbowaniu energii pochodzącej od donora. Mierzalnym parametrem jest więc jedynie spadek intensywności fluorescencji własnej donora. Wygaszacze takie określane są mianem „niewidocznych” lub „ciemnych” (ang. *dark quencher*, *DQ*) a ich właściwości zostały szeroko

docenione i wykorzystane przy tworzeniu różnorodnych sond molekularnych i biosensorów, użytecznych w badaniach biologicznych czy testach proteolitycznych. Większość obecnie dostępnych handlowo DQ to związki, które syntezowane są w wariantach, pozwalających na pokrycie swoim widmem absorpcji całego zakresu światła widzialnego i bliskiego IR. Przykładem takich związków jest seria BHQ[®] (ang. *black hole quencher*), na którą składają się cztery DQ: BHQ-0[®], BHQ-1[®], BHQ-2[®] i BHQ-3[®]. Ich charakterystycznym elementem budowy jest obecność w strukturze grupy azowej ($-N=N-$), która klasyfikuje BHQ[®] jako barwniki azowe. Są one często wykorzystywane w syntezie sond molekularnych, szczególnie ze względu na szeroki wachlarz dostępnych funkcjonalizacji (Rysunek 31). Powszechnie wykorzystywane są również inne barwniki, takie jak DABCYL (4-(Dimetylaminoazo)benzyl), Iowa Black FQ[®], Eclipse Quencher[®] czy seria Tide Quenchers[®]. Tak szeroki wybór wygaszaczy umożliwia zastosowanie ich w różnych technologiach diagnostycznych i badaniach naukowych, począwszy od qPCR (ang. *quantitative PCR*), technik mikroskopii fluorescencyjnej, testów immunologicznych, aż po badania nad strukturą i funkcją białek.



Rysunek 31 Wygaszacze fluorescencji z serii Black Hole Quencher[®]: Widma absorpcji trzech wariantów wygaszaczy BHQ[®] z zaznaczonymi maksimami emisji wybranych fluoroforów: 6-FAM, TET, HEX[®], cyjaniny 3, TAMRA, ROX[®], LC Red 640 oraz cyjaniny 5; po prawej stronie rysunku przedstawiono struktury chemiczne barwników w postaci kwasów karboksylowych. Rysunek przygotowany na podstawie widm dostępnych na stronie producenta Sigma Aldrich.

6. Plan badań

Głównym celem niniejszego projektu doktorskiego było zaprojektowanie i stworzenie narzędzi molekularnych do monitorowania aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację kapu. Intensywny rozwój biologii molekularnej w ostatnich latach doprowadził do identyfikacji szeregu białek zaangażowanych w kontrolę jakości RNA. Dało to podstawę do dalszych badań, mających na celu określenie ich dokładnej roli, zależności i specyficzności substratowej, jednak mnogość tych enzymów i złożoność ich funkcji wymagają zaawansowanych narzędzi do badań. Dotychczas stosowane i opisywane w literaturze metody i techniki badawcze, pozwalają jedynie na ograniczoną analizę pojedynczych enzymów w warunkach mocno odbiegających od natywnych. Podjęte próby wymagają zazwyczaj dużych zasobów finansowych, są wyjątkowo czasochłonne i pracochłonne a generowane wyniki charakteryzują się niską dokładnością.

Pierwszym planowanym etapem projektu było opracowanie chemoenzymatycznej, wysokoprzepustowej metody profilowania substratowego enzymów dekapujących (DEs, ang. *decapping enzymes*), opartej na aptamerowej sekwencji nukleotydowej Broccoli. Do realizacji tego zadania konieczne było przeprowadzenie syntezy chemicznej siedmiu naturalnych analogów kapu: m⁷GpppApG (kap-0), m⁷GpppA_{mp}G (kap-1), GpppApG, m₃^{2,2,7}GpppApG (TMG kap), NRppApG (NAD kap), RflvppApG (FAD kap) i GlcppUpG (UDP-Glc kap). Każdy z powyższych di- oraz trinukleotydów miał zostać szczegółowo scharakteryzowany a następnie wbudowany do nici RNA na drodze transkrypcji *in vitro*. Matrycę w tych reakcjach stanowiła zaprojektowana wcześniej sekwencja DNA, zawierająca fragment kodujący fluorogeniczny aptamer Broccoli. Docelowe, kapowane na końcu 5' RNA oprócz wspomnianej wyżej sekwencji Broccoli, zawierało też fragment poliA usztywniający łańcuch i zapobiegający powstawaniu niepożądanych struktur wyższego rzędu. Tak otrzymane kapowane RNA, po wydzieleniu z mieszaniny reakcyjnej i oczyszczeniu, mogło być wykorzystane do przeprowadzenia profilowania substratowego wybranych DEs. Podczas selekcji białek, które miały być poddane analizie, kierowano się w głównej mierze ich dostępnością oraz różnorodnością organizmów, z których pochodzą. Finalnie, w zestawie badanych enzymów znalazły się: ludzki Dcp2 w kompleksie z Dcp1 (hDcp2/Dcp1), ludzki DcpS (hDcpS), ludzki NUDT16 (hNUDT16), mysz DXO (mDXO), bakteryjny (*E. coli*) RppH (EcRppH) i bakteryjna (*E. coli*) 5'-polifosfataza (5'poliPH) oraz wirusowy (Vaccinia) D9 (VACV D9). Wykorzystując fluorogeniczny charakter sond aptamerowych, zawierających różne analogi kapu na końcu 5' RNA, możliwe było zaprojektowanie wysokoprzepustowego testu fluorescencyjnego (HT FLINT assay, ang. high throughput fluorescence intensity assay), pozwalającego na określenie podatności różnie kapowanego RNA na degradację przez poszczególne DEs. Określenie specyficzności substratowej badanych DEs było punktem wyjściowym do drugiego etapu badań w niniejszym projekcie.

Mając szeroki obraz aktywności enzymatycznej białek w warunkach *in vitro* wobec RNA zawierającego różne warianty kapu na końcu 5', możliwe było zaprojektowanie selektywnych sond RNA, ukierunkowanych na konkretny enzym dekapujący i mających potencjał do zastosowania ich *in vivo*. W tym celu planowałam uzyskać serię nukleotydowych sond fluorescencyjnych, podwójnie znakowanych parą donor-akceptor (FRET), bądź też fluorofor-

wygaszacz, aby umożliwić zarejestrowanie zmiany sygnału fluorescencji w wyniku enzymatycznej hydrolizy kapu. Synteza chemiczna odpowiednio sfunkcjonalizowanych analogów kapu miała umożliwić wprowadzenie barwników fluorescencyjnych do struktury RNA zarówno ko- jak i post-transkrypcyjnie. Drugie z tych podejść pozwoliło na wykorzystanie fluoroforów, które ze względu na swój rozmiar i charakter chemiczny, nie mogłyby być efektywnie wbudowane do łańcucha przez polimerazę T7 RNA. W projekcie przewidziano syntezę i szczegółową charakterystykę sond pod względem ich właściwości emisyjnych, fotostabilności, stabilności chemicznej w różnych pH i temperaturach, w różnych buforach oraz w obecności różnych jonów. Przeprowadzenie tak szczegółowych analiz było zaplanowane dla serii sond selektywnych wobec hDcp2/Dcp1 oraz mDXO.

Ostatnim elementem projektu ukierunkowanego na monitorowanie aktywności enzymatycznej białek degradujących kap w czasie rzeczywistym, była ewaluacja sond pod kątem dostarczania ich do komórek i śledzenia losów za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Pozytywne wyniki z tego etapu badań mogą stanowić podstawę do głębszego zrozumienia szlaków degradacji RNA czy też odkrycia nowych selektywnych substratów i inhibitorów DEs o potencjalnym zastosowaniu medycznym.

Wszystkie zawarte powyżej elementy wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej zostały zebrane i schematycznie przedstawione w formie graficznej (Rysunek 32).

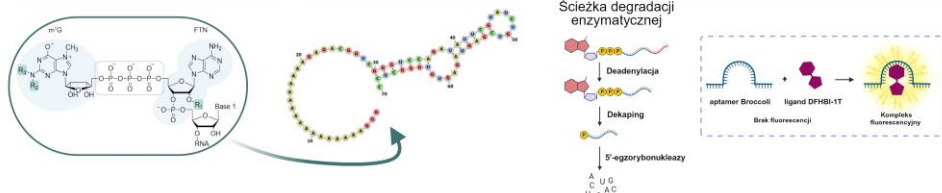
Fluorescencyjne RNA jako sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymów degradacji kapu

I Profilowanie substratów i inhibitorów dla enzymów dekapujących

1. Synteza chemiczna analogów struktury kapu

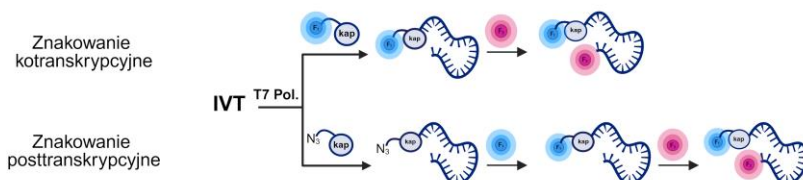
2. Synteza sond aptamerowych

3. Profilowanie enzymów dekapujących za pomocą testu fluorescencyjnego



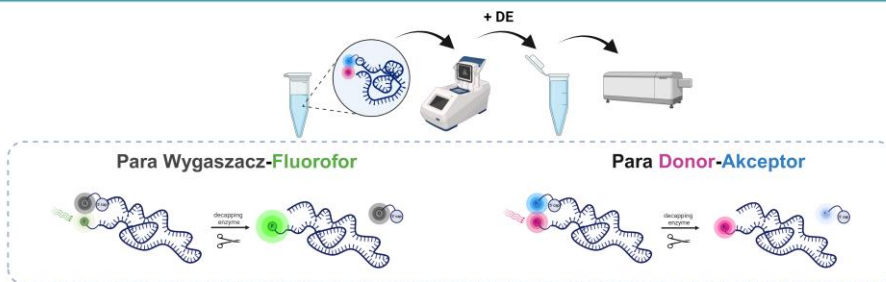
II Projektowanie, synteza i ocena aktywności sond ukierunkowanych na poszczególne enzymy dekapujące

1. Synteza i oczyszczanie podwójnie znakowanych sond fluorescencyjnych



III Charakterystyka sond molekularnych pod względem ich właściwości fizykochemicznych i biochemicznych

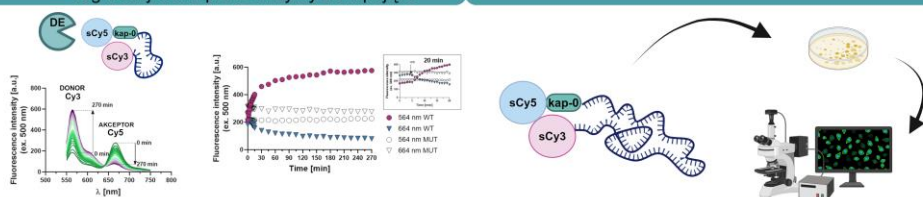
1. Optimalizacja warunków pomiarów fluorescencyjnych oraz dobór barwników



IV Zastosowanie praktyczne sond do monitorowania aktywności enzymów

1. Pomiary zmian intensywności fluorescencji po degradacji sond przez enzymy dekapujące

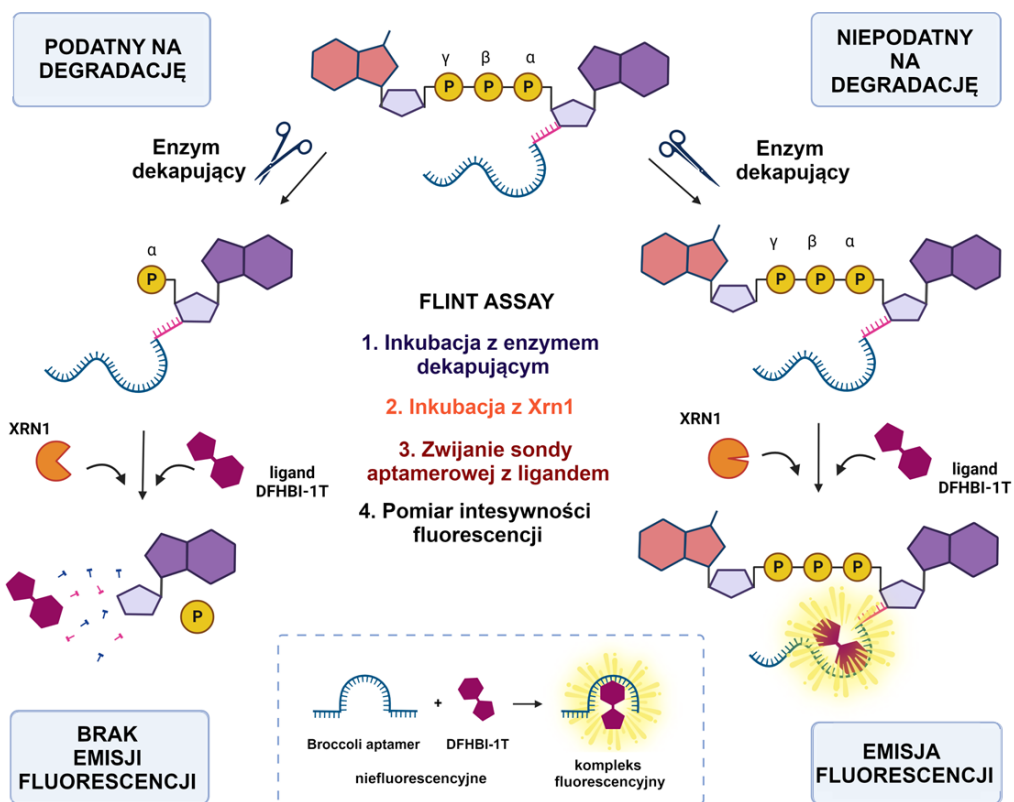
2. Pomiary komórkowe



Rysunek 32 Poglądowe podsumowanie badań przeprowadzonych w niniejszej pracy z uwzględnieniem poszczególnych etapów badań nad sondami fluorescencyjnymi.

7. Profilowanie substratów i inhibitorów dla enzymów dekapujących

Pierwszym i zarazem kluczowym elementem pracy było zaprojektowanie uniwersalnych sond molekularnych do prostej i ilościowej oceny aktywności dekapowania RNA przez różne DEs. Mając na uwadze, że dotychczasowe badania często skupiały się na pojedynczych enzymach badanych w warunkach znacznie odbiegających od natywnych, zarówno podczas projektowania sond, jak i wyboru układu pomiarowego, kluczowym elementem była optymalizacja, która pozwala na zaobserwowanie subtelnych różnic w aktywności DEs, które do tej pory były nieuchwytnie. W trakcie projektowania sond istotnym było, aby końce 5' RNA jak najbardziej przypominały naturalnie występujące struktury i nie wpływały na powinowactwo do DEs. Z tego też powodu na tym etapie badań Autorka pracy swoją uwagę skupiła na fluorogenicznych aptamerach RNA, które mogą być selektywnie degradowane po usunięciu kapu i umożliwiają śledzenie zmian stężenia substratu. Pierwszym krokiem była synteza chemiczna analogów kapu w postaci di- lub trinukleotydów (Rysunek 34), które następnie kotranskrypcyjnie były wprowadzane do łańcucha RNA. Do reakcji transkrypcji *in vitro* wykorzystano matrycę DNA kodującą sekwencję aptameru Broccoli, uzupełnioną między innymi o krótki fragment poliA. Założeniem było, że obecność 17 nukleotydów adeninowych na początku sekwencji zwiększy dystans pomiędzy końcem 5' a ustrukturyzowaną sekwencją aptameru, co pozwoli na odpowiednie wyeksponowanie struktury kapu i uniknięcie ewentualnego wpływu struktury drugorzędowej RNA na aktywność DE. Obecność elementu separującego kap od aptameru minimalizuje również prawdopodobieństwo niespecyficznego oddziaływań z badanymi enzymami. Tak otrzymane 5'-kapowane RNA następnie wykorzystano do zaprojektowania testu opartego na pomiarze intensywności fluorescencji (FLINT) i zbadano aktywność i specyficzność substratową powszechnie znanych i stosowanych w badaniach enzymów dekapujących (Rysunek 33). We współpracy z mgr. Mateuszem Fido przeprowadzone zostały również badania kinetyczne procesu dekapingu, w ramach których wyznaczono parametry kinetyki hydrolizy kapu-1 przez enzym hDcp2. W niniejszej pracy wykazany został również potencjał testu FLINT do oceny inhibitorów VACV D9 oraz hDcp2/Dcp1.

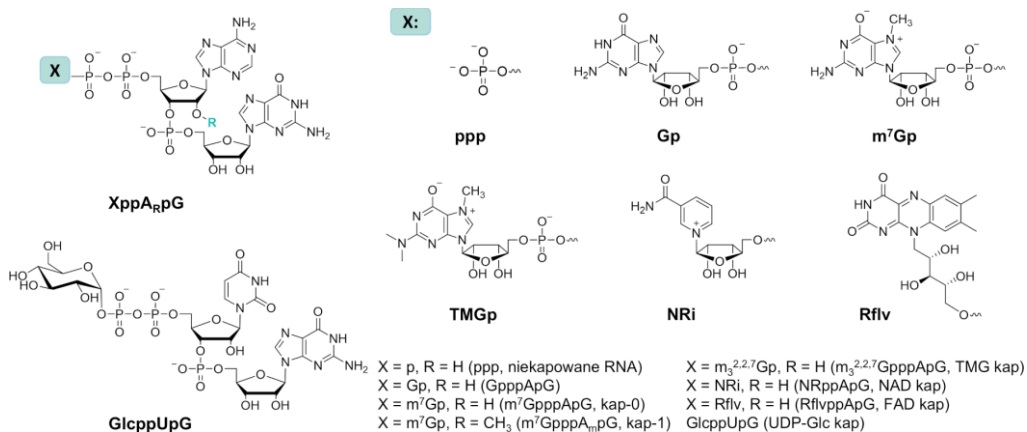


Rysunek 33 Zaprojektowany test FLINT do badania aktywności enzymów dekapujących. Schemat przedstawia dwie ścieżki możliwej interakcji pomiędzy sondą aptamerową z różnymi analogami kapu a enzymem dekapującym. Jeśli kapowane RNA nie jest substratem dla DE, sonda pozostaje nienaruszona (prawa ścieżka). Jeśli natomiast białko usunie strukturę czapeczki, RNA staje się podatne na degradację egzonukleolityczną od końca 5' (lewa ścieżka). W obu przypadkach próbki poddaje się inkubacji z Xrn1, a następnie ponownie zwija i inkubuje z DFHBI-1T. Na koniec wykonany zostaje odczyt intensywności fluorescencji. Jeśli RNA pozostał nienaruszony, obserwujemy wysoki poziom emisji, w przeciwnym razie obserwujemy obniżenie intensywności fluorescencji proporcjonalne do aktywności enzymu dekapującego.

7.1 Synteza chemiczna inicjatorów transkrypcji *in vitro*

Aby przygotować sondy RNA z różnymi wariantami czapeczki, zaprojektowano i zsyntetyzowano serię inicjatorów do reakcji transkrypcji *in vitro* opartych na di- lub trinukleotydowych strukturach o ogólnym wzorze $XppA_{Rp}G$ (Rysunek 34), które zapewniają wysoką wydajność kapowania i prawidłową orientację czapeczki.^{175,270} W tym celu zastosowano strategię syntezy konwergentnej, która minimalizuje straty wydajności w wieloetapowych syntezach chemicznych oraz eliminuje ryzyko degradacji kapu w warunkach prowadzenia reakcji. Ścieżki syntezy większości analogów czapeczki obejmowały syntezę dinukleotydów $pA_{(m)}pG$ na podłożu stałym metodą amidofosforynową, ich późniejszą aktywację do *P*-imidazolidów, a następnie reakcję sprzęgania w obecności jonów $Mg(II)$ lub $Zn(II)$ z odpowiednio zmodyfikowaną pochodną difosforanu guanozyny (GDP, m^7GDP , TMGpp lub Rflvp). W przypadku inicjatora nikotynamidowego (NRppApG), zamiast

dinukleotydu pApG, aktywowano fragment pochodzący od monofosforanu nikotynamidu. Inicjator IVT dla RNA zakończony UDP-glukozą został zaprojektowany jako struktura GlcppUpG (Rysunek 34) i zsyntezowany analogicznie do pozostałych dinukleotydów, przy użyciu dostępnego handlowo α -D-glukozy-1-fosforanu i aktywowanego dinukleotydu pUpG.



Rysunek 34 Di- oraz trinukleotydowe analogi kapu stanowiące inicjatory w reakcji transkrypcji *in vitro*.

7.1.1 Synteza unikalnych wariantów struktury kapu, Xpp(p)

W niniejszym podrozdziale opisana zostanie metodyka otrzymywania 5'-difosforanu guanozyny (GDP), 5'-difosforanu N⁷-metyloguanozyny (m⁷GDP), 5'-difosforanu N², N², N⁷-trimetyloguanozyny (TMGDP) oraz monofosforanu nikotynamidu (NMN), które w kolejnych etapach wykorzystane zostały do syntezy di- i trinukleotydowych struktur kapu. Pozostałe monofosforany, tj. monofosforan ryboflawiny (Rflvp) i glukozy (Glcvp) to związki dostępne handlowo i jedynym działaniem, jakie należało podjąć przed przystąpieniem do reakcji sprzęgania z ich udziałem, była wymiana soli sodowych na trietyloamoniowe przy wykorzystaniu kolumny wypełnionej kationitem DOWEX. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą RP-HPLC oraz MS o niskiej rozdzielczości. Produkty izolowano z mieszaniny reakcyjnej, stosując chromatografię kolumnową na złożu DEAE Sephadex A-25 (forma HCO₃⁻) w liniowym gradiencie TEAB, a następnie odparowano z dodatkiem EtOH, chyba, że zaznaczono odstępstwo od tej procedury.

7.1.2 Otrzymywanie difosforanów guanozyny

Sól sodowa 5'-difosforanu guanozyny (GDP) jest związkiem handlowo dostępnym. W przypadkach wielu partii produktu jest on zanieczyszczony 5'-monofosforanem guanozyny (około 20% zanieczyszczeń) toteż wymianę soli sodowych na trietyloamoniowe korzystnie jest przeprowadzać poprzez oczyszczanie na kolumnie jonowymiennej w liniowym gradiencie buforu TEAB. W rezultacie otrzymywany jest difosforan wolny od zanieczyszczeń i jednocześnie przekształcony w odpowiednią sól. Sama wymiana kationów jest konieczna ze względu na niską rozpuszczalność soli sodowych GDP w rozpuszczalnikach organicznych (DMSO, DMF), w których prowadzone są reakcje. Tak przygotowany substrat jest związkiem wyjściowym w dalszych reakcjach modyfikacji difosforanu lub może być wykorzystany bezpośrednio do sprzęgania do kapu GpppApG.

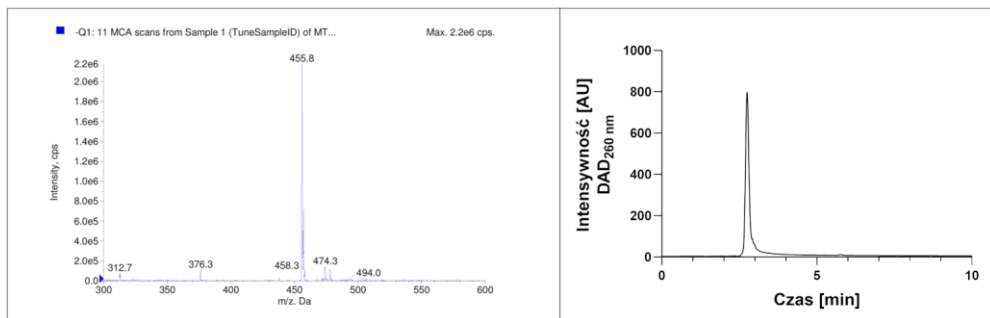
7.1.2.1 Synteza difosforanu monometylowanej guanozyny

Selektywne metylowanie w pozycji N^7 podjednostki guanozyny przeprowadzono według dwóch różnych protokołów, a ich wybór był podyktowany rozpuszczalnością substratu (Rysunek 35). W przypadku trudności uzyskania klarownego roztworu odpowiedniego difosforanu w DMSO, bezpieczną opcją był wybór reakcji prowadzonej z siarczanem dimetylu ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$) w środowisku wodnym, przy pH roztworu utrzymywanym przez cały przebieg reakcji na poziomie 4. Metylowanie prowadzone w rozpuszczalniku organicznym wymagało użycia nadmiaru jodku metylu (CH_3I , 4 – 12 eq.), którego pozostałości, po pełnej konwersji substratu w produkt zneutralizowano poprzez dodanie do mieszaniny pirosiarczyny sodu. Niezależnie od wybranej strategii, produkt izolowano z mieszaniny reakcyjnej stosując chromatografię jonowymienną. Wydajności końcowe tak prowadzonych reakcji mieściły się w przedziale 57 – 68%. Produkt w postaci soli trietyloamoniowej otrzymywano przez odparowanie roztworu uzyskanego po chromatografii do sucha z etanolem i w takiej formie mógł być użyty w reakcji sprzęgania do trinukleotydowego kapu.

A



B



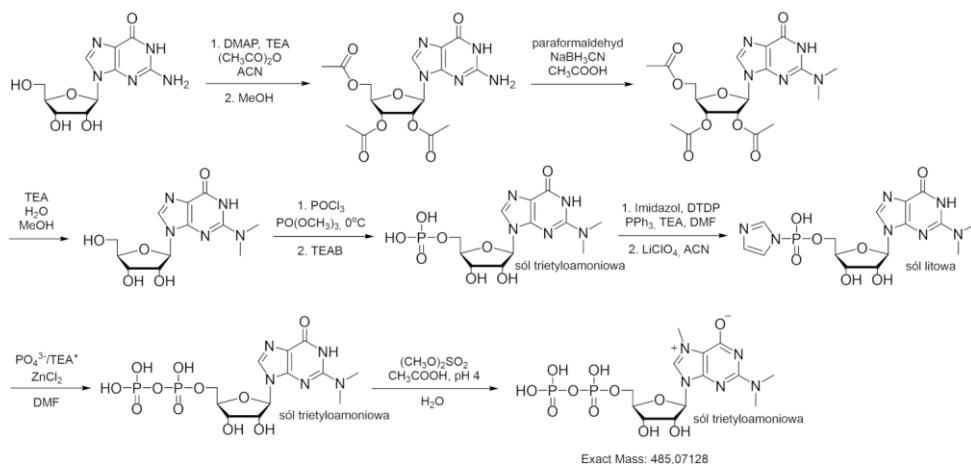
Rysunek 35 (A) Schemat reakcji przedstawiający dwa różne podejścia do selektywnego metylowania w pozycji N^7 guanozyny. (B) Widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla $m^7\text{GDP}$ po przeprowadzonym oczyszczaniu.

7.1.2.2 Synteza difosforanu hipermetylowanej guanozyny

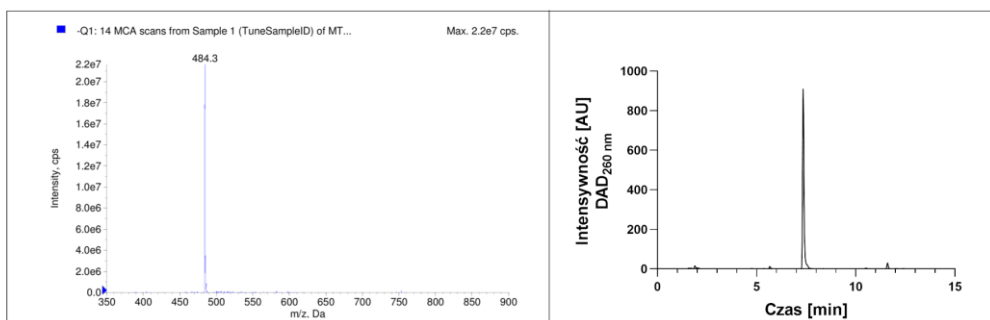
Synteza trimetylowanego 5'-difosforanu guanozyny ($m_3^{2,2,7}\text{GDP}$) przeprowadzona została według siedmioetapowej ścieżki syntezy, w której związkiem wyjściowym była handlowo dostępna guanozyna (Rysunek 36A). Wieloetapowość całego procesu podyktowana była koniecznością zabezpieczania grup funkcyjnych guanozyny podczas przeprowadzonego metylowania egzoocyklicznej aminy w pozycji 2 zasady na drodze aminowania redukcyjnego. Fosforylacja w pozycji 5'-O guanozyny przebiegała według procedury opisanej przez Yoshikawę.²⁷¹ N_2,N_2 -Dimetyloguanozyna została zawieszona w fosforanie trimetylu $\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$, a następnie do mieszaniny dodano dwukrotnie przedestylowany chlorek fosforu (POCl_3). Duży rozmiar adduktu rozpuszczalnika z POCl_3 , a co za tym idzie zawada steryczna,

warunkuje regioselektywność tej metody, ograniczając się do najbardziej wyeksponowanej grupy 5'-OH nukleotydu. Wydłużenie łańcucha fosforanowego o kolejną podjednostkę odbyło się z zastosowaniem chemii *P*-imidazolidów. W pierwszym kroku przeprowadzono aktywację nukleotydu, wykorzystując wspomnianą już w podrozdziale 7.1.4 reakcję Mukaiyamy i Hashimoto.²⁷² Zaopatrzenie nukleotydu w dobrą grupę opuszczającą umożliwia zajście reakcji z innym ugrupowaniem fosforanowym, stanowiącym nukleofil. Reakcja ta nie mogłaby jednak zajść bez neutralizacji ładunków ujemnych znajdujących się zarówno na elektrofilu, jak i nukleofilu. W tym celu stosuje się chlorki metali dwuwartościowych (np. ZnCl_2), które umożliwiają zbliżenie się obu reagujących podjednostek, poprawiając jednocześnie rozpuszczalność związków w DMF. Dodatkowo Zn^{2+} jest w stanie skompleksować atom azotu obecny w grupie opuszczającej, osłabiając tym samym wiązanie N-P.²⁷³ Dodatni ładunek na atomie azotu w pozycji N^7 zasady azotowej obniża stabilność związku, toteż etap metylowania zaplanowano jako ostatni w całej ścieżce. Ze względu na niską rozpuszczalność związku $m_2^{2,2}\text{GDP}$ w polarnych rozpuszczalnikach aprotycznych, takich jak DMSO lub DMF, reakcję przeprowadzono w wodzie, tak jak opisano w podrozdziale 7.1.2.1. Na każdym z opisanych etapów przebieg reakcji kontrolowano za pomocą RP-HPLC i/lub rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości (Rysunek 36B). Izolacja produktów wymagała zastosowania chromatografii jonowymiennej DEAE Sephadex A-25. Produkt końcowy $m_3^{2,2,7}\text{GDP}$ w postaci soli trietyloamoniowej został dokładnie wysuszony pod zmniejszonym ciśnieniem i w takiej formie został użyty w reakcji sprzęgania do trinukleotydowego kapu.

A



B



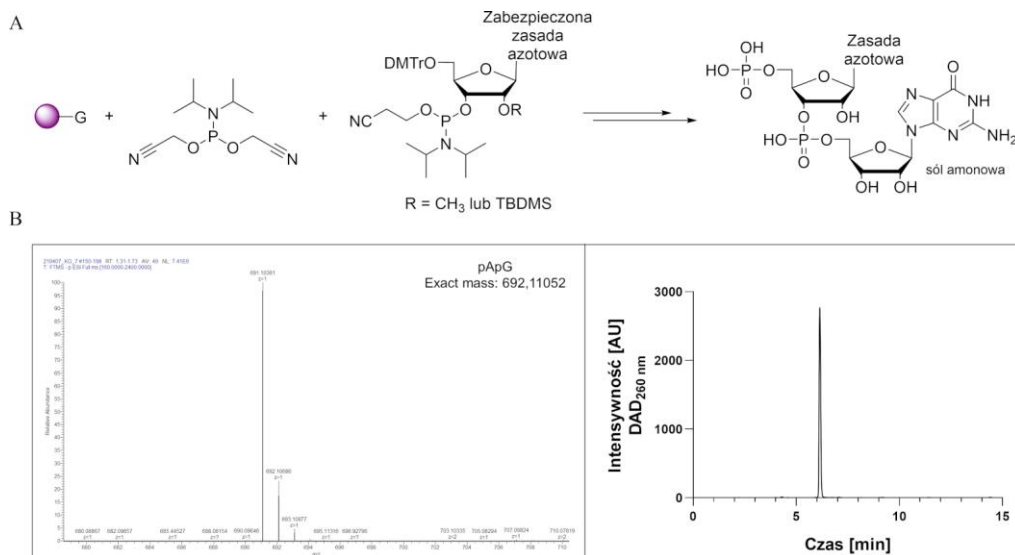
Rysunek 36 (A) Schemat ścieżki syntezy $m_3^{2,7}GDP$. (B) Przykładowe widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla oczyszczonego produktu końcowego – $m_3^{2,7}GDP$.

7.1.3 Synteza chemiczna dinukleotydów na podłożu stałym

Syntezy na podłożu stałym metodą amidofosforynową (Rysunek 37A), w wyniku których otrzymywałam dinukleotydy pApG, pA_mpG oraz pUpG, były przeprowadzane z użyciem automatycznego syntetyzera ÄKTA OligoPilot™ Plus 10 oraz dostępnego handlowo stałego złoża polistyrenowego, o wysokim stopniu obsadzenia ganozyną (ok. 300 $\mu\text{mol/g}$ podłoża). Zastosowanie automatycznej syntezy na podłożu stałym do otrzymania dinukleotydów znacznie przyspiesza proces syntezy, jednocześnie wprowadzając znaczne oszczędności w kontekście zużytych rozpuszczalników, jednak posiada też ograniczenia w postaci niewielkiej skali reakcji związanej z pojemnością kolumny na podłożu (maksymalnie 50 μmol substratu limitującego). Zastosowanie bezwodnych rozpuszczalników i przeprowadzanie reakcji w pomieszczeniu o kontrolowanym poziomie wilgotności powietrza, gwarantowało wysoką wydajność poszczególnych etapów, co w przypadku syntezy manualnej jest dużym wyzwaniem.

Kolejne etapy, a więc odcinanie od złoża i odbezpieczanie grup aminowych w zasadach azotowych są prowadzone poza syntetyzerem. Podczas przeprowadzania syntezy zastosowano opisaną w literaturze procedurę, którą zoptymalizowano i dostosowano do swoich potrzeb.²⁷⁰ Modyfikacje te wprowadzono na etapie odcięcia dinukleotydu od złoża, wydłużając czas inkubacji próbki z AMA (ang. *ammonium hydroxide/methyl amine*, 1/1, v/v) (90 minut zamiast

60 minut) oraz podwyższając temperaturę inkubacji (55°C zamiast 37°C). Pozwoliło to zmaksymalizować wydajność tego etapu, jednocześnie nadal zapewniając warunki, w których kap jest stabilny. Przebieg reakcji był kontrolowany za pomocą RP-HPLC oraz poprzez rejestrowanie widm MS (Rysunek 37B). Każdy z dinukleotydów był oczyszczany z wykorzystaniem jonowymiennej chromatografii kolumnowej na złożu DEAE Sephadex A-25 (forma HCO_3^-) w liniowym gradiencie TEAB. Wydajności końcowe tak prowadzonych reakcji mieściły się w przedziale 64 – 71%. Związki wyizolowane w postaci soli trietyloamoniowych były poddane reakcji aktywacji do *P*-imidazolidów poszczególnych nukleotydów.



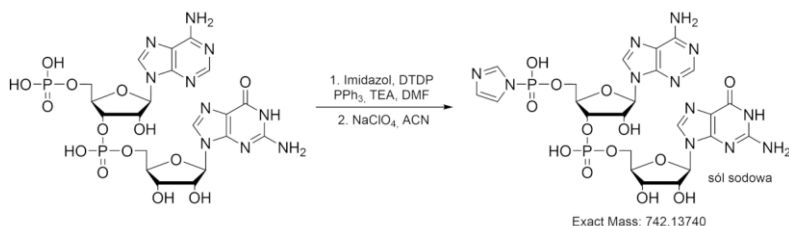
Rysunek 37 Synteza na podłożu stałym (A) Schemat syntezy dinukleotydów na fazie stałej z zastosowaniem chemii amidofosforynów. (B) Przykładowe widmo HRMS oraz chromatogram RP-HPLC dla dinukleotydu pApG.

7.1.4 Aktywacja dinukleotydów

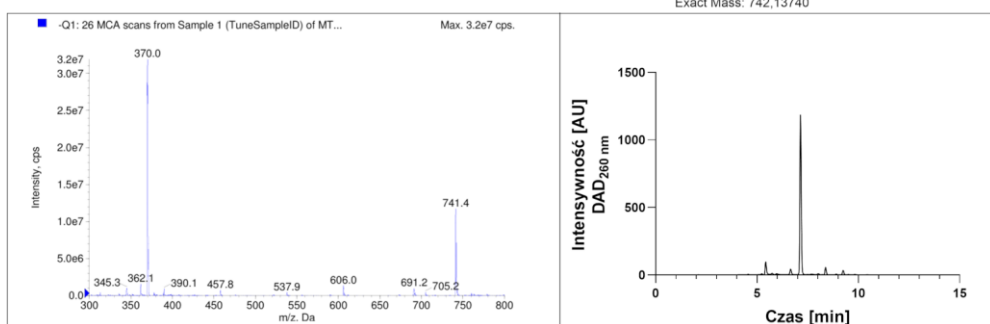
Aktywacja dinukleotydów pNpG (gdzie N to dowolny nukleozyd) była przeprowadzona na podstawie procedury opisanej w pracy Mukaiyamy i Hashimoto.²⁷² Grupa fosforanowa znajdująca się na końcu 5' pNpG stanowi bardzo słabe centrum elektrofilowe, toteż konieczne jest podstawienie jednego z atomów tlenu dobrą grupą opuszczającą, aby w dalszych etapach mogła zajść reakcja sprzęgania z inną podjednostką fosforanową. *P*-imidazolidy nukleotydów można otrzymać w wyniku reakcji prowadzonej w rozpuszczalniku organicznym, z wykorzystaniem następujących reagentów: imidazol (10 – 16 eq.), 2,2'-ditiodipirydyna (DTDP, 3 – 6 eq.), tryfenylofosfina (PPh_3 , 3 – 6 eq.) oraz trietyloamina (TEA, 3 – 6 eq.) (Rysunek 38). Siłą napędową tej reakcji jest tworzenie w jej wyniku stabilnego termodynamicznie produktu ubocznego w postaci tlenku tryfenylofosfiny, co gwarantuje silne przesunięcie równowagi reakcji w kierunku tworzenia produktów. Dzięki temu wydajności reakcji mieszczą się w zakresie 90 – 95%. Na potrzeby niniejszej pracy reakcje aktywacji były prowadzone w temperaturze pokojowej przez 2 – 2,5 godziny, a ich przebieg monitorowano za pomocą RP-HPLC. Każdorazowo reakcję zatrzymywano poprzez dodanie zimnego roztworu NaClO_4 w acetonitrylu. Wytrącony osad kilkakrotnie wirowano i przemywano świeżą porcją

zimnego acetonitrylu, aż do uzyskania klarownego i bezbarwnego supernatantu. Osad wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem i w takiej formie używano do dalszych reakcji. Czystość *P*-imidazolidów po wytrącaniu jest wysoka i nie ma potrzeby dodatkowego oczyszczania związku.

A



B

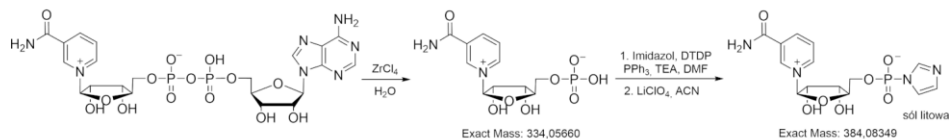


Rysunek 38 (A) Schemat reakcji aktywacji dinukleotydów na przykładzie *Im-pApG*. (B) Przykładowe widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla *Im-pApG*.

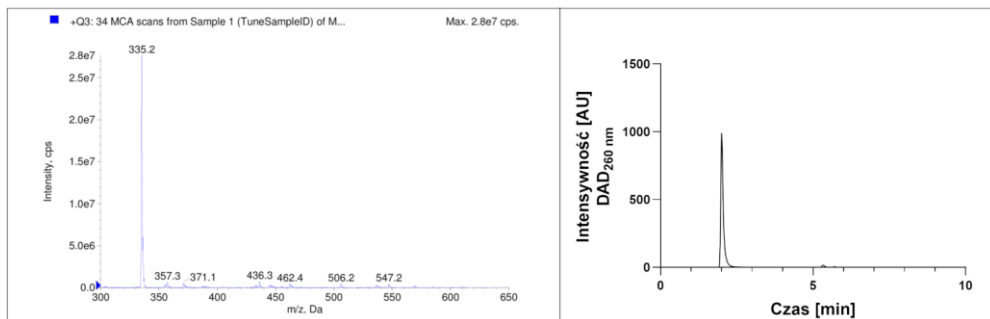
7.1.5 Otrzymywanie aktywowanego monofosforanu nikotynamidu

Pierwszym krokiem do uzyskania aktywnej formy NMN była hydroliza handlowo dostępnej soli sodowej dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD⁺) w obecności chlorku cyrkonu (IV), która prowadziła do otrzymania monofosforanu nikotynamidu oraz 5'-monofosforanu adenozyiny (Rysunek 39A).²⁷⁴ Reakcja prowadzona była w podwyższonej temperaturze a jej przebieg kontrolowano za pomocą RP-HPLC oraz poprzez rejestrowanie widm MS o niskiej rozdzielczości (Rysunek 39B). Reakcję zakończono wytrącając fosforan cyrkonu za pomocą roztworu Na₃PO₄ a następnie usuwając osad za pomocą filtracji. Izolację produktu przeprowadzono wykorzystując kolumnę jonowymienną ze złożem Sephadex A-25 w liniowym gradiencie buforu TEAB. Wysuszony w eksykatorze związek w kolejnym kroku został aktywowany imidazolem i wytrącony w postaci soli litowej w zimnym acetonie (Rysunek 39C). Procedura aktywacji jest analogiczna do opisanej w podrozdziale 7.1.4.

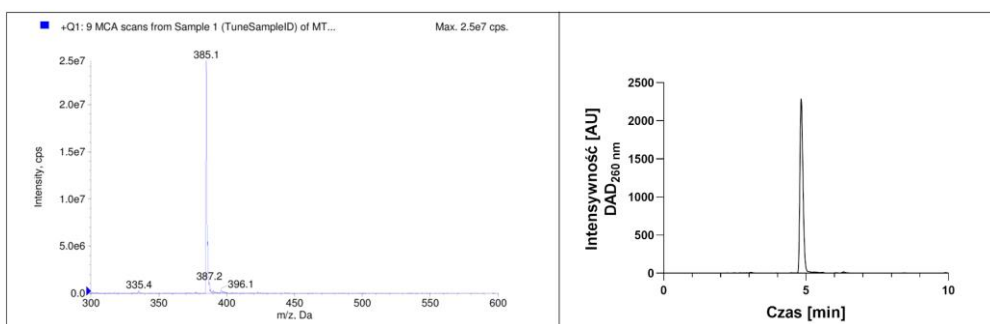
A



B



C



Rysunek 39 (A) Schemat ścieżki syntezy NMN-Im. (B) Przykładowe widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla półproduktu – NMN (C) Przykładowe widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla oczyszczonego produktu końcowego – NMN-Im.

7.1.6 Reakcje sprzęgania

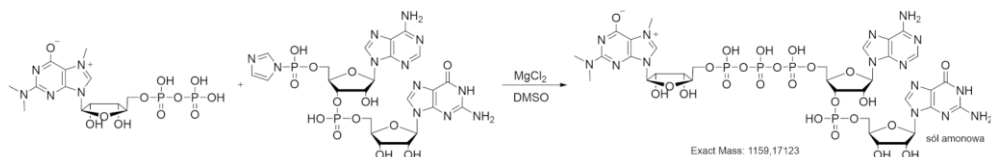
Finalnym etapem syntezy konwergentnej, prowadzącym do otrzymania w pełni funkcjonalnych analogów kapu jest reakcja sprzęgania pomiędzy dwoma podjednostkami nukleotydowymi (Rysunek 40A). Reakcje sprzęgania aktywnych *P*-imidazolidów dinukleotydów z odpowiednio zmodyfikowanymi difosforanami guanozyny (GDP, m^7 GDP, $m_3^{2,2,7}$ GDP) oraz monofosforanami ryboflawiny (Rflvp) i glukozy (Glcp) odbywały się w warunkach bezwodnych (DMSO lub DMF), w obecności nadmiaru bezwodnego chlorku cynku bądź chlorku magnezu. Przebieg syntez był monitorowany za pomocą analiz wykonywanych na RP-HPLC oraz MS. Czas potrzebny do uzyskania pełnej konwersji substratów w produkt był mocno zróżnicowany i dużej mierze zależał od czystości substratów i jakości rozpuszczalników. Nawet śladowe ilości wody w mieszaninie reakcyjnej powodowały, że równocześnie ze sprzęganiem zachodziła reakcja hydrolizy *P*-imidazolidów oraz sprzęganie dinukleotydów z *P*-imidazolidami do dimerów w postaci $GpN_{(m)}p-pN_{(m)}pG$, gdzie $N = A$ lub U . Związki finalne izolowano z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu kolumny jonowymiennej ze złożem Sephadex

A-25, a następnie doczyszczano na semi-preparatywnym RP-HPLC, uzyskując produkt w postaci soli amonowych o wysokim stopniu czystości. Związki końcowe poddawano trzykrotnej liofilizacji, po czym przechowywano w temperaturze -20°C. Powodzenie etapu oczyszczania związków końcowych stanowiło w kolejnych krokach o wydajności kapowania RNA w reakcji transkrypcji oraz wydajności samej transkrypcji.

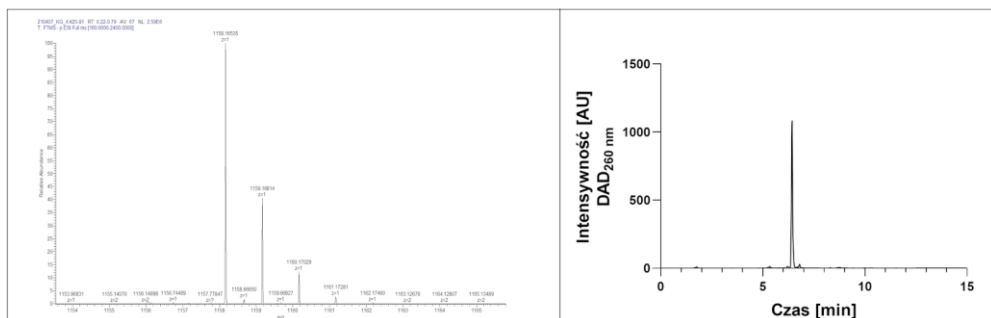
W przypadku inicjatora NRppApG, zamiast dinukleotydu aktywowany został fragment pochodzący od monofosforanu nikotynamidu (NMN). W toku optymalizacji reakcji okazało się, że stosując strategię opisaną dla pozostałych analogów kapu, proces konwersji do produktu trwa kilka dni a końcowa wydajność reakcji oscyluje w granicach 10 – 15%. Zmiana podjednostki, która została aktywowana, znacznie przyspieszyła syntezę i pozwoliła na izolację produktu z 54% wydajnością. Dalszy przebieg syntezy oraz metodyka izolacji czystego produktu została niezmieniona.

Dla końcowych produktów otrzymanych w wyniku reakcji sprzęgania zarejestrowano wysokorozdzielcze widma HRMS oraz przeprowadzono analizę na RP-HPLC (Rysunek 40B).

A



B



struktury drugorzędowej (Rysunek 41), a następnie narzędzie online RNAComposer do przewidywania struktury trzeciorzędowej. Matryce zawierają dodatkowo sekwencję promotora Φ 6.5 (CAGTAATACGACTCACTATA). Modyfikacje na końcu 5' wprowadzono do sekwencji RNA kotranskrypcyjnie. Sekwencja sondy RNA, składająca się z 70 podjednostek nukleotydowych prezentuje się następująco (sekwencja aptameru została pogrubiona i podkreślona):

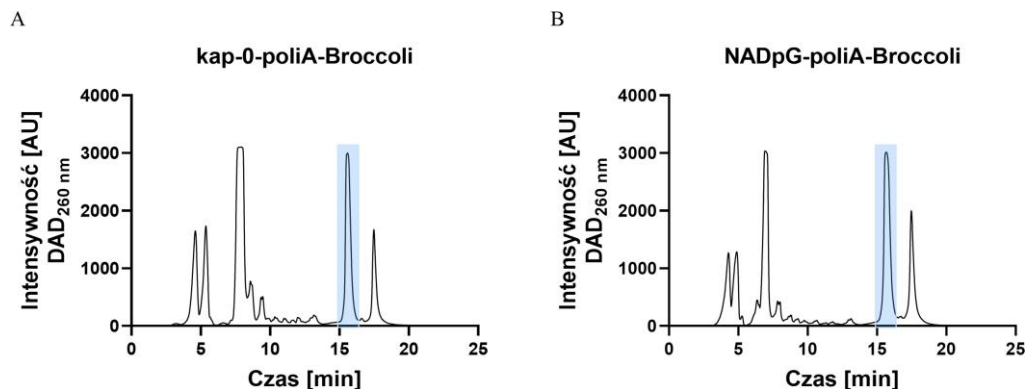
5'Xpp(p)NGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGACGGUCGGGUCCA**GAUAUUCGUA**
UCUGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCC 3'.



Rysunek 41 Przewidywane struktury II- i III-rzędowe sondy aptamerowej, wygenerowane przy pomocy RNAFold WebServer oraz RNAComposer.

Reakcję IVT przeprowadzono z udziałem inicjatorów o strukturze Xpp(p)A_{Rp}G oraz GlcppUpG, wprowadzanych jako jeden z substratów reakcji, a ich postać zapewniała prawidłową orientację czapeczki. Każdy analog kapu został dodany do mieszaniny reakcyjnej IVT w 3-krotnym nadmiarze w stosunku do GTP w celu osiągnięcia wysokiej wydajności kapowania (>90%) i zadowalającej wydajności końcowej reakcji (1,4 – 1,8 µg/µl mieszaniny reakcyjnej). IVT prowadzono z zastosowaniem polimerazy RNA T7 oraz zaprojektowanej matrycy DNA. Mieszanina reakcyjna była buforowana za pomocą dostępnego handlowo 5× buforu transkrypcyjnego (ThermoFisher Scientific). Aktywność polimerazy była silnie uwarunkowana stężeniem jonów magnezu, toteż do reakcji, oprócz Mg²⁺ obecnych w buforze, dodano wodny roztwór MgCl₂ (20 mM). Elementy budulcowe nici RNA (ATP, CTP, UTP) były dodawane w równomolowych stężeniach 5 mM, za wyjątkiem GTP, którego niedomiar w stosunku do pozostałych NTPów (2 mM) zapewniał preferencyjny wybór analogu kapu (6 mM) podczas inicjacji IVT przez polimerazę. Inhibitor RNazy RiboLock pełnił w mieszaninie funkcję ochronną nowopowstałej nici, zapobiegając przed jej enzymatyczną degradacją. Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 37°C, następnie kontynuując

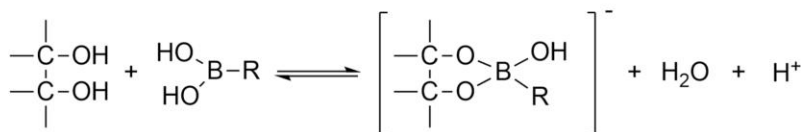
przez kolejne pół godziny z dodatkiem DNazy I. Ten ostatni etap zapewniał usunięcie z mieszaniny pozostałości matrycy DNA. Reakcję zakończono kompleksując jony Mg^{2+} wodnym roztworem EDTA, a następnie ekstrahowano mieszaniną fenol-chloroform 1:1. RNA oczyszczano następnie metodą HPLC (Rysunek 42) na kolumnie Phenomenex Clarity Oligo-RP w układzie faz odwróconych octan trietyloaminy (TEAA) i acetonitryl, a jakość każdego transkryptu zweryfikowano za pomocą elektroforezy żelowej PAGE z powinowactwem do APB (Rysunek 43B).



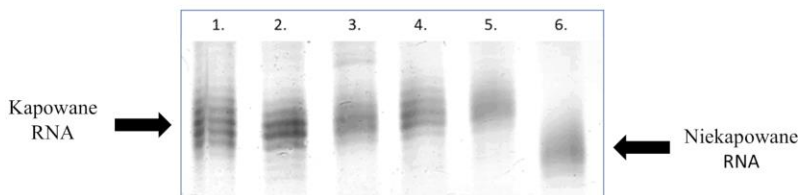
Rysunek 42 Oczyszczanie aptamerowego RNA za pomocą RP-HPLC na przykładzie (A) kap-0-poliA-Broccoli oraz (B) NADpG-poliA-Broccoli. W oby przypadkach kolorem niebieskim zaznaczono fragment sygnału, który odpowiadał zebranej frakcji RNA.

Warto zaznaczyć, że wykorzystywany w analizie PAGE handlowo dostępny kwas 3-akryloamidofenyloboronowy musiał być poddany trzykrotnej rekrytalizacji, przed przystąpieniem do analiz. Deklarowany przez producenta 98% poziom czystości związku nie był wystarczający, aby móc go z powodzeniem wykorzystać. Analiza elektroforetyczna z 1% dodatkiem APB do poliakrylamidu, jest oparta na oddziaływaniu *cis*-diolowych ugrupowań, obecnych w pozycji 2'/3' rybozy w strukturze kapu, a ugrupowaniem boronowym. Tworzące się kompleksy warunkują zmianę tempa migracji w żelu, separując RNA na posiadające i nieposiadające kap (Rysunek 43A). Procedura ta znana jest od lat 70-tych ubiegłego wieku, jednak przywrócona do praktyki została dopiero w ostatnim 10-leciu przez profesora Andresa Jäschke i do tej pory jest z powodzeniem stosowana.²⁷⁵

A



B

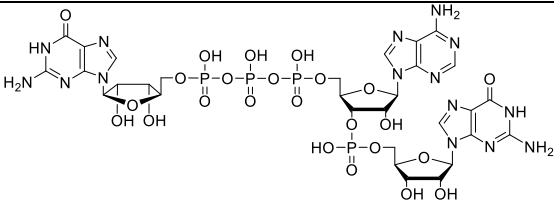
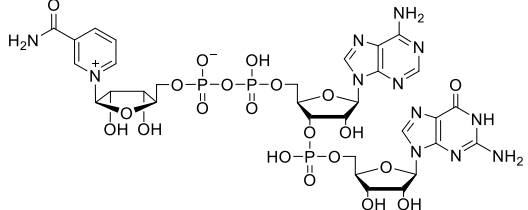
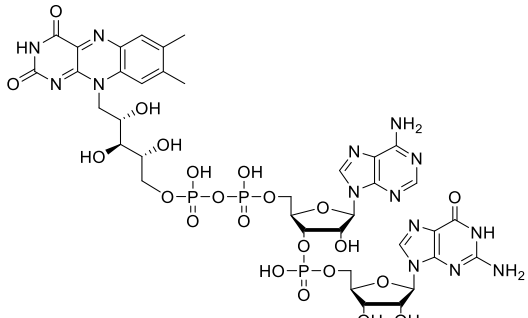
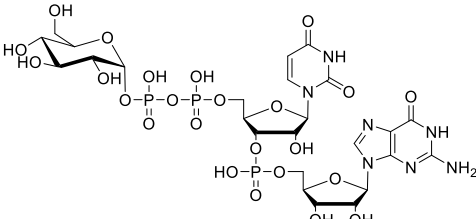
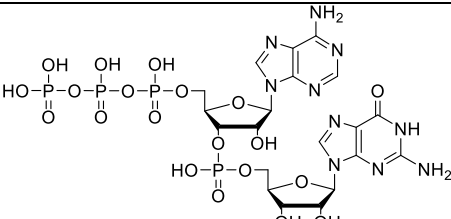


Rysunek 43 Elektroforeza żelowa z powinowactwem do APB (A) Schemat reakcji tworzenia się kompleksów pomiędzy ugrupowaniem cis-diolowym reszty cukrowej a APB. (B) Wizualizacja próbek kapowanego (1.-5.) i niekapowanego (6.) RNA na żelu PA/TBE/APB. Rysunek przygotowany na podstawie pracy Igloi & Kössel.²⁷⁶

Zebrane frakcje zawierające RNA były następnie wytrącane octanem sodu w 99% EtOH i wykorzystywane w dalszych eksperymentach. Stężenie masowe finalnych próbek RNA wyznaczano wykonując pomiar absorbancji ($\lambda = 260 \text{ nm}$). W wyniku opisanej powyżej procedury otrzymano 8 sond aptamerowych, których struktury końca 5' oraz wydajności reakcji IVT zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1 Zestawienie otrzymanych sond aptamerowych oraz odpowiadające im wydajności reakcji IVT.

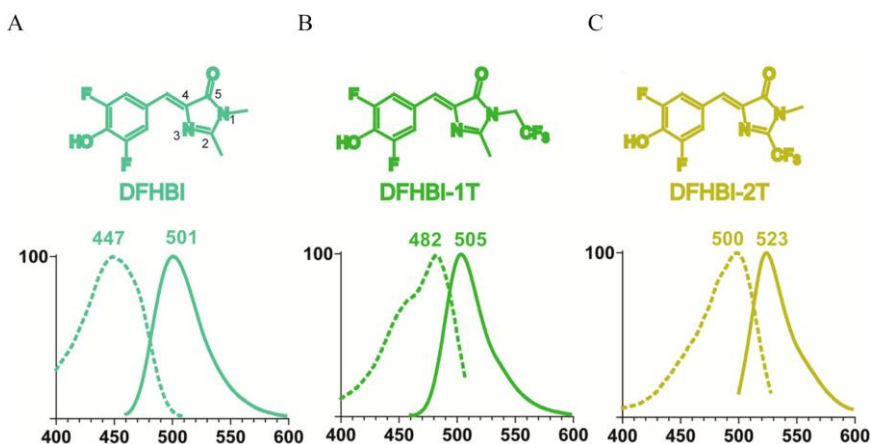
Sonda	Wzór strukturalny analogu kapu	Wydajność reakcji IVT
kap-0-poliA-Broccoli		1,86 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
kap-1-poliA-Broccoli		1,64 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
TMG-poliA-Broccoli		1,71 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Gppp-poliA-Broccoli		1,36 µg/µl
NAD-poliA-Broccoli		1,20 µg/µl
FAD-poliA-Broccoli		1,00 µg/µl
UDP-Glc-poliA-Broccoli (GlcppUpG-poliA-Broccoli)		1,21 µg/µl
ppp-poliA-Broccoli		1,90 µg/µl

7.3 Walidacja metody do analizy sond aptamerowych RNA

Zsyntezowane sondy aptamerowe posłużyły w kolejnym etapie badań, do przeprowadzenia testu, mającego ustalić preferencyjność substratową enzymów degradujących kap. Zaprojektowana metoda analityczna opierała się na wykorzystaniu fluorogenicznego liganda DFHBI-1T, opracowanego i zastosowanego po raz pierwszy w badaniach przez grupę profesora S. Jaffrey'a.²⁷⁷ W 2011 roku uzyskali oni pierwszy fluorogeniczny,

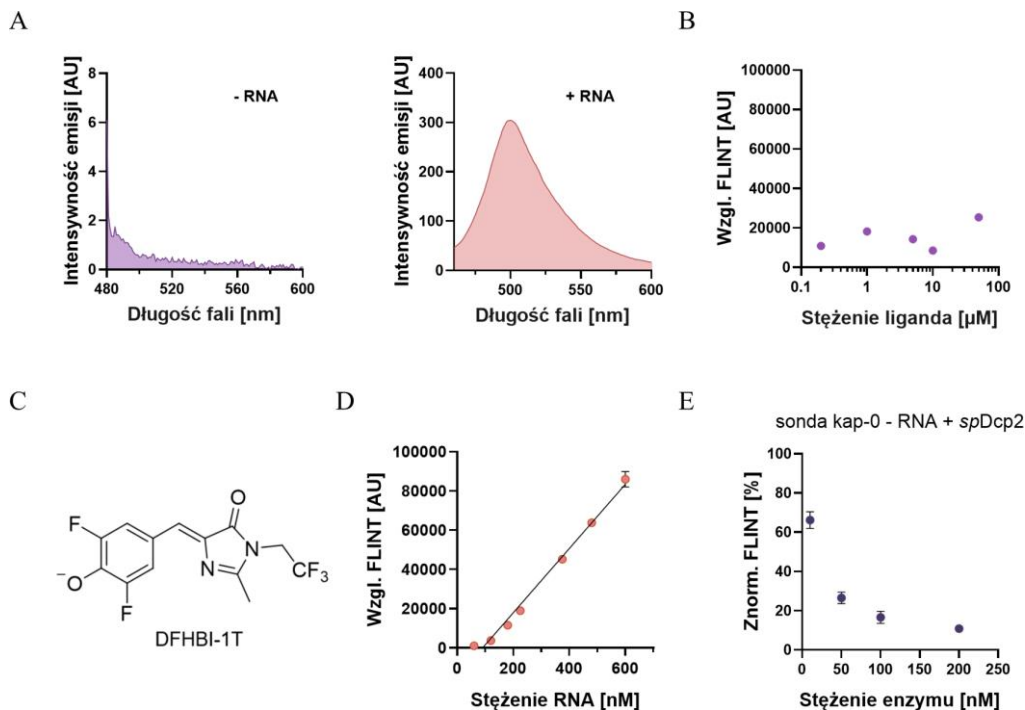
niskocząsteczkowy związek DFHBI, który wykazywał fluorescencję dopiero po związaniu z odpowiednio zaprojektowaną sekwencją RNA.²⁷⁸ Struktura tej cząsteczki jest analogiem fluorofora białka GFP, który powstaje z trzech reszt aminokwasowych, Ser65-Tyr66-Gly67, które ulegają autokatalitycznej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Powstały fluorofor, 4-hydroksybenzylidenoimidazolinon (HBI), jest unieruchomiony wewnątrz białka, umożliwiając emisję jego fluorescencji. Chemicznie syntezowany HBI, jako samodzielna cząsteczka nie wykazuje fluorescencji, podobnie jak zdenaturowane białko GFP. Wystarczy jednak ponowne zwinięcie struktur, aby fluorescencja była przywrócona.^{277,278} DFHBI-1T powstał jako wariant cząsteczki DFHBI i po utworzeniu kompleksu z aptamerem wykazywał, oprócz przesunięcia długości fal odpowiadających maksimum wzbudzenia i emisji fluorescencji, ogólny wzrost poziomu jasności, co przekłada się na niewielki wzrost współczynnika ekstynkcji oraz wzrost wydajności kwantowej w stosunku do pierwowzoru (Rysunek 44).²⁷⁷ Ligand ten jest przykładem rotora molekularnego, a więc dwuelementowej cząsteczki zdolnej do tworzenia stanów skręconych (ang. *twisted state*), wiążących się z przeniesieniem ładunku w wyniku obrotu jednego z segmentów względem drugiego. Wewnątrzcząsteczkowa rotacja powoduje zmianę energii stanów podstawowego i wzbudzonego oraz przebieg procesu relaksacji. Unieruchomienie rotora poprzez jego związanie się (np. z białkiem lub aptamerem) powoduje jednoczesne zablokowanie procesu przeniesienia ładunku i „włączenie” fluorescencji.²⁷⁹



Rysunek 44 Widma wzbudzenia (linia przerywana) i emisji (linia ciągła) kompleksów aptamer-fluorofor, przedstawione jako procent maksymalnej fluorescencji wzbudzenia i emisji dla każdego z kompleksów (A,B,C). Numeracja w (A) wskazuje schemat numeracji atomów pierścienia imidazolinonu. Rysunek zaczerpnięty z pracy Song et al.²⁷⁷

Na etapie wyboru układu pomiarowego przetestowane zostały dwie sekwencje aptamerowe, Broccoli oraz Baby Spinach. Ze względu na korzystniejszy stosunek intensywności fluorescencji pochodzącej od kompleksu do intensywności pochodzącej od tła, do dalszych testów wykorzystano sekwencję Broccoli i to na jej podstawie zaprojektowano sondy RNA. Walidację metody rozpoczęto od ustalenia zależności zachodzących między poszczególnymi elementami układu w kontekście intensywności fluorescencji. Zgodnie z założeniami i doniesieniami literaturowymi, ligand DFHBI-1T nie wykazuje fluorescencji przebywając w formie niezwiązanej z aptamerem, a dopiero po zwinięciu z RNA (Rysunek 45A). Dodatkowo potwierdzono, że stężenie DFHBI-1T nie wpływa silnie na intensywność fluorescencji, o ile występuje w nadmiarze w stosunku do RNA (Rysunek 45B). Ustalono, że

intensywność fluorescencji (wzbudzenie: 472 nm, emisja: 507 nm) ponownie sfałdowanego aptameru w obecności fluorogenicznego rotora molekularnego DFHBI-1T, jest proporcjonalna do stężenia RNA w szerokim (60 – 600 nM) zakresie stężeń (Rysunek 45C, D).



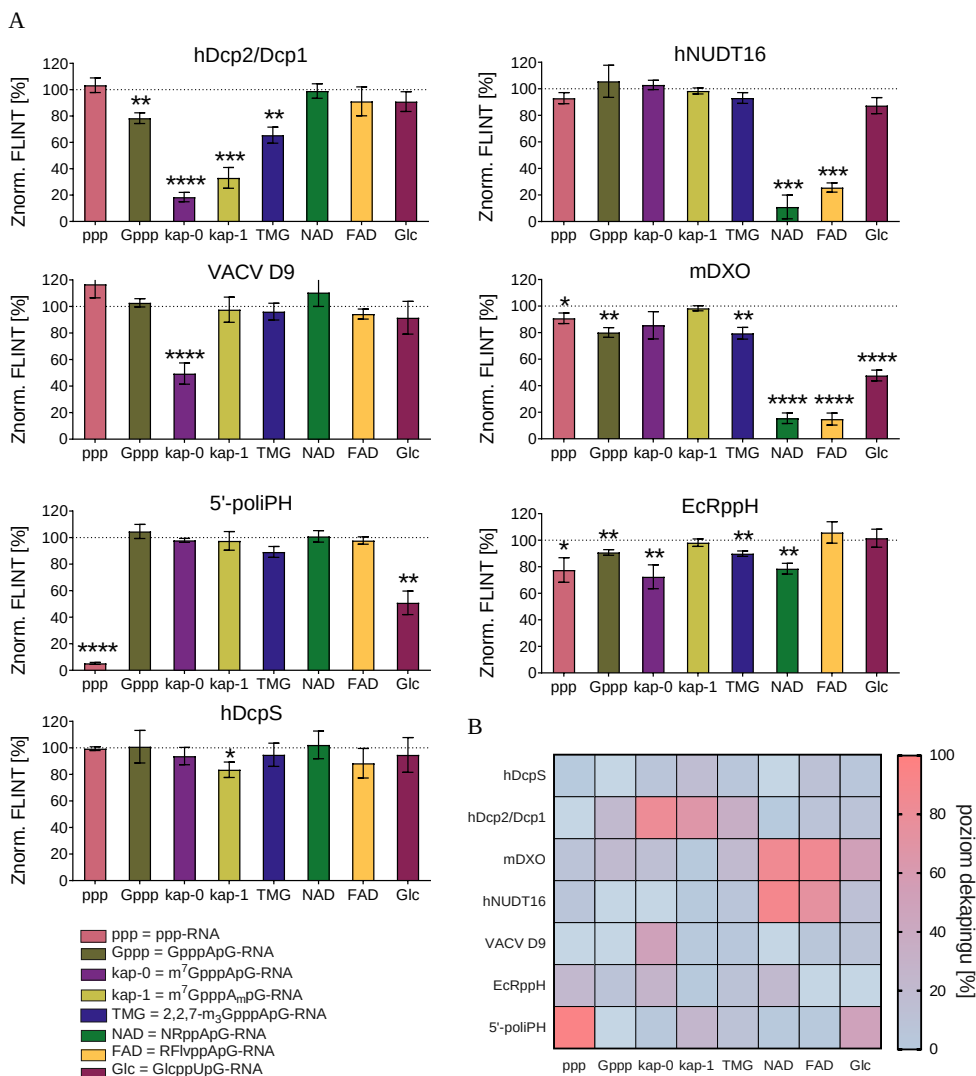
Rysunek 45 (A) 10 μ M roztwór buforowy fluoroforu DFHBI-1T nie wykazuje znaczącej emisji fluorescencji. Po dodaniu 200 nM niekapowanej sondy aptamerowej RNA i ponownym zwinięciu obserwuje się duży wzrost intensywności fluorescencji (pasmo z maks. 507 nm). (B) Nie występuje korelacja pomiędzy intensywnością fluorescencji a stężeniem liganda DFHBI-1T. (C) Struktura chemiczna fluorogenicznego liganda DFHBI-1T. (D) Intensywność mierzonej fluorescencji koreluje ze stężeniem sondy RNA. (E) Intensywność fluorescencji koreluje ujemnie ze wzrostem stężenia enzymu dekapującego, potwierdzając, że usunięcie czapeczki umożliwia dalszą degradację 5'-egzonukleolityczną przez Xrn1. 50 nM enzymu dekapującego zostało użyte jako standardowe stężenie w eksperymentach profilowania aktywności.

Aby ocenić zaprojektowaną sekwencję RNA, inkubowano sondę kap-0-RNA z drożdżowym wariantem enzymu dekapującego – SpDcp2 w różnych stężeniach enzymu przez 30 minut, a następnie z 5'-egzorybonukleazą Xrn1 przez kolejne 30 minut, aby całkowicie zdegradować wolne od kapu transkrypty. Następnie próbka była poddana obróbce termicznej w obecności DFHBI-1T w celu ponownego złożenia pozostałych, nienaruszonych (tj. nieodciętych, a zatem niezdegradowanych przez Xrn1) RNA w kompleks fluorescencyjny. Ponieważ RNA pozbawione struktury kapu są degradowane przez Xrn1, a zatem nie mogą tworzyć aptamerów, obserwowany sygnał fluorescencji (Rysunek 45E) jest ujemnie proporcjonalny do aktywności testowanego enzymu. Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowano wzrost aktywności SpDcp2 wraz ze wzrostem stężenia tego enzymu, chociaż korelacja nie była liniowa, ponieważ stosunek substratu do enzymu zmieniał się znacząco podczas reakcji. Dalsze testy z wykorzystaniem sond RNA z innymi czapeczkami wykazały, że

w celu zróżnicowania aktywności enzymów względem określonych struktur czapeczki, reakcję należy przeprowadzić z nadmiarem RNA w stosunku do enzymu. Ustalono, że optymalne stężenia substratu i enzymu, które zapewniają maksymalny stosunek sygnału do szumu przy najniższych możliwych kosztach syntetycznych, wynoszą 600 nM RNA i 50 nM enzymu (12-krotny nadmiar). Wszystkie etapy wchodzące w skład testu FLINT oraz dwie możliwe ścieżki interakcji pomiędzy sondą a enzymem schematycznie przedstawia Rysunek 33.

7.4 Profilowanie substratowe enzymów dekapujących

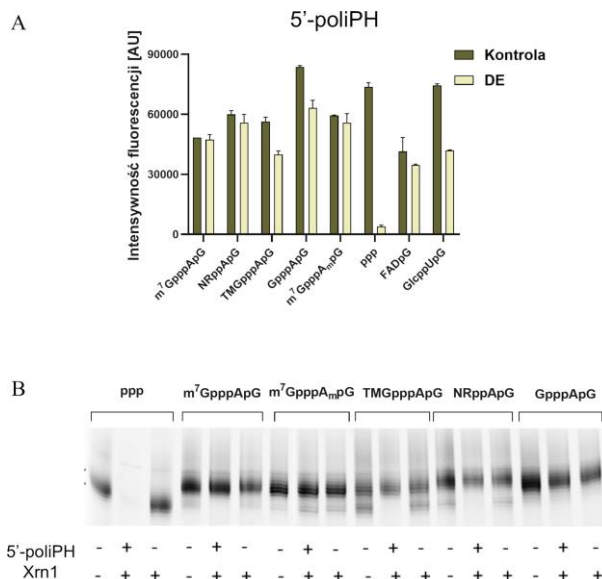
Zoptymalizowany test został następnie wykorzystany do zbadania aktywności fosfohydrolitycznej siedmiu różnych białek (hDcp2/Dcp1, hDcpS, hNUDT16, mDXO, EcRppH, VACV D9 i 5'-poliPH) wobec siedmiu różnych struktur kapu i 5'-trifosforanu (Rysunek 46A). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, kompleks hDcp2/Dcp1 wykazywał silną aktywność głównie wobec kanonicznych struktur kap-0 i kap-1 oraz umiarkowaną aktywność wobec niemetylowanej struktury GpppA i kapu trimetyloguanozynowego (TMG), podczas gdy RNA pozbawione kapu (ppp-poliA-Broccoli) i RNA z niekanonicznymi kapami (NAD, FAD, UDP-Glc) pozostały nienaruszone. Inny członek rodziny Nudix, hNUDT16, wykazał znaczną aktywność zarówno wobec czapeczek NAD, jak i FAD bez znaczącej aktywności w stosunku do RNA z innymi analogami struktur kapu. Jest to sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami, które wskazywały, że hNUDT16 jest w stanie akceptować zarówno snoRNA U8 (z czapeczką TMG), jak i mRNA (z czapeczką m⁷G) *in vitro*.^{280,281} Różnica ta może wynikać z faktu, że hNUDT16 wymaga dwuwartościowych jonów Mn²⁺ lub Co²⁺ do hydrolizy struktur m⁷G, które nie były wykorzystywane w niniejszym teście.¹⁸⁰ Zastosowane w niniejszej pracy warunki (z dodatkiem jedynie jonów Mg²⁺), które wydają się być bardziej istotne biologicznie, sugerują preferencję dla struktur podobnych do metabolitów, co jest zgodne z ostatnimi badaniami nad tym enzymem. Co ciekawe, białko D9 wirusa krowianki wykazywało umiarkowaną aktywność tylko na substratach z kapem-0, z bardzo niską w przypadku pozostałych testowanych struktur kapu. Zgodnie z naszą wiedzą, enzym ten nie był wcześniej badany na RNA o strukturze kapów innej niż m⁷G.¹⁸⁶ Bakteryjna fosfohydrolaza Nudix, RppH, wykazywała wiele aktywności, z których żadna nie przekraczała 30% poziomu dekapingu w warunkach stosowanych w teście. mDXO, uważany za znaczący element kontroli jakości pre-mRNA, degradował głównie niekanoniczne końce 5' RNA (NAD, FAD, UDP-Glc), ale, co zaskakujące, wykazywała jedynie bardzo słabą aktywność wobec nieprawidłowej czapeczki GpppA, porównywalną do obserwowanej dla czapeczki TMG.^{282,283} Zgodnie z oczekiwaniami dla enzymu hDcpS, który działa tylko na bardzo krótkich substratach RNA (do 10 nukleotydów w sekwencji), zaobserwowaliśmy niewielki stopień degradacji każdego z testowanych transkryptów. Wreszcie, przetestowaliśmy handlowo dostępną rekombinowaną 5' polifosfatazę, która jest powszechnie stosowana do hydrolizy 5'-trifosforanów do 5'-monofosforanów. Wykazywała ona rzeczywiście bardzo wysoką aktywność w przypadku 5'-trifosforylowanego RNA, ale wykazywała również umiarkowaną w stosunku do 5'-glukozy-1-fosforylowanego RNA. Wyniki uzyskane dla wszystkich 7 białek zostały zestawione w postaci mapy ciepła (Rysunek 46B). Przedstawione wartości odpowiadają degradacji RNA znormalizowanej do kontroli negatywnej, 100% oznacza pełną degradację RNA (tj. brak fluorescencji); 0% oznacza wynik porównywalny z kontrolą negatywną (maksymalny poziom fluorescencji).



Rysunek 46 (A) Znormalizowane profile intensywności fluorescencji siedmiu badanych enzymów degradujących kap. Słupki przedstawiają procentowy stosunek intensywności fluorescencji przy 507 nm próbki zawierającej 10 μ M DFHBI-1T, 0,6 μ M RNA, 2U Xrn1 i 50 nM enzymu dekapującego. Kontrola negatywna zawierała: 10 μ M DFHBI-1T, 0,6 μ M RNA i 2U Xrn1 (bez enzymu dekapującego). Każdy słupek reprezentuje średnią $\pm$ SD z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna: brak symbolu – nieistotne, * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$, **** – $P < 0,0001$ (test t). (B) Mapa ciepła siedmiu enzymów dekapujących w porównaniu z ośmioma sondami RNA zakończonymi analogami czapeczki 5'. Wartości odpowiadają degradacji RNA znormalizowanej do kontroli negatywnej. 100% oznacza pełną degradację RNA (tj. brak fluorescencji); 0% oznacza wynik porównywalny z kontrolą negatywną.

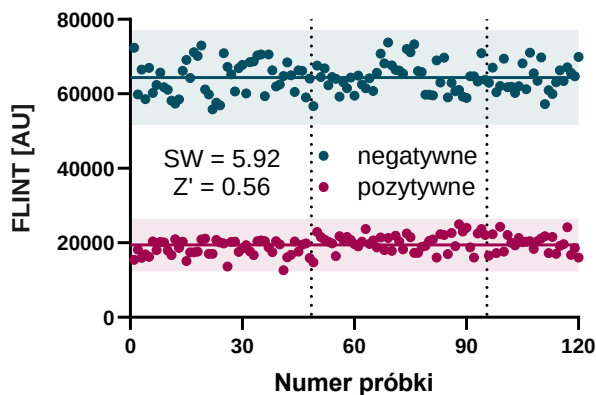
Wszystkie eksperymenty dekapingu, których rezultaty były uzyskane w wyniku odczytu poziomu intensywności fluorescencji na czytniku mikroplątek, zostały niezależnie zweryfikowane przy użyciu elektroforezy z powinowactwem do APB. 15% żel

poliakrylamidowy był kopolimeryzowany z 1% (v/v) APB, zapewniając tym samym lepszą separację pasm RNA posiadających nienaruszoną strukturę, od pasm odpowiadających niekapowanemu RNA. Wyniki analiz PAGE były w dobrej zgodności z danymi uzyskanymi z testu dekapingu FLINT opartego na aptamerach, potwierdzając tym samym jego wiarygodność (Rysunek 47A, B).



Rysunek 47 (A) Wykresy względnej intensywności fluorescencji uzyskanych w wyniku testu FLINT przeprowadzonego dla komercyjnego enzymu 5'-polifosfatazy (5'PolIPH). Próbkę kontrolną zawierała 2 μ g sondy RNA inkubowanej z 2U Xrn1 przez 30 minut w 37°C. Próbkę badawczą zawierała 2 μ g sondy RNA inkubowanej z 50 nM 5'PolIPH przez 30 minut w 37°C, a następnie z 2U Xrn1 przez 30 minut w 37°C. Każdy słupek to średnia $\pm$ SD z co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. (B) Walidacja testu dekapowania FLINT za pomocą elektroforezy z powinowactwem do APB.

W następnym kroku zoptymalizowany test dekapingu został poddany ocenie, w celu ustalenia jego przydatności do badań przesiewowych. Sondę kap-0-RNA inkubowano z kompleksem hDcp2/Dcp1 (kontrola pozytywna) lub jego katalitycznie nieaktywnym mutantem E148Q (kontrola negatywna) w wielu powtórzeniach (po 120), a następnie poddano działaniu Xrn1 i ponownie zwinięto RNA w obecności DFHBI-1T. Intensywność fluorescencji określono ilościowo za pomocą czytnika mikroplątek i przeprowadzono analizę statystyczną (Rysunek 48).²⁸⁴ Warto zauważyć, że dyspersja punktu danych była stosunkowo niska zarówno dla próbek pozytywnych, jak i negatywnych (współczynnik zmienności CV dla każdej płytki mieścił się w zakresie 11 – 12% dla kontroli pozytywnych i 6 – 7% dla kontroli negatywnych) i nie zaobserwowano żadnych oznak systematycznych źródeł zmienności, zarówno w obrębie płytek, jak i między nimi. Okno sygnałowe (SW = 5,92) i współczynnik Z' (0,56) wskazują, że test FLINT oparty na aptamerowym RNA jest niezawodną metodą badania aktywności enzymów dekapujących (Rysunek 48).



Rysunek 48 Ocena przydatności testu FLINT w wysokoprzepustowych testach przesiewowych. Eksperyment wykonano z użyciem sondy kap-0-poliA-Broccoli. Próbkę stanowiącą kontrolę negatywną były inkubowane w obecności nieaktywnego katalitycznie mutantu enzymu hDcp2/Dcp1 – E148Q, natomiast próbki będące kontrolami pozytywnymi inkubowano z enzymem hDcp2/Dcp1. Pomiar wykonano na trzech 96-dółkowych płytkach (jedną połowę płytki zajmowały kontrole pozytywne a drugą – kontrole negatywne), tak aby możliwe było porównanie zmienności wyników pomiędzy poszczególnymi płytkami.

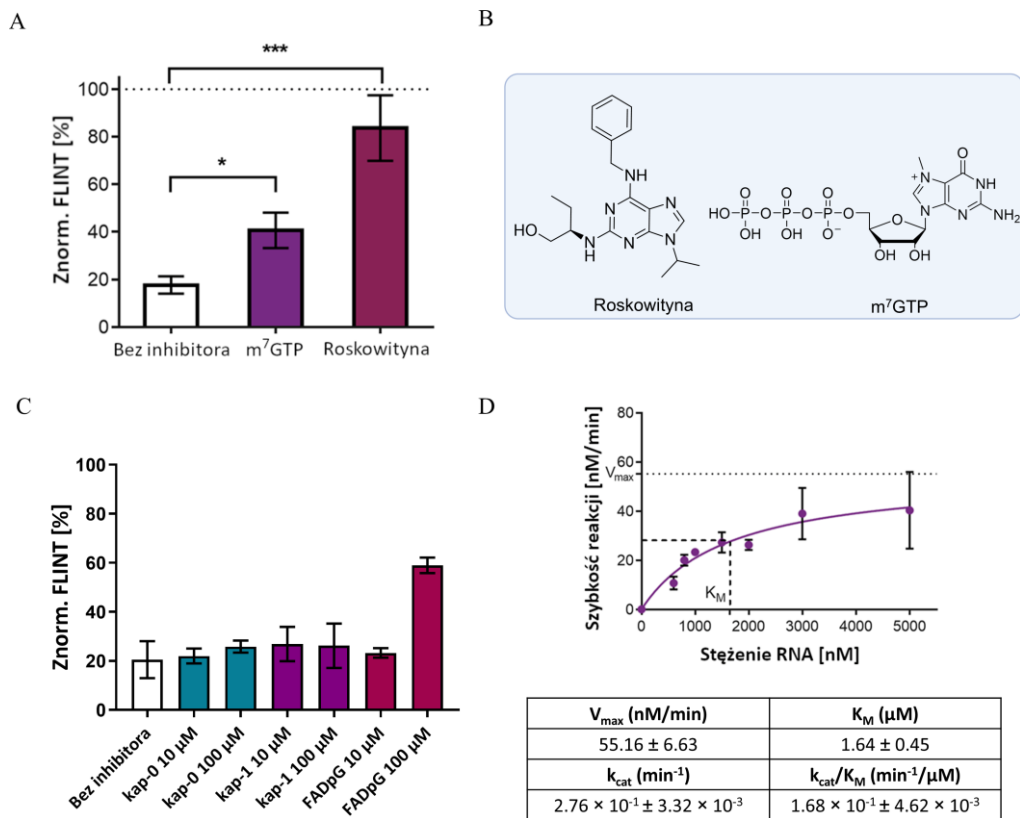
7.5 Charakterystyka inhibitorów dekapingu

Po przeprowadzonym profilowaniu aktywności różnych białek zdecydowano się na weryfikację, czy zaprojektowany test FLINT jest odpowiedni do scharakteryzowania siły działania inhibitorów dekapingu. W tym celu wybrano enzym dekapujący VACV D9, który wykazał wysoką specyficzność dla struktury kap-0 i jako białko wirusowe może być uważany za modelowy cel terapeutyczny. Przetestowano dwa związki, które zostały zidentyfikowane jako inhibitory D9 w poprzednio opisanym badaniu (Rysunek 49A)¹⁸⁷, a mianowicie 5'-trifosforan 7-metyloguanozyny (m^7GTP) i inhibitor kinazy zależnej od cyklin – roskowitynę (Seliciclib) (Rysunek 49B). Zgodnie z wcześniejszymi wynikami, zaobserwowano znaczące poziomy inhibicji VACV D9 dla obu związków (około 80% dla roskowityny i 40% dla m^7GTP), potwierdzając użyteczność opracowanej analizy do badań przesiewowych inhibitorów enzymów dekapujących. Dodatkowo przeprowadzono testy inhibicji hDcp2/Dcp1 wobec kap-0-poliA-Broccoli (Rysunek 49C). Przetestowano dwa trinukleotydowe analogi struktury kapu: kap-0 i kap-1 oraz dinukleotyd RflvppApG, każdy w stężeniu 10 μM i 100 μM . Wynik eksperymentu wskazuje, że niezależnie od zastosowanego stężenia trinukleotydowych analogów kapu, nie wpływają one na aktywność enzymu hDcp2/Dcp1. Dla dinukleotydowego analogu struktury kapu (100 μM RflvppApG) zarejestrowano znacznie wyższą intensywność fluorescencji (na poziomie 60%), co świadczy o zahamowaniu aktywności enzymu. Wszystkie uzyskane wartości normalizowano do kontroli, którą stanowił kap-0-poliA-Broccoli z dodatkiem Xrn1, lecz bez dodatku enzymu dekapującego. Dane literaturowe wyraźnie wskazują, że efektywność hydrolizy przeprowadzanej przez Dcp2 wzrasta dla substratów o dłuższych sekwencjach.²⁸⁵ Niewykluczone jednak, że krótkie, jedynie 3-nukleotydowe fragmenty RNA również mogą być akceptowane i pełnić w tej sytuacji rolę kompetytora, co tłumaczyłoby nieznacznie wyższy poziom FLINT dla próbek zawierających kap-0 i kap-1.

W opinii Autorki jest to jednak dość śmiała interpretacja i wymagałaby przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów weryfikujących.

7.6 Badania kinetyki dekapingu

Następnie, we współpracy z mgr. Mateuszem Fido, przeprowadzona została próba wykorzystania testu FLINT do monitorowania kinetyki procesu dekapowania *in vitro*. W tym celu przeprowadzono czasowo-rozdzielczą kwantyfikację hydrolizy sondy kap-1-poliA-Broccoli przez ludzki kompleks Dcp2/Dcp1. Sondę w stężeniach od 0,6 μM do 5 μM inkubowano z enzymem dekapującym przez 60 minut, a następnie traktowano Xrn1, ponownie zwijano w obecności DFHBI-1T i odczytywano intensywność fluorescencji. Wyniki były podobne do tych wcześniej opisanych dla kompleksu dekapującego *SpDcp2/Dcp1* przy użyciu analizy kinetyki pojedynczego obrotu (Rysunek 49D).^{134,286}

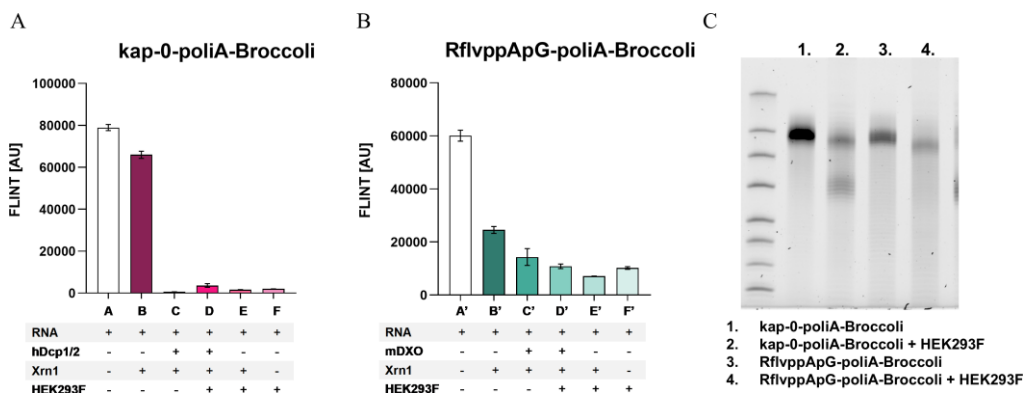


Rysunek 49 (A) Znormalizowana intensywność fluorescencji 200 nM VACV D9 inkubowanego z Xrn1 i 1 mM odpowiedniego inhibitora. Poziom fluorescencji kap-0-poliA-Broccoli, inkubowanego z 200 nM D9 i Xrn1 bez dodatku inhibitora jest pokazany na biało. Każdy słupek reprezentuje średnią $\pm$ SD z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna: brak symbolu – nieistotne, * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$, **** – $P < 0,0001$ (test t). (B) Struktury chemiczne inhibitorów VACV D9. (C) Znormalizowana intensywność fluorescencji 50 nM hDcp2/Dcp1 inkubowanego z Xrn1 i odpowiednimi analogami struktury kapu w stężeniach 10 μ M oraz 100 μ M. Poziom fluorescencji kap-0-poliA-Broccoli, inkubowanego z 50 nM hDcp2/Dcp1 i Xrn1 bez żadnego inhibitora jest pokazany na biało. Każdy słupek reprezentuje średnią $\pm$ SD z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. (D) Szybkość reakcji hDcp2/Dcp1-RNA jako funkcja stężenia kap-1-poliA-Broccoli, dopasowana za pomocą równania modelu Michaelisa-Menten (GraphPad Prism). W tabeli przedstawiono uzyskane parametry kinetyczne.

7.7 Badanie procesu dekapingu w ekstraktach komórkowych

Opisane w poprzednich rozdziałach eksperymenty z udziałem sond aptamerowych były przeprowadzone w dość prostych i kontrolowanych warunkach, toteż postanowiono sprawdzić, czy spełnią one swoją rolę w bardziej złożonych układach biologicznych. W tym celu zaprojektowano eksperyment enzymatyczny z udziałem modelowych sond kap-0-poliA-Broccoli oraz RflvppApG-poliA-Broccoli, które były poddawane degradacji przez hDcp2/Dcp1 lub mDXO oraz Xrn1 w lisatach pochodzących z komórek HEK293F (ludzkie keratynocyty naskórka). Test przeprowadzono zgodnie z procedurą stosowaną podczas profilowania substratowego enzymów dekapujących. Niski poziom intensywności fluorescencji, uzyskany

dla sond inkubowanych jedynie z lizatem komórkowym, wskazuje na obecność w próbce enzymów zdolnych zarówno do dekapingu badanego RNA, jak i jego procesywnej degradacji (Rysunek 50A,B). Poniższy eksperyment nie pozwala niestety wskazać konkretnego mechanizmu degradacji sondy (może to być zarówno degradacja prowadzona przez endo- jak i egzonukleazy). Przeprowadzenie analizy na 15% żelu poliakrylamidowym (Rysunek 50C) pozwoliło wnioskować jednak, że niski poziom intensywności fluorescencji wynika z degradacji struktury aptameru, a nie inhibicji jego wiązania z ligandem.



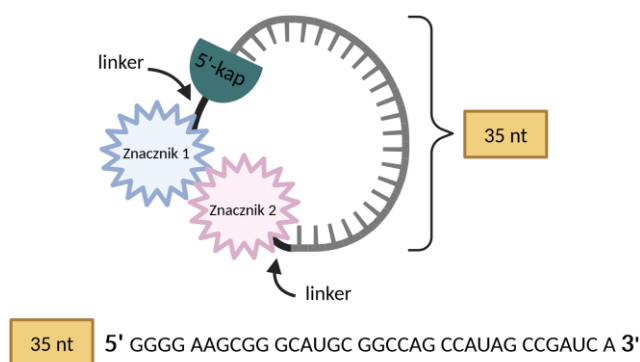
Rysunek 50 Degradacja enzymatyczna sond (A) kap-0-poliA-Broccoli oraz (B) RflvppApG-poliA-Broccoli w obecności białek pochodzących z lizatów komórkowych HEK293F. W reakcjach enzymatycznych zastosowano 0,6 μ M RNA, 2U Xrn1, 50 nM hDcp1/2 lub mDXO oraz 1,27 μ M lizaty komórkowe. Dokładny skład poszczególnych próbek przedstawiono pod wykresami. Słupki przedstawiają intensywność fluorescencji rejestrowaną przy 507 nm dla badanych próbek inkubowanych z 10 μ M DFHBI-1T. Kontrola negatywna zawierała: 10 μ M DFHBI-1T, 0,6 μ M RNA i 2U Xrn1 (bez enzymu dekapującego oraz lizatu komórkowego). Każdy słupek reprezentuje średnią $\pm$ SD z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. (C) 15% żel poliakrylamidowy, zawierający próbki sond kap-0-RNA i FAD-RNA, poddanych inkubacji z lizatami komórkowymi HEK293F oraz kontroli stanowiących odpowiednie RNA bez dodatku lizatu komórkowego.

Zastosowanie tak zaprojektowanego testu FLINT stwarza możliwość selektywnego monitorowania aktywności enzymów w podstawowych układach biologicznych, czy też dostosowania go do badań prowadzonych na żywych komórkach lub nawet prostych organizmach. Opracowane tu sondy mogą stanowić nieocenioną pomoc w zrozumieniu procesu degradacji RNA na poziomie molekularnym oraz komórkowym. Zasadność prowadzonych w tym zakresie badań jest tym większa, że nadal brakuje danych pozwalających na przewidywanie ścieżek rozpadu egzogennie dostarczanych mRNA, coraz częściej stosowanych w celach terapeutycznych. Wreszcie, wykorzystanie wysoce specyficznych sond molekularnych może przybliżyć nas do poznania zależności występujących pomiędzy elementami odpowiadającymi za metabolizm komórki w ujęciu czasowym, jak i przestrzennym. Z całą pewnością pozwoli to na uzyskanie nowego spojrzenia na mechanizmy rządzące stabilnością komórek.

8. Synteza podwójnie znakowanych sond fluorescencyjnych

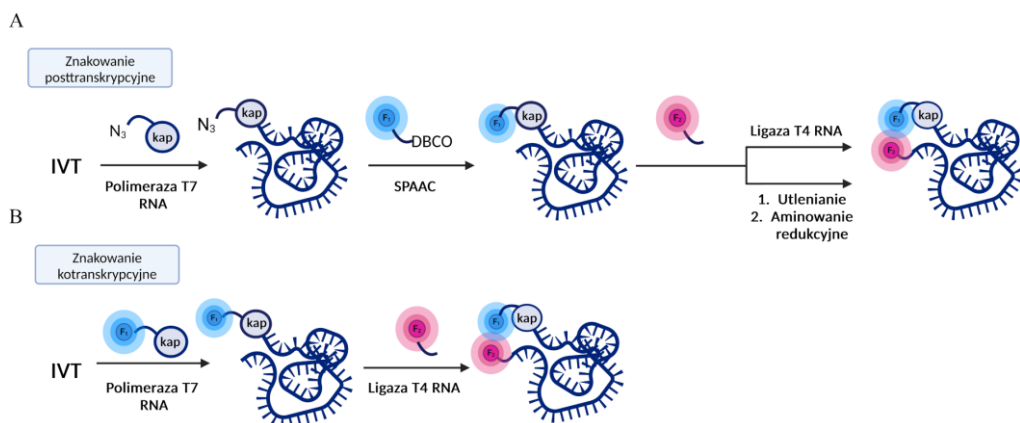
Zaprojektowanie testu FLINT, opartego na interakcji fluorogenicznego liganda DFHBI-1T z odpowiednią sondą aptamerową, stanowiło inspirację do opracowania narzędzi molekularnych do szczegółowego badania mechanizmów dekapingu katalizowanego przez enzymy obecne w komórkach. Poznanie podstawowych wymagań badanych białek w kontekście rozpoznawania ich celu molekularnego było niezbędne do skutecznego zróżnicowania tych enzymów i określenia poziomu ich aktywności. Chociaż dane literaturowe sugerują potencjalne preferencje substratowe niektórych z enzymów będących przedmiotem tej pracy, ograniczenia przepustowości metod badawczych uniemożliwiły przeprowadzenie badań na szerszą skalę. Efektem tego są często raporty dotyczące wyników uzyskanych dla pojedynczych analogów struktury kapu, zestawionych z jednym enzymem dekapującym, co utrudnia porównanie z innymi danymi. Mając na uwadze wysoki stopień złożoności opisywanych procesów, niezbędnym wydaje się opracowanie nowego, bardziej innowacyjnego podejścia, które umożliwi weryfikację uzyskanych dotychczas informacji oraz usprawni bądź nawet zastąpi obecnie stosowane techniki badawcze.

W odpowiedzi na to zapotrzebowanie Autorka pracy postanowiła rozwinąć koncepcję sond fluorescencyjnych, opartych na strukturze RNA, które stanowiłyby narzędzie do selektywnego monitorowania aktywności DE w czasie. Korzystając z rezultatów uzyskanych w ramach testu FLINT, możliwe było zaprojektowanie sond, zawierających analogi kapu, do których badane enzymy wykazywały najwyższe powinowactwo. Struktury wszystkich fluorescencyjnych sond RNA, uzyskanych w tej części pracy, były zbudowane z krótkich, 35-nukleotydowych transkryptów (Rysunek 51), a ich koniec 5' był zaopatrzony w strukturę odpowiednio: kapu-0, GpppApG, NRppApG lub pochodnej glukozy. W toku badań dużym wyzwaniem okazał się wybór barwników fluorescencyjnych, które miały stanowić element odpowiadający za wizualizację badanego procesu. Podstawą do zastosowania sond fluorescencyjnych w monitorowaniu hydrolizy kapu na końcu 5' RNA była zdolność kwasów rybonukleinowych do przyjmowania natywnej formy, w której końce 5' i 3' są do siebie zbliżone.²⁸⁷ Wyznaczone przez grupę profesora Ruiz-Garcia odległości pomiędzy końcami mRNA o różnej długości łańcucha (500 – 5500 nt; pomiędzy 5 a 9 nm) wskazywały na możliwość zaobserwowania efektu FRET, którego warunkiem jest minimum 10 nm dystans pomiędzy donorem i akceptorem. Dodatkowo wykazano, że wzrost długości RNA ma znikomy wpływ na odległości pomiędzy jego końcami, co pozwalało sądzić, że nawet krótkie oligonukleotydy będą charakteryzować się podobnymi właściwościami.^{243,287} Stanowiło to punkt wyjściowy do praktycznego zastosowania sond w badaniach procesu dekapingu. Projekt zakładał użycie związków fluorescencyjnych, które stanowiłyby parę fluorofor-wygaszacz lub donor-akceptor, umożliwiając tym samym śledzenie przebiegu hydrolizy kapu, poprzez obserwację zmian intensywności fluorescencji, wynikających ze zjawiska FRET. Istotnym było, aby uwzględniając takie parametry jak wydajność kwantowa czy stabilność, mieć na uwadze także dostępność związków (i ich cenę), która w znaczącym stopniu mogłaby ograniczyć użyteczność sond. W wyniku optymalizacji ścieżki syntezy szeregu sond fluorescencyjnych, uzyskano zestaw narzędzi molekularnych, które w kolejnych etapach badań wykorzystano do wizualizacji procesu degradacji RNA.



Rysunek 51 Budowa dwuznakowanej sondy fluorescencyjnej.

Podjęcie syntetyczne było uwarunkowane metodą wprowadzania barwników fluorescencyjnych do struktury RNA (Rysunek 52A-C). Należy tu zwrócić uwagę, że w warunkach laboratoryjnych głównym źródłem RNA o długości >20 nukleotydów są enzymatyczne reakcje transkrypcji *in vitro*. Powszechnie stosowane polimerazy RNA, które odpowiadają za procesywne dobudowywanie podjednostek nukleotydowych do nowotworzącej się nici, mają ograniczoną tolerancję na modyfikacje w strukturze inicjatora IVT, co często skutkuje niską wydajnością reakcji lub syntezą jedynie niekapowanego transkryptu. Zważywszy na to ograniczenie, podejście oparte na kotranskrypcyjnym wprowadzeniu do RNA znakowanego analogu kapu, nie zawsze mogło być z powodzeniem zastosowane. Alternatywą było przeprowadzenie transkrypcji z użyciem substratu sfunkcjonalizowanego odpowiednią grupą funkcyjną, który w toku dalszych reakcji pozwoliłby na przyłączenie barwnika do uzyskanego transkryptu. Znakowanie końca 3' RNA okazało się być znacznie mniej problematyczne i prowadziło do uzyskania produktów z wysoką wydajnością, zarówno przy zastosowaniu metod chemicznych, jak i enzymatycznych.



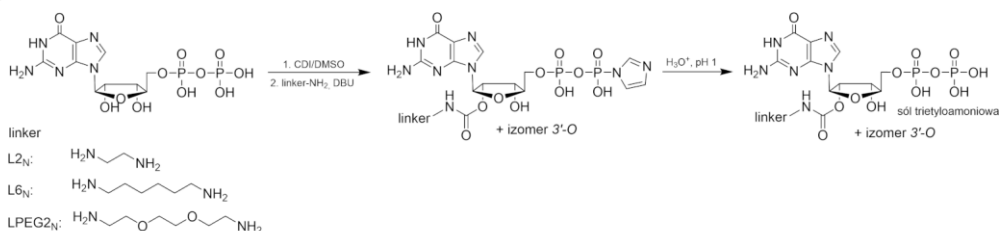
Rysunek 52 Strategie wprowadzania barwników do sekwencji RNA. (A) Posttranskrypcyjne znakowanie końca 5' RNA przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji SPAAC. Znakowanie końca 3' odbywało się na drodze enzymatycznej ligacji lub na drodze reakcji chemicznych (utleniania i aminowania redukcyjnego). (B) Znakowanie 5'-końca RNA przeprowadzono kotranskrypcyjnie, wykorzystując znakowany analog kapu jako starter IVT. Znakowanie końca 3' odbywało się na drodze enzymatycznej ligacji.

8.1 Otrzymywanie inicjatorów transkrypcji *in vitro*

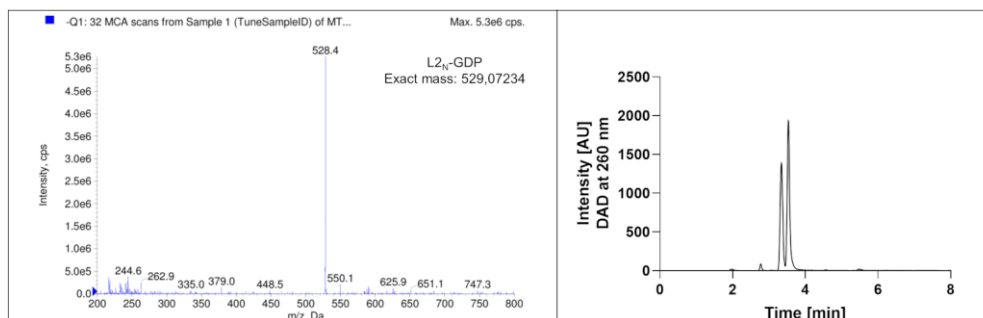
Kotranskrypcyjne wprowadzenie barwnika do łańcucha RNA obejmowało syntezę chemiczną analogu struktury kapu, zawierającego linker zakończony odpowiednią grupą funkcyjną, umożliwiającą przyłączenie barwnika. Lokalizacja umiejscowienia linkerów do znakowania fluorescencyjnego była ściśle podyktowana miejscem aktywności DE oraz koniecznością zminimalizowania potencjalnego wpływu na ich specyficzność substratową. Na podstawie wcześniejszych badań krystalograficznych ustalono, że modyfikacja guanozyny w pozycji N^2 zaburza interakcje kapu z licznymi białkami, w tym eIF4E oraz DcpS, toteż kolejnym elementem struktury kapu poddanym analizie stała się ryboza.^{288,289} Wyniki wcześniejszych badań jednoznacznie wykazały, że linker umiejscowiony w pozycji 2'-O/3'-O w unikalnej strukturze kapu m⁷G nie zaburza oddziaływań z kompleksem dekapującym Dcp2/Dcp1, niezależnie od długości badanego linkera.²⁹⁰ Dodatkowym atutem jest fakt, że modyfikacja ta nie wpływała znacząco na wiązanie się kapu z kompleksem białkowym eIF4E, i nie zaburzała tym samym procesu inicjacji translacji, co w kontekście tej pracy pozwala na założenie, że jej obecność będzie obojętna dla środowiska reakcji.

Ścieżka syntetyczna, prowadząca do uzyskania sfunkcjonalizowanego trinukleotydu, opierała się na przygotowaniu 5'-difosforanu guanozyny, zawierającego linkery aminowe o różnej długości (Rysunek 53).²⁹¹ Substratem wyjściowym do tych reakcji była sól trietyloamoniowa GDP, która w pierwszym etapie przereagowała z 1,1'-karbonylodiimidazolem (CDI), tworząc ilościowo cykliczny produkt przejściowy w postaci 2',3'-O,O-węglanu *P*-imidazolidu. Reakcję prowadzono w reaktorze mikrofalowym, co pozwoliło na skrócenie czasu jej prowadzenia do jedynie 20 minut. Cykliczny węglan mógł przereagować następnie z odpowiednim linkerem zawierającym pierwszorzędową aminę, prowadząc do uzyskania pożądanego karbaminianu. Finalnym etapem procedury była kwasowa hydroliza (pH 1) *P*-imidazolidu karbamoiloguanozyny. Produkt końcowy wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej DEAE-Sephadex, uzyskując sól trietyloamoniową LX_N-GDP w postaci mieszaniny dwóch regioizomerów 2'-O oraz 3'-O, z ogólną wydajnością mieszczącą się w przedziale 43 – 52%, i w takiej formie każdy ze związków był użyty do dalszych reakcji. Rodzaj użytego linkera nie wpłynął znacząco na przebieg syntezy oraz oczyszczania. Schemat reakcji wraz ze strukturami użytych linkerów przedstawia Rysunek 53A. Przykładowe widmo MS dla produktu końcowego L2_N-GDP oraz chromatogram uzyskany w wyniku analizy na RP-HPLC prezentuje Rysunek 53B.

A



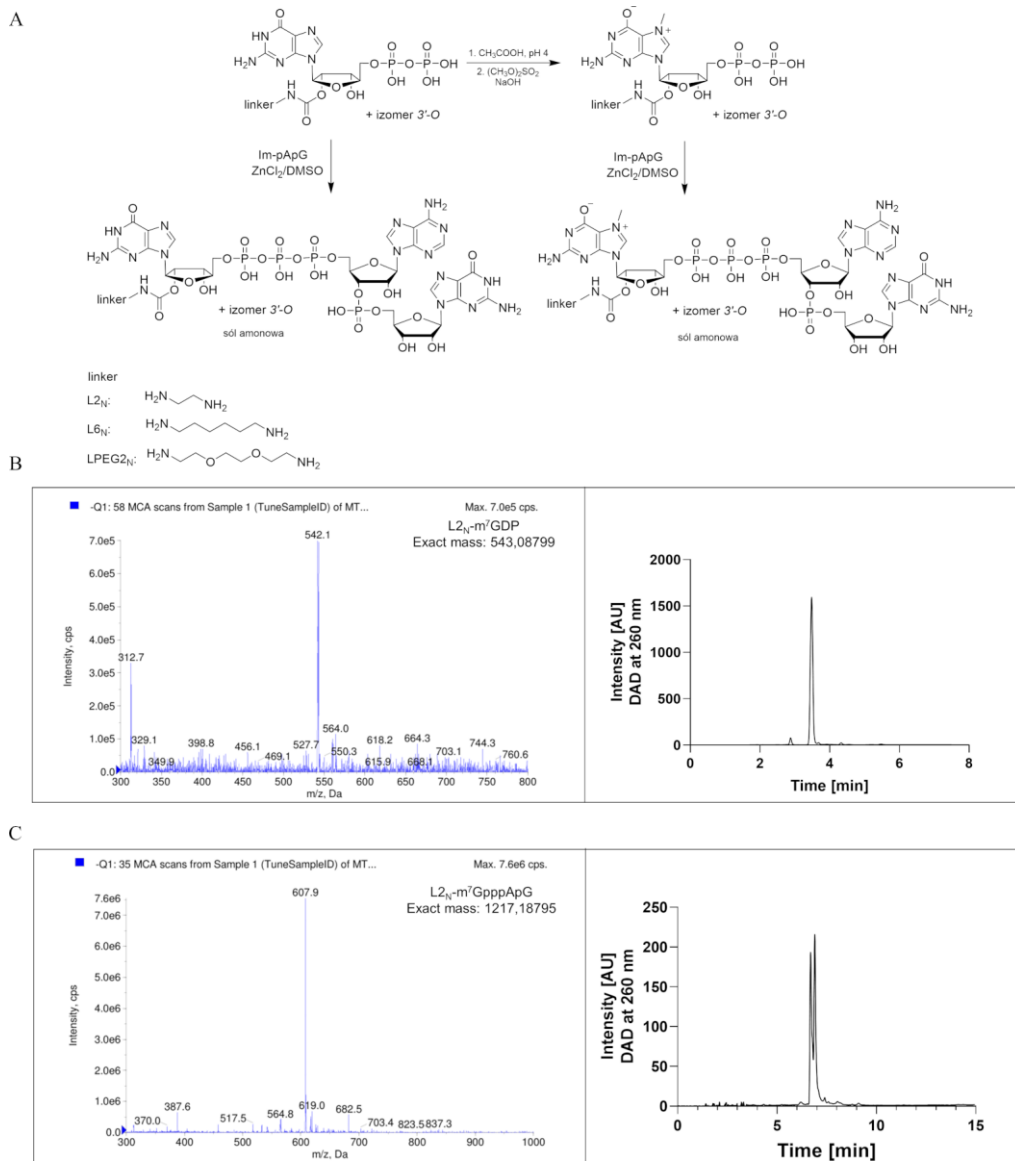
B



Rysunek 53 (A) Schemat ścieżki syntezy sfunkcjonalizowanego linkerem aminowym mononukleotydu w postaci LX_N-GDP. (B) Przykładowe widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla produktu końcowego L2_N-GDP. Dwa sygnały na chromatogramie odpowiadają regioizomerom 2'-O oraz 3'-O.

Synteza sfunkcjonalizowanego kapu-0 wiązała się z koniecznością przeprowadzenia metylowania opisanych wyżej mononukleotydów w pozycji N⁷ guaniny. Ze względu na bardzo dobrą rozpuszczalność substratów w wodzie zastosowano do tego celu reakcję z siarczanem dimetylu, tak jak opisano to w rozdziale 7.1.2.1. Zarówno przebieg reakcji, jak i metodyka oczyszczania oraz izolacji produktów były analogiczne do zastosowanych wcześniej na niemodyfikowanym GDP. Warunki, w jakich prowadzono reakcję gwarantowały, że równowaga kwasowo-zasadowa jest silnie przesunięta w stronę formy uprotonowanej aminy, która nie wykazuje właściwości nukleofilowych. Dzięki temu reakcja prowadziła do selektywnego wprowadzenia grupy -CH₃ w pozycję N⁷ zasady azotowej i uzyskania końcowego produktu w postaci regioizomerów 2'-O i 3'-O z wydajnością w przedziale 40-55%. Zaobserwowano, że nieco wyższy poziom konwersji substratu w produkt uzyskano dla związków zawierających linker złożony z podjednostek PEG, a jego budowa przekładała się na lepszą rozpuszczalność substratu w wodzie. Wyizolowane za pomocą chromatografii jonowymiennej produkty poddano reakcji sprzęgania ze zaktywowanym dinukleotydem Im-pApG (Rysunek 54A,B). Reakcje prowadzono w DMSO z nadmiarem chlorku cynku, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 7.1.6. Do wyizolowania związków końcowych z mieszaniny reakcyjnej użyto kolumny ze złożem DEAE-Sephadex, a następnie zatężone frakcje doczyszczono na semi-preparatywnym HPLC (Rysunek 54C). Produkty końcowe w postaci regioizomerów 2'-O/3'-O LX_N-m⁷GpppApG oraz L2_N-GpppApG uzyskano jako sole amonowe z wydajnościami 35 – 46%. Za syntezę oraz oczyszczenie niemetylowanego analogu kapu L2_N-GpppApG odpowiedzialny był lic. Jakub Binda, który pracował pod bezpośrednią opieką Autorki pracy.

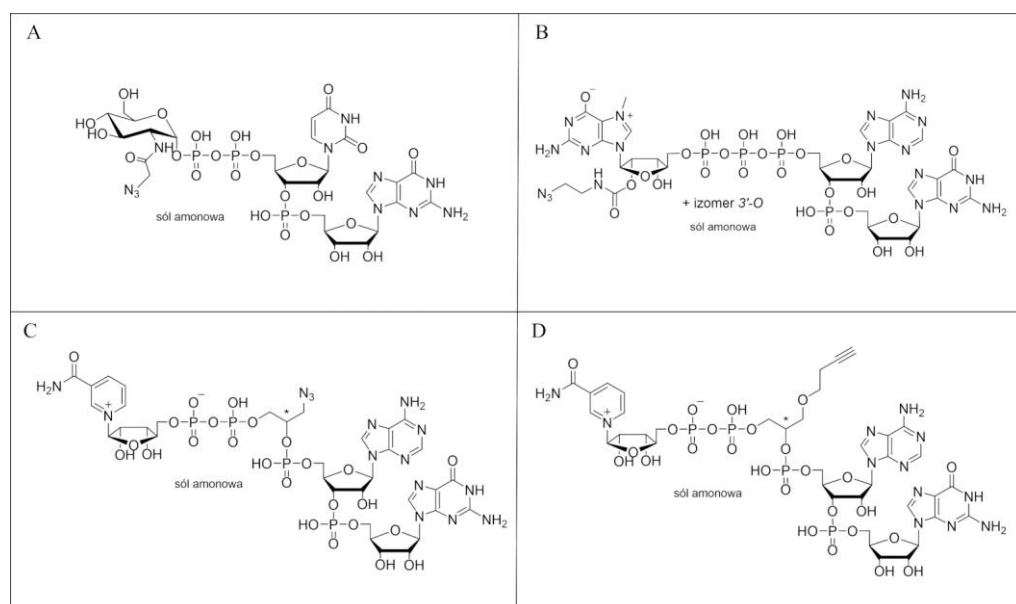
Ze względu na niską stabilność dodatnio naładowanej pochodnej NAD-kapu, w warunkach reakcji funkcjonalizacji niemożliwym okazało się wprowadzenie linkera w pozycję 2'-O/3'-O rybozy mononukleotydu nikotynamidowego. Wszystkie podjęte próby zakończyły się niepowodzeniem, najczęściej wynikającym z degradacji mononukleotydu w wyniku hydrolizy wiązania *N*-glikozydowego. Alternatywnym i zarazem skutecznym podejściem okazało się otrzymanie analogu z modyfikacją w mostku 5',5'-trifosforanowym (Rysunek 55D). Enzym mDXO, na którego aktywność ukierunkowana była sonda NAD-RNA, hydrolizuje w strukturze analogu kapu wiązanie fosfodiesterowe, powodując oddysocjowanie czapeczki razem z pierwszym transkrybowanym nukleotydem (w tym przypadku NRppA). Umieszczenie linkera wraz z barwnikiem fluorescencyjnym w mostku 5',5'-trifosforanowym zapewnia oddzielenie się tego fragmentu po zajściu hydrolizy. Przyłączenie ugrupowania alkinowego umożliwiło w dalszym kroku przeprowadzenie reakcji typu *click* katalizowanej jonami miedzi. Syntezę powyższego analogu kapu wykonał dr Marcin Warmiński.



Rysunek 54 (A) Schemat ścieżki syntezy prowadzącej do otrzymania m⁷GpppApG oraz GpppApG, sfunkcjonalizowanych linkerami aminowymi. (B) Widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla półproduktu L2_N - m⁷GDP. Poszerzony sygnał na chromatogramie odpowiada regioizomerom 2'-O oraz 3'-O. (C) Widmo MS oraz chromatogram RP-HPLC dla produktu końcowego L2_N - m⁷GpppApG. Podwójny sygnał na chromatogramie odpowiada regioizomerom 2'-O oraz 3'-O.

Pomyślna synteza trinukleotydowych analogów kapu, wyposażonych w znaczniki umożliwiające kotranskrypcyjne znakowanie RNA, nie gwarantowała 100% powodzenia na etapie wprowadzania fluorescencyjnych podjednostek do łańcuchów RNA. Istniało ryzyko, że duże związki, które znacząco różnią się budową od naturalnych substratów polimerazy RNA, mogą nie zostać rozpoznane przez ten enzym. Polimeraza T7 RNA, która była wykorzystana w niniejszych badaniach, okazała się wrażliwa na wiele czynników, które szczegółowo zostaną

omówione w podrozdziale 8.3, dotyczącym transkrypcji *in vitro* z udziałem fluorescencyjnych analogów kapu. Biorąc pod uwagę te ograniczenia, zdecydowano się przygotować również trinukleotydowe analogi czapeczki, które pozwalają na posttranskrypcyjne znakowanie RNA. Takie rozwiązanie usprawnia najbardziej problematyczny etap całego procesu syntezy fluorescencyjnych sond, zmniejszając trudności związane z niską tolerancją polimerazy na modyfikacje. Posttranskrypcyjne wprowadzanie barwnika do łańcucha RNA wymagało przygotowania analogu kapu z linkerem, który umożliwiłby przeprowadzenie reakcji typu *click* na gotowym transkrypcie. Aby zrealizować to zadanie wykorzystano analogi kapu, zawierające linkery z ugrupowaniem azydkowym, które przygotowali odpowiednio: N₃-NAC-GlcppUpG – dr Anaïs Depaix (Rysunek 55A), N₃-m⁷GpppApG – dr Małgorzata Wąsińska-Kałwa (Rysunek 55B), NRpp-glN₃-pApG – dr Marcin Warmiński (Rysunek 55C). Strategia syntezy takich nukleotydów oparta jest na podejściu analogicznym do opisanego wyżej dla kapów wyposażonych w linkery aminowe.

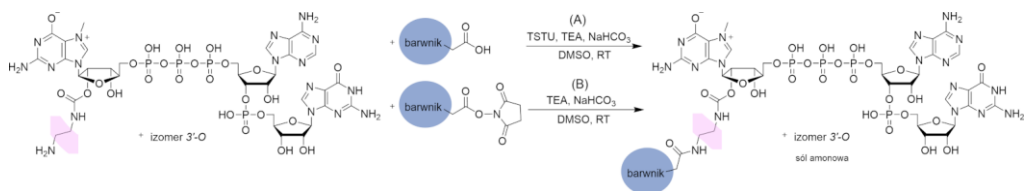


Rysunek 55 Sfunkcjonalizowane analogi struktury kapu (A) N₃-NAC-GlcppUpG (B) N₃-m⁷GpppApG (C) NRpp-glN₃-pApG, izomery D1/D2 (D) NRpp-glButyn-pApG, izomery D1/D2.

8.2 Znakowanie analogów struktury kapu

Strategia znakowania fluorescencyjnego analogów kapu, zawierających linkery aminowe została uwspólniona dla wszystkich uzyskanych związków. Szczegółowy skład mieszaniny reakcyjnej był uwarunkowany dostępnością barwnika fluorescencyjnego, w postaci kwasu karboksylowego lub aktywnego estru NHS (*N*-hydroksysukcynoimidowego) (Rysunek 56). Reakcja pomiędzy sfunkcjonalizowanym analogiem kapu (LX_N-kap) a barwnikiem posiadającym ugrupowanie -COOH przebiegała z dodatkiem trietyloaminy, zapewniającej odpowiednie środowisko reakcji. Konwersja kwasu karboksylowego do estru NHS zachodziła *in situ* podczas inkubacji z TSTU w temperaturze pokojowej. Reakcje były prowadzone w DMSO, a niewielki dodatek wodnego roztworu NaHCO₃ znacznie poprawiał

rozpuszczalność kapu. Dodatkowo zaobserwowano, że zastosowanie linkera LPEG2_N wpłynęło na zwiększoną rozpuszczalność substratów w mieszaninie reakcyjnej i miało przez to korzystny wpływ na wydajność końcową syntezy. Prowadzone badania wykazały też, że wybór barwników w wariantach charakteryzujących się wyższą rozpuszczalnością w wodzie korzystnie wpływa na proces znakowania, co potwierdza 24% wydajność reakcji otrzymywania Cy3-L2_N-m⁷GpppApG oraz 52% wydajność reakcji otrzymywania sCy5-L2_N-GpppApG. Ponadto zwiększa to potencjał zastosowania sond, co jest istotne zarówno na etapie wprowadzania modyfikowanych kapów do nici RNA i ich rozpoznawania przez polimerazę, jak i podczas monitorowania aktywności enzymów dekapujących. W wyniku prowadzonych reakcji otrzymano następujące analogi kapu, z wydajnościami mieszczącymi się w przedziale 20 – 52%: Cy3-L2_N-m⁷GpppApG, Cy3-L6_N-m⁷GpppApG, Cy3-LPEG2_N-m⁷GpppApG, sCy5-L2_N-GpppApG, BHQ-2-L2_N-m⁷GpppApG oraz BHQ-3-L2_N-m⁷GpppApG.



Rysunek 56 Schemat ścieżki syntezy znakowanego analogu kapu, w zależności od grupy funkcjonalnej użytego barwnika: (A) kwas karboksylowy (B) ester NHS. Schemat jest prawidłowy dla substratów posiadających linker z I-rzędową aminą, niezależnie od jego długości (na różowo zaznaczono fragment linkera, który można modyfikować pod względem długości).

Do znakowania pochodnych kapu z powodzeniem wykorzystywane są również reakcje typu *click*. Choć obecnie większą popularnością cieszą się syntezy niewymagające katalizatorów w postaci jonów metali, reakcja CuAAC (cykloaddycja azydkowo-alkilowa katalizowana jonami miedzi(I)) nadal pozostaje powszechnie stosowana. Podejście to wykorzystano w powyższej pracy do fluorescencyjnego wyznakowania analogu kapu w postaci NRpp-glButyn-pApG (Rysunek 57). W reakcji zastosowano barwnik sulfocyjaninę 5 (sCy5) w postaci azydku oraz kompleks miedzi ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{THPTA}$) z dodatkiem askorbinianu sodu. Zadaniem ostatniego z wymienionych składników była redukcja jonów miedzi (II) (Cu^{2+}) do jonów miedzi (I) (Cu^+), które stanowią aktywny katalizator tej reakcji. Ze względu na to, że reakcje znakowania fluorescencyjnego prowadzone były zazwyczaj w niewielkiej skali (około 1 μmol substratu limitującego), dużym wyzwaniem okazała się izolacja uzyskanego produktu i jego oczyszczenie. Z powodu zdolności jonów miedzi(I) do katalizy hydrolizy RNA, nawet niewielkie jej ilości, które mogłyby się znajdować w próbce, byłyby nie do zaakceptowania przez układy biologiczne, w których miały znaleźć zastosowanie sondy. Skuteczne usunięcie związków miedzi zrealizowano za pomocą semi-preparatywnego HPLC, przy odpowiednio dobranym programie. W wyniku opisanej powyżej reakcji otrzymano NRpp-glButyn-sCy5-pApG z 58% wydajnością reakcji.

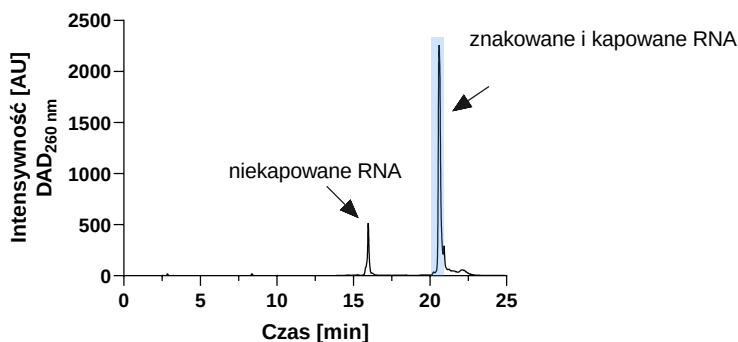


Rysunek 57 Schemat reakcji CuAAC znakowania analogu kapu – NRpp-glButyn-sCy5-pApG.

8.3 IVT i kontranskrypcyjne wprowadzanie analogów struktur kapu

Enzymatyczna reakcja transkrypcji *in vitro* ukierunkowana na syntezę RNA zawierającego fluorescencyjny analog kapu na końcu 5', wymagała licznych optymalizacji warunków jej przeprowadzania. Aktywność polimerazy T7 RNA okazała się na tyle złożona, że nawet niewielkie zmiany w strukturze inicjatora czy składzie buforów były w stanie drastycznie zmienić wydajność reakcji lub całkowicie ją zatrzymać. Odpowiedni dobór stężeń 5'-trifosforanów nukleozydów (NTP), a w szczególności stężenia inicjatora IVT (kapu), miały kluczowe znaczenie dla powodzenia przeprowadzanych reakcji. Zastosowanie nadmiaru kapu nad 5'-trifosforanem guanozyny zapewniało wysoki poziom kapingu, jednak należało do tego podchodzić bardzo ostrożnie. W przypadku, gdy stężenie kapu podniesiono z 6 mM do 8 mM (4× nadmiar nad GTP) wydajność reakcji spadała o połowę, podczas gdy 10 mM stężenie kapu (5× nadmiar nad GTP) powodowało jej zupełne zahamowanie. W dużej mierze było to spowodowane ograniczoną rozpuszczalnością inicjatora w środowisku reakcji. Duża, hydrofobowa cząsteczka barwnika istotnie wpływała na właściwości fizyczne całego analogu kapu i jak się później okazało, warunkowała również właściwości uzyskanego RNA. Zjawisko wzrostu hydrofobowości kapowanych RNA wykorzystano do skutecznej izolacji i oczyszczenia transkryptów za pomocą RP HPLC. Wyznakowane i kapowane RNA posiadały czasy retencji wydłużone nawet o 4 – 5 minut w porównaniu do niekapowanych wariantów (Rysunek 58).

Cy3-L6_N-m⁷GpppApG-RNA₃₅



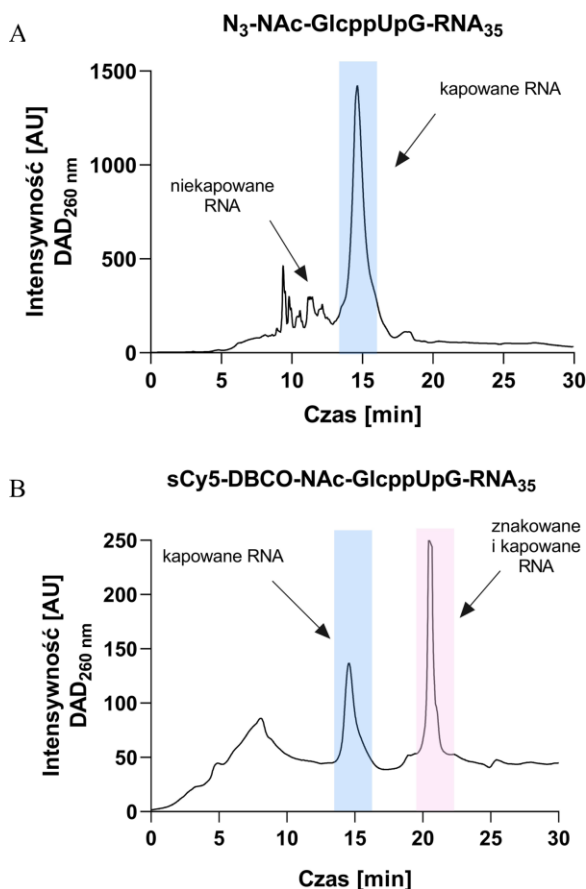
Rysunek 58 Chromatogram uzyskany w wyniku oczyszczania znakowanej na końcu 5' sondy Cy3-L6_N-m⁷GpppApG-RNA₃₅ za pomocą RP-HPLC. Oczyszczanie prowadzono na kolumnie Phenomenex, Clarity Oligo RP (150 mm x 4,6 mm, 3 μm), T = 60°C, w liniowym gradiencie stężeń buforu (50% Buforu B w 30 minut), Bufor A: 100 mM octan trietyloaminy, pH 7, Bufor B: 200 mM octan trietyloaminy, pH 7/ACN, 1/1, v/v), przepływ 1 ml/min.

W poniższej pracy zbadano również wpływ długości linkerów łączących podjednostkę kapu z barwnikiem na przebieg IVT. Zastosowanie analogów zawierających długi hydrofobowy linker (L6_N), prowadziło do uzyskania niższych wydajności (0,19 μg/μl) niż w przypadku linkera zawierającego dwie podjednostki -CH₂- (0,35 i 0,56 μg/μl) lub ugrupowania PEG (0,34 μg/μl). W każdym z tych przypadków (Cy3-L2_N-m⁷GpppApG-RNA₃₅, Cy3-L6_N-m⁷GpppApG-RNA₃₅, Cy3-LPEG2_N-m⁷GpppApG-RNA₃₅, sCy5-L2_N-GpppApG-RNA₃₅) (Rysunek 56) wydajność kapowania była porównywalna i na podstawie uzyskanych chromatogramów oceniono, że wynosiła 79 – 83%.

Na drodze IVT do transkryptów udało się również wprowadzić niekanoniczne analogi struktur kapu – fluorescencyjnie wyznakowany analog NAD-kapu (NRpp-glButyn-sCy5-pApG) oraz dinukleotydy imitujące strukturę kapu FAD. Modyfikacje warunków reakcji w pierwszym w wymienionych przypadkach polegały na zmianie stężenia NTPów oraz zastosowaniu niższego niż zazwyczaj pH buforu (6,5 zamiast 7,9), co skutkowało w uzyskaniu 80% wydajności kapowania RNA, przy ogólnej wydajności reakcji wynoszącej 0,24 μg/μl. Znacznie więcej optymalizacji wymagała próba wprowadzenia do nici RNA przygotowanych przez dr. Marcina Warmińskiego dinukleotydów wyznakowanych analogami fluoresceiny ((5)-FAM-C3-ppApG oraz (6)-FAM-C3-ppApG) (Rysunek 68A). Wykorzystywane do tej pory warunki prowadziły do całkowitego zahamowania aktywności polimerazy i wytrącania się osadu już na początkowym etapie inkubacji. Przeprowadzono zatem szereg próbnych reakcji, które miały wskazać element odpowiedzialny za te niepowodzenia. Oceniono, że główną przyczyną było wytrącanie się trudno rozpuszczalnego fosforanu amonowo-magnezowego (potocznie: struwit). Aby temu zapobiec przeprowadzono wymianę jonów amonowych znakowanego dinukleotydu na jony sodowe, poprzez liofilizację próbki z wodorowęglanem sodu. Użycie do IVT tak przygotowanych dinukleotydów zagwarantowało uzyskanie znakowanego RNA z wysoką wydajnością i o wysokim stopniu kapingu (wydajność: 1,37 – 1,40 μg/μl, 69 – 72% kapingu).

Próby zastosowania analogów kapu-0 wyznakowanego BHQ-2 i BHQ-3 zakończyły się jednak niepowodzeniem. Zmiany warunków reakcji (niższe stężenie kapu, niższe stężenie MgCl_2 , zmiana pH buforu, dodatek DMSO, zmiana stężeń polimerazy T7 RNA i NTPów) nie przyniosły żadnych pozytywnych rezultatów, a każda próba kończyła się wytrąceniem osadu na dnie probówki i całkowitym zahamowaniu reakcji. Te wielokrotne próby zmotywowały Autorkę pracy do przeprowadzenia posttranskrypcyjnego wprowadzania barwika do transkryptu za pomocą reakcji SPAAC, przy czym istniały pewne obawy, co do negatywnego wpływu dużego ugrupowania pochodnej cyklooktynu, które bierze udział w reakcji, na interakcję sonda-enzym dekapujący. Podjęcie tej próby wiązało się z wykorzystaniem sfunkcjonalizowanego azydkiem analogu kapu-0, jako startera reakcji IVT. Ugrupowanie azydkowe miało minimalny wpływ na właściwości fizyczne i chemiczne kapu. Podobny inicjator w postaci dinukleotydu (N_3 -ARCA) został opracowany i opisany w roku 2017 przez członków naszego zespołu badawczego.²⁹² Już wtedy zauważono jego liczne zalety, wynikające z małego rozmiaru ugrupowania, jego obojętnego ładunku i polarności tak zbudowanego linkera. Reakcja IVT z udziałem N_3 -m⁷GpppApG przebiegała z wysoką wydajnością (1,43 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i prowadziła do uzyskania niemal wyłącznie kapowanego RNA. Tą samą strategię zastosowano dla analogów kapu w postaci N_3 -NAc-GlcppUpG (Rysunek 55A) oraz NRpp-glN₃-pApG (D1/D2) (Rysunek 55C). Podczas optymalizacji reakcji IVT wprowadzono jedynie drobne modyfikacje, co pozwoliło na uzyskanie kapowanych transkryptów z zadowalającą wydajnością zarówno w kontekście samej reakcji (1,82 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dla N_3 -NAc-GlcppUpG-RNA₃₅, 1,02 i 0,98 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dla NRpp-glN₃-pApG (D1/D2)), jak i procesu kapingu (odpowiednio: 95%, 86% i 84%).

Każdy z otrzymanych transkryptów bezpośrednio po reakcji transkrypcji został oczyszczony na zestawie Monarch® RNA Cleanup Kit a następnie za pomocą RP-HPLC. Zastosowanie warunków denaturujących, a więc podwyższonej temperatury (50 – 60°C) do inkubacji kolumny podczas analizy chromatograficznej oraz acetonitryl obecny w fazie ruchomej, zapewniły dobrą separację sygnałów pochodzących od poszczególnych związków. Detekcję przeprowadzano za pomocą detektora DAD umożliwiającego monitorowanie sygnału przy długościach fali odpowiadających zarówno absorpcji zasad azotowych (ok. 254 nm), jak i odpowiednich barwników. Różnice w mobilności związków znakowanych i nieznakowanych pozwalały na skuteczne uzyskanie czystych frakcji RNA (Rysunek 59). Każdorazowo też wynik oczyszczania RNA weryfikowano za pomocą elektroforezy żelowej.

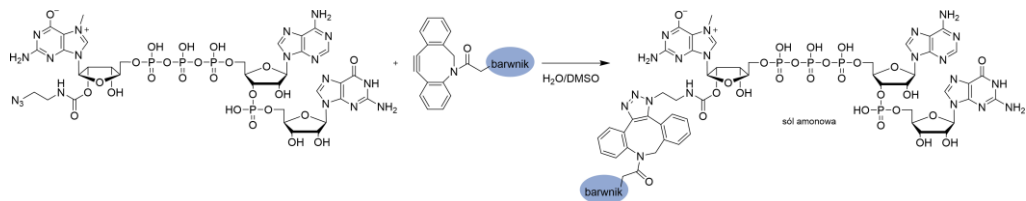


Rysunek 59 Chromatogramy uzyskane w wyniku oczyszczania N₃-NAC-GlcppUpG-RNA₃₅ (A) oraz sCy5-DBCO-NAC-GlcppUpG-RNA₃₅ (B) za pomocą RP-HPLC. Każdorazowo oczyszczanie prowadzono na kolumnie Phenomenex, Clarity Oligo RP (150 mm x 4,6 mm, 3 μm), T = 60°C, w liniowym gradiencie stężeń buforu (50% Buforu B w 30 minut), Bufor A: 100 mM octan trietyloaminy, pH 7, Bufor B: 200 mM octan trietyloaminy, pH 7/ACN, 1/1, v/v), przepływ 1 ml/min.

8.4 Znakowanie posttranskrypcyjne końca 5' RNA

Znakowanie posttranskrypcyjne RNA za pomocą reakcji SPAAC wykonano w dwóch wariantach: jako samodzielną reakcję prowadzącą do przyłączenia barwnika do końca 5' RNA (Rysunek 60) oraz w połączeniu z jednoczesnym znakowaniem końca 3', stosując do tego tzw. strategię PORA, co dokładnie omówiono w kolejnym podrozdziale (8.5). Pierwsza z wymienionych opcji doprowadziła do otrzymania z wysoką wydajnością następujących RNA: sCy5-DBCO-m⁷GpppApG-RNA₃₅ (60%), sCy3-DBCO-m⁷GpppApG-RNA₃₅ (58%), NRpp-gl-DBCO-sCy5-pApG-RNA₃₅ D1/D2 (43%/40%) oraz sCy5-DBCO-NAC-GlcppUpG-RNA₃₅ (47%). Reakcje były prowadzone w środowisku wodnym z dodatkiem DMSO, a jego objętość była uwarunkowana rozpuszczalnością barwnika w postaci pochodnej cyklooktynu. Dodatek DMSO nie mógł jednak stanowić więcej niż 50% objętości mieszaniny reakcyjnej, co było ograniczeniem wynikającym z rozpuszczalnością oligonukleotydu. Niezaprzeczną zaletą tak

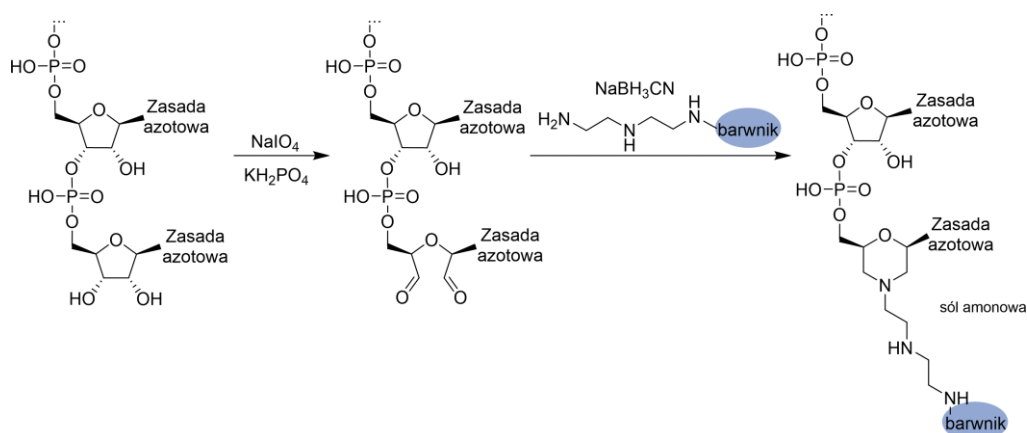
przewodzonej reakcji SPAAC była jej prostota i szybkość (około 2 – 3 h do całkowitej konwersji substratu w produkt), a co za tym idzie łatwość jej kontroli i optymalizacji. W toku badań ustalono, że najkorzystniejszym stosunkiem stężenia barwnika do znakowanego RNA jest 100-krotny nadmiar tego pierwszego, a sama reakcja prowadzi do najlepszych rezultatów, gdy stężenie RNA w mieszaninie reakcyjnej przekracza 10 μ M.



Rysunek 60 Schematyczne przedstawienie reakcji SPAAC pomiędzy kapem-0 sfunkcjonalizowanym linkerem azydowym i barwnikiem w postaci pochodnej cyklooktynu.

8.5 Znakowanie końca 3' RNA metodą chemiczną

Transkrypty znakowane wygaszaczami z serii BHQ otrzymano w wyniku reakcji jednoczesnego znakowania zarówno końca 5' jak i 3' (Rysunek 61). Jednoczesne przeprowadzenie reakcji SPAAC i PORA miało w założeniu uprościć proces znakowania, zwiększyć jego wydajność i przede wszystkim znacznie go przyspieszyć. Procedurę rozpoczyna inkubacja N₃-m⁷GpppApG-RNA₃₅ z wodnym roztworem nadjodanu sodu (NaIO₄), co prowadzi do rozszczepienia i utlenienia do dialdehydu ugrupowania *cis*-diolowego, zlokalizowanego na ostatniej rybozie w sekwencji RNA. W kolejnym kroku do mieszaniny reakcyjnej dodawane są pozostałe komponenty, niezbędne do przeprowadzenia reakcji SPAAC (BHQ-2/3-DBCO w DMSO) oraz PORA (Janelia Fluor 549/646-DETA, gdzie DETA oznacza dietylenotriaminę oraz roztwór cyjanoborowodoru sodu). Barwniki Janelia Fluor sfunkcjonalizowano korzystając z opisanego wcześniej protokołu,²⁴³ bazując na handlowo dostępnych wariantach w postaci estrów NHS. W reakcji podwójnego znakowania pełna konwersja do produktu następowała po maksymalnie 6 h. Produkty oczyszczono na zestawie Monarch® RNA Cleanup Kit a następnie za pomocą RP-HPLC. Analiza chromatogramów wykazała, że reakcja z BHQ-3 prowadziła do wielu ubocznych produktów, będących prawdopodobnie rezultatem degradacji substratów. Wynikiem tego była wydajność końcowa reakcji otrzymywania BHQ-3-DBCO-m⁷GpppApG-RNA₃₅-DETA-JF646 wynosząca jedynie 11%, podczas gdy BHQ-2-DBCO-m⁷GpppApG-RNA₃₅-DETA-JF549 uzyskano z 51% wydajnością (Tabela 2). Należy zaznaczyć, że warunki, w których przeprowadzane są reakcje PORA (stosunkowo wysokie stężenia NaIO₄ i NaBH₃CN oraz sześciogodzinna inkubacja w RT) mogą powodować zwiększone ryzyko degradacji transkryptów. Każda przeprowadzona w ten sposób synteza powinna być więc poprzedzona rzetelną analizą i optymalizacją tych warunków.



Rysunek 61 Schematyczne przedstawienie reakcji PORA pomiędzy RNA a barwnikiem sfunkcjonalizowanym za pomocą linkera aminowego.

Tabela 2 Wykaz dwuznakowanych sond zawierających w swojej strukturze parę wygaszacz-fluorofor.

L.p.	Sonda	Skrót
1.	BHQ-3-DBCO-m ⁷ GpppApG-RNA ₃₅ -DETA-JF646	B1
2.	BHQ-2-DBCO-m ⁷ GpppApG-RNA ₃₅ -DETA-JF549	B2

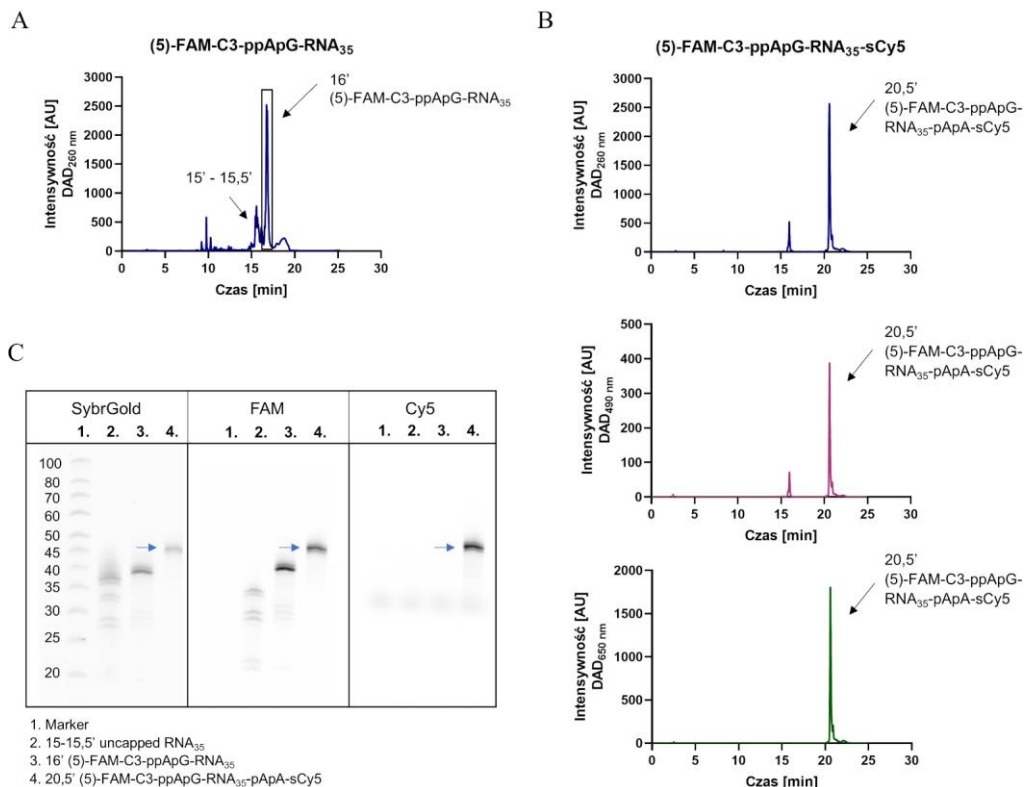
8.6 Znakowanie końca 3' RNA na drodze ligacji

Poza reakcją PORA opisaną w rozdziale 8.5 do wyznakowania końca 3' z powodzeniem zastosowano enzymatyczną reakcję ligacji, katalizowaną przez ligazę T4 RNA 1. Podejście to okazało się uniwersalne i niezwykle wydajne, niezależnie od rodzaju użytego barwnika, przyłączonego do 5'-monofosforanu dinukleotydu. Samo przygotowanie znakowanych dinukleotydów opierało się na 2 etapach: funkcjonalizacji pApA linkerem etylenodiaminowym (EDA), stosując do tego reakcję PORA oraz przyłączeniu odpowiedniego barwnika w postaci estru NHS do I-rzędowej aminy w linkerze, analogicznie do zaprezentowanego w rozdziale 8.2 dotyczącym znakowania starterów transkrypcyjnych. Stosunkowo wysoka stabilność krótkich transkryptów RNA pozwalała na prowadzenie całonocnej reakcji, bez strat spowodowanych degradacją RNA. Reakcję testowano pod kątem różnych temperatur (16°C, 20°C i 25°C), stężeń RNA będącego akceptorem (1 µM – 1 mM) oraz nadmiaru użytego 5'-monofosforanu dinukleotydu z dołączonym barwnikiem, stanowiącego donor (2-, 10-, 100-, 1000-krotny nadmiar). W kontekście doboru temperatur należało z jednej strony wziąć pod uwagę podaną przez producenta, optymalną temperaturę aktywności enzymu (25°C), z drugiej natomiast zapewnić warunki gwarantujące stabilność RNA. Optymalizacja doprowadziła do ustalenia najkorzystniejszych parametrów reakcji, odpowiednich dla krótkich transkryptów o stosunkowo niewielkiej masie cząsteczkowej (20°C, 10 – 100 µM RNA oraz 100-krotny nadmiar donora). Wszystkie reakcje prowadzono w dostępnym handlowo (New England BioLabs) buforze Tris (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, pH 7,5), z dodatkiem 10% objętościowych DMSO, 120 U inhibitora RNazy RiboLock, 3,3 mM DTT, 1 mM ATP oraz 100 U Ligazy T4 RNA 1. Po 16 godzinach inkubacji reakcje kończono poprzez 2-krotne rozcieńczenie wodą MQ

a następnie oczyszczano je na zestawie Monarch® RNA Cleanup Kit. RNA izolowano i doczyszczano za pomocą RP-HPLC, stosując detekcję przy długościach fali odpowiadającej maksimum absorpcji dla odpowiedniego barwnika a następnie czystość potwierdzano za pomocą elektroforezy żelowej (Rysunek 62). Stosując opisaną powyżej strategię znakowania końca 3' RNA uzyskano serię 11 podwójnie znakowanych sond fluorescencyjnych, zestawionych poniżej (Tabela 3).

Tabela 3 Wykaz dwuznakowanych sond fluorescencyjnych zawierających w swojej strukturze pary FRET.

L.p.	Sonda	Skrót
1.	Cy3-L2 _N -m ⁷ GpppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy5	A1
2.	sCy3-DBCO-m ⁷ GpppApG-RNA ₃₅ -pApA-Cy5	A2
3.	sCy3-DBCO-m ⁷ GpppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy5	A3
4.	sCy5-DBCO-m ⁷ GpppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy3	A4
5.	sCy5-L2 _N -GpppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy3	C1
6.	sCy5-DBCO-NAc-GlcppUpG-RNA ₃₅ -pApA-sCy3	D1
7.	sCy5-NRpppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy3 D1 izomer	E1
8.	sCy5-NRpppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy3 D2 izomer	E2
9.	sCy5-DBCO-NRpppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy3	E3
10.	(5)-FAM-C3-ppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy5	F1
11.	(6)-FAM-C3-ppApG-RNA ₃₅ -pApA-sCy5	F2

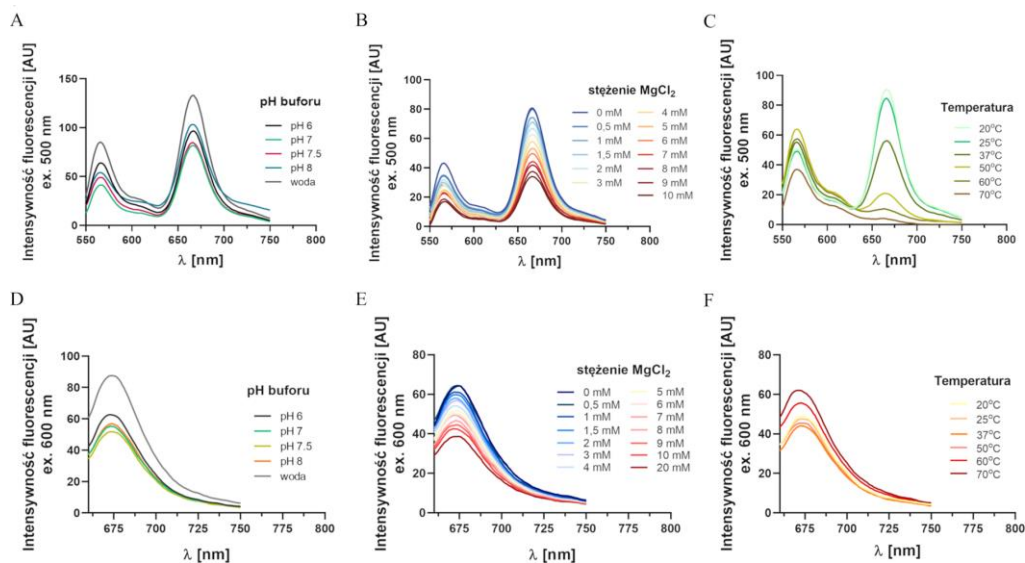


Rysunek 62 Oczyszczanie sond fluorescencyjnych za pomocą RP-HPLC. (A) Chromatogram uzyskany w wyniku oczyszczania znakowanej na końcu 5' sondy (5)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅. (B) Chromatogram uzyskany w wyniku oczyszczania podwójnie znakowanej sondy (5)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅-pApA-sCy5. Oczyszczanie prowadzono na kolumnie Phenomenex, Clarity Oligo RP (150 mm x 4,6 mm, 3 μ m), $T = 60^{\circ}\text{C}$, w liniowym gradiencie stężeń buforu (50% Buforu B w 30 minut), Bufor A: 100 mM octan trietyloaminy, pH 7, Bufor B: 200 mM octan trietyloaminy, pH 7/ACN, 1/1, v/v), przepływ 1 ml/min. Zanieczyszczenia widoczne przy czasie retencji <15 min odpowiadają krótszym (niż docelowe) sekwencjom nukleotydowym. (C) Analiza czystości zebranych frakcji na 15% żelu poliakrylamidowym. Żel zwizualizowano na urządzeniu Typhoon 2000, wykorzystując filtry dedykowane barwnikom FAM oraz Cy5 a następnie wybarwiając wszystkie RNA za pomocą barwnika SybrGold i wizualizując. Niebieskimi strzałkami zaznaczono prążki odpowiadające dwuznakowanej sondzie RNA.

9. Zastosowanie sond do monitorowania procesu dekapingu *in vitro*

Przed przystąpieniem do pomiarów z udziałem enzymów dekapujących należało zbadać wpływ czynników takich jak temperatura, pH oraz dodatki jonowe, na właściwości emisyjne sond. Wybór buforu, w którym miały być prowadzone pomiary sprowadzał się do testowania różnych wariantów buforu Tris-HCl oraz HEPES, różniących się pH, molalnością, siłą jonową czy rodzajem soli będących źródłem jonów. Ustalono, że użycie bardziej skomplikowanych układów o wysokiej molalności wpływa negatywnie na efektywność zwijania się RNA. Aby

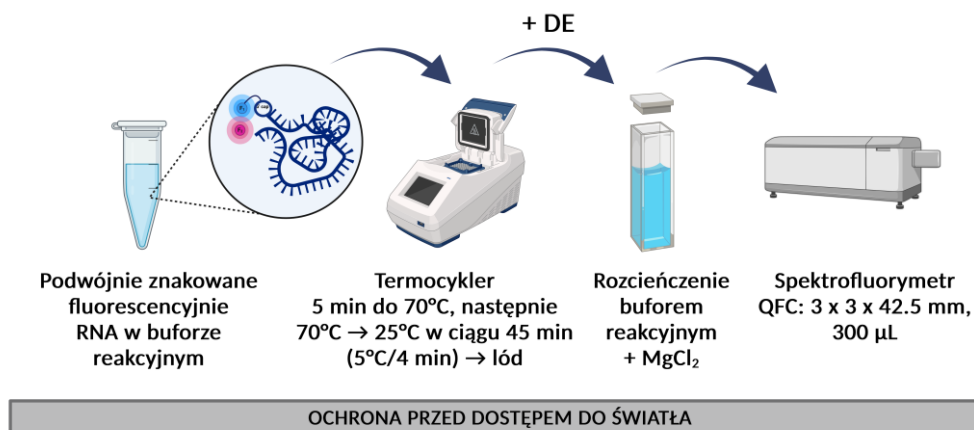
zapewnić optymalne warunki dla aktywności enzymów dekapujących, zdecydowano się na zastosowanie roztworu buforowego o pH 7,5. Zmiana tej wartości (w zakresie pH 6 – 8) nie miała bowiem istotnego wpływu na właściwości emisyjne sond (Rysunek 63A,D). Dodatkowo analizy wykazały, że dodatek jonów magnezowych na etapie poprzedzającym zwijanie RNA inicjowane temperaturą, zaburza ten proces, w efekcie czego obserwowano jedynie znikomą fluorescencję pochodzącą od każdego z barwników osobno oraz marginalnie niski efekt FRET. Prawdopodobnie było to rezultatem współstrącania się sond z jonami magnezu, co zmniejszało efektywne stężenie znakowanego RNA w badanym roztworze. Dodatek jonów Mg^{2+} tuż przed pomiarem spektrofлуorymetrycznym znacznie niwelował ten problem, przy czym konsekwentne zwiększanie stężenia jonów wpływało na obniżenie intensywności fluorescencji barwników (Rysunek 63B, E). Istotnym parametrem w optymalizacji pomiarów FRET sond RNA była wartość temperatury podczas inkubacji z enzymem. Pod wpływem podwyższonej temperatury rozrywane są wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi oraz zaburzane są oddziaływania niekowalencyjne, które stabilizują II- i III-rzędową strukturę RNA. Dodatkowo wzrost temperatury układu implikuje wyższą energię kinetyczną cząsteczek, a co za tym idzie, wyższą entropię układu. Łańcuch RNA ulega linearyzacji, w wyniku czego zwiększa się dystans pomiędzy końcem 5' oraz 3', osłabiając tym samym efekt FRET (Rysunek 63C, F). Rezultatem końcowym optymalizacji warunków inkubacji sondy oraz pomiaru FRET był wybór buforu Tris-HCl (4 mM Tris-HCl pH 7,9, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, T = 20°C). Stężenie $MgCl_2$ było indywidualnie optymalizowane dla każdej pary sonda – enzym dekapujący i finalnie mieściło się w przedziale 1 – 5 mM. Istotną kwestią był również dobór odpowiedniej długości fali, przy której wzbudzano barwniki. W przypadku sond, których barwniki są niezależne od siebie, naturalnym wyborem byłyby długości fal odpowiadające maksimum wzbudzenia każdego ze znaczników. Gdy w grę wchodzi sondy z interaktywnymi względem siebie barwnikami (np. pary donor–akceptor, fluorofor–wygaszacz), należy uwzględnić ryzyko, że obserwowany wzrost FLINT akceptora może być wynikiem nie tylko efektywnego transferu energii ale i bezpośredniego wzbudzenia znacznika akceptorowego. Aby uniknąć nieprawidłowej interpretacji wyników należało przeanalizować widma absorpcji i wybrać długość fali wzbudzenia donora, przy której jego absorbanca jest wciąż wysoka, a absorbanca akceptora możliwie niska.



Rysunek 63 Charakterystyka podwójnie znakowanych sond fluorescencyjnych pod względem ich właściwości emisyjnych, fotostabilności i stabilności chemicznej na przykładzie sondy FRET A3 (sCy3/sCy5) oraz sondy fluorofor-wygaszacz B1 (BHQ-3/JF646): sonda A3 (A) pH buforu (B) stężenie $MgCl_2$ (C) temperatura; sonda B1 (D) pH buforu (E) stężenie $MgCl_2$ (F) temperatura. Pomiar, których wyniki przedstawiono w sekcji (A) i (D) wykonano w buforze 4 mM Tris-HCl pH 6-8, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, $T = 25^\circ C$, $C_{RNA} = 25$ nM, $C_{MgCl_2} = 0$ mM, przesłona – 10 mm; w sekcji (B) i (E): w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, $T = 25^\circ C$, $C_{RNA} = 25$ nM, $C_{MgCl_2} = 0-10$ mM, przesłona – 10 mm; w sekcji (C) i (F): w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, $T = 20-70^\circ C$, $C_{RNA} = 25$ nM, $C_{MgCl_2} = 0$ mM, przesłona – 10 mm.

Na każdym etapie analizy kluczowe było ograniczenie czasu ekspozycji próbek na światło, aby zminimalizować fotobłaknięcie sond fluorescencyjnych. Inicjowanie temperaturą związanie sond było prowadzone z pomocą termocyklera zgodnie z opracowanym protokołem: podgrzewanie do temperatury $70^\circ C$ (5 min), następnie powolne ochładzanie do $25^\circ C$ w tempie $5^\circ C/4$ min oraz dalsze chłodzenie na lodzie (5 min). Analizy intensywności fluorescencji wykonano za pomocą spektrofлуorymetru wyposażonego w termostat, stosując kwarcowe kuwety pomiarowe (Rysunek 64). Stężenia zarówno enzymów jak i sond były indywidualnie dobierane, każdorazowo zachowując warunki *multiple turnover*.

Strategia przebiegu analizy procesu dekapingu

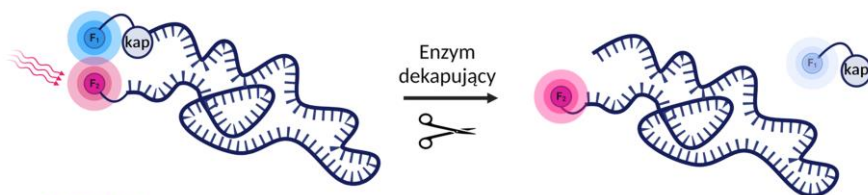


Rysunek 64 Strategia przebiegu analizy enzymatycznego dekapingu RNA z zastosowaniem dwuznakowanych sond fluorescencyjnych. Sonda rozpuszczona w buforze reakcyjnym była poddawana termicznej obróbce, celem uzyskania poprawnie zwiniętej formy RNA. Próbkę następnie rozcieńczono buforem, dodano jony Mg²⁺ oraz odpowiedni DE. Pomiar zmian intensywności fluorescencji dokonywano za pomocą spektrofluorymetru, a wszystkie etapy przygotowania próbki oraz pomiar prowadzono w warunkach o ograniczonym dostępie do światła.

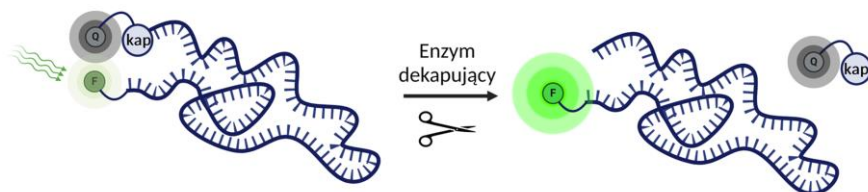
9.1 Monitorowanie aktywności Dcp2

Wizualizacja procesu dekapingu prowadzonego przez enzym hDcp2/Dcp1 była zrealizowana przy wykorzystaniu sond, których budowa opierała się na strukturze kapu-0. Badania w pierwszej fazie niniejszego projektu ujawniły, że jest to kap, wobec którego ludzki kompleks dekapujący wykazuje najwyższą specyficzność. Przygotowano cztery różne sondy (A1 – A4) zawierające kap-0 oraz komplementarne względem siebie barwniki cyjaninowe (Rysunek 65C). Ze względu na ograniczenia syntetyczne wynikające z metodyki inkorporacji barwników do nici RNA, zdecydowano się na wykorzystanie jedynie jednej sondy znakowanej kotranskrypcyjnie na końcu 5' (A1), podczas gdy pozostałe warianty znakowano posttranskrypcyjnie korzystając z reakcji *click* (SPAAC). Sondy A1 – A4 różniły się też umiejscowieniem donora i akceptora (koniec 5' lub 3') w łańcuchu RNA. Optymalizacja pomiarów na spektrofluorymetrze wskazała, że najkorzystniejsze stężenia składników wynoszą: 60 nM dla RNA, 10 nM dla enzymu oraz 1 mM dla MgCl₂. Widma fluorescencyjne w zakresie $\lambda = 520 - 800$ nm rejestrowano po wzbudzeniu donora wiązką o długości fali 500 nm, uzyskując maksimum emisji przy długości fali równej 564 nm (donor: Cy3 lub sCy3) oraz 664 nm (akceptor: Cy5 lub sCy5). Enzym dodawano do roztworu po ustabilizowaniu widma, co trwało zazwyczaj 5 minut. Kontrolą stabilności sondy były analogiczne pomiary wykonane z katalitycznie nieaktywnym mutantem enzymu hDcp2/Dcp1 (E148Q).

A Donor-Akceptor



B Wygaszacz-Fluorofor



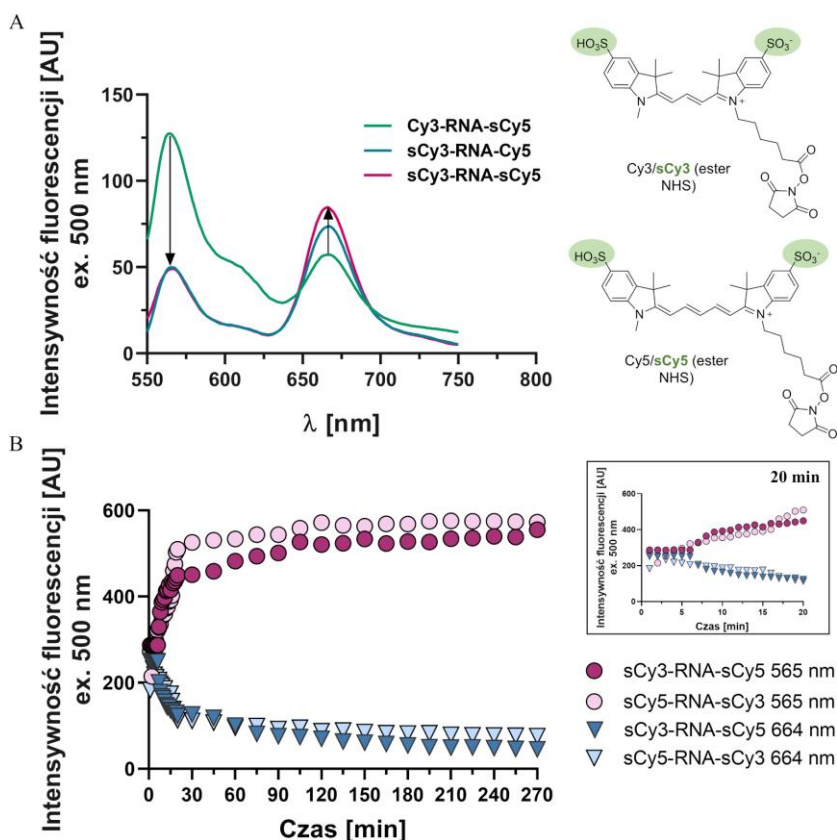
C

SONDA	A1	A2	A3	A4	B1	B2	C1	D1	E1	E2	E3	F1	F2
Analog kapu	m ⁷ GpppApG (kap-0)						GpppApG	NAC-GlcppUpG	NRpppApG			ppApG	ppApG
Mechanizm	FRET				Wygaszanie		FRET						
Znacznik 5'	Cy3	sCy3	sCy3	sCy5	BHQ-3	BHQ-2	sCy5	sCy5	sCy5 (p)	sCy5 (p)	sCy5 (c)	(5)-FAM	(6)-FAM
Znacznik 3'	sCy5	Cy5	sCy5	sCy3	JF646	JF549	sCy3	sCy3	sCy3	sCy3	sCy3	sCy5	sCy5
Ex. [nm]	500	500	500	500	620	540	500	500	500	500	500	485	485
Em. [nm]	520-800	520-800	520-800	520-800	640-800	550-700	520-800	520-800	520-800	520-800	520-800	500-750	500-750

Rysunek 65 Mechanizmy zastosowane do wizualizacji procesu dekapingu RNA. Sondy fluorescencyjne zawierały parę wygaszacz (Q) – fluorofor (F) bądź donor (F₂) – akceptor (F₁), zlokalizowane na obu końcach transkryptu, celem umożliwienia monitorowania procesu dekapingu poprzez rejestrowanie zmian intensywności fluorescencji wynikających z efektu FRET. (A) Wzbudzenie donora długością fali odpowiadającą maksimum jego absorpcji, generuje emisję fluorescencji akceptora, kosztem własnej fluorescencji, gdy oba barwniki znajdują się w odległości mniejszej niż 10 nm. Podczas enzymatycznej hydrolizy zachodzącej w mostku 5', 5'-trifosforanowym, fragment analogu kapu wraz z odpowiednim barwnikiem oddysocjowuje, przez co zwiększa się dystans między parą FRET. (B) Wygaszacz znajdujący się na jednym z końców sondy odpowiada za tłumienie fluorescencji własnej F. W wyniku zachodzącej hydrolizy kapu, następuje separacja obu barwników, przywracając tym samym zdolność F do emisji fluorescencji. (C) Zestawienie 13 podwójnie znakowanych fluorescencyjnie sond RNA, przygotowanych w ramach niniejszej pracy, wraz z ich oznaczeniami i najważniejszymi informacjami dotyczącymi ich budowy.

W wyniku hydrolizy enzymatycznej mostka 5',5'-trifosforanowego, struktura kapu-0 z dołączonym barwnikiem zostaje oddzielona od reszty łańcucha RNA, co prowadzi do zwiększenia dystansu między donorem a akceptorem (Rysunek 65A). Oczekiwany efektem takiego procesu jest zmniejszenie efektywności FRET, co manifestuje się na widmie wzrostem intensywności fluorescencji przy $\lambda_{\text{max}} = 564$ nm (emisja donora), przy jednoczesnym obniżeniu intensywności fluorescencji przy $\lambda_{\text{max}} = 664$ nm (emisja akceptora). Wyniki zgodne z założeniem otrzymano dla sond A2 – A4, co zaprezentowano na wykresach zamieszczonych w materiałach uzupełniających (Rysunek U. 2, Rysunek U. 3, Rysunek U. 4), z kolei w przypadku sondy A1 (Rysunek U. 1) obserwowano spadek FLINT przy obu długościach fali (Rysunek 66A). Na takie rezultaty w dużej mierze mogła mieć wpływ agregacja barwnika pod

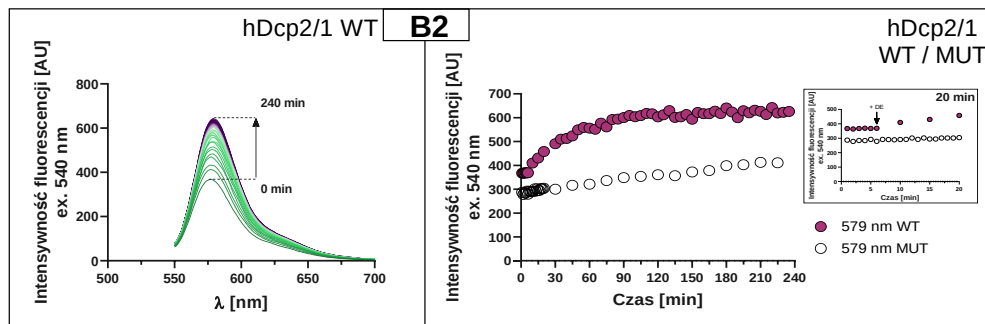
wpływem jonów Mg^{2+} , tuż po uwolnieniu struktury kapu. Tworzenie dimerów lub większych agregatów barwników cyjaninowych w zależności od warunków środowiskowych, jest dobrze udokumentowanym zjawiskiem, które prowadzi do wygaszania fluorescencji.²⁹³ W tym przypadku, niższa rozpuszczalność Cy3-RNA w porównaniu do wariantów zawierających grupy sulfonianowe dodatkowo sprzyja temu procesowi, a potwierdzenia można również szukać w nieznacznym przesunięciu maksimum emisji fluorescencji w kierunku krótszych fal. Wynik ten jest więc kombinacją rzeczywistego zdarzenia biologicznego w postaci hydrolizy kapu oraz fizykochemicznych właściwości barwnika w odpowiedzi na zmiany mikrośrodowiska. Z tego też powodu, mając na uwadze minimalizację ryzyka zakłóceń precyzji pomiarów zdecydowano, że dalsze analizy będą prowadzone wyłącznie z barwnikami w wariantach sulfonianowych. Porównanie sond A3 i A4, różniących się jedynie lokalizacją barwników na końcach 3' i 5' RNA, nie wykazało znaczących różnic w efektywności transferu energii ani w intensywności fluorescencji poszczególnych barwników. Wyniki sugerują, że nie ma istotnego wpływu na efektywność procesu i jego kinetykę, czy po degradacji struktury kapu przez DE oddyfunduje donor, czy akceptor. Obie sondy wykazały porównywalnie wysoką skuteczność w śledzeniu procesu dekapingu RNA przez enzym hDcp2/Dcp1 (ang. *wild type*, WT), co rejestrowano przez 270 minut, aż do ustabilizowania się poziomu intensywności fluorescencji donora oraz akceptora. (Rysunek 66B) Degradację enzymatyczną potwierdzono również wykonując analizę elektroforetyczną (15% PAGE) i wizualizując uzyskany żel (przykładowy żel uzyskany dla sondy A4 zaprezentowano w materiałach uzupełniających – Rysunek U. 5). Pomimo stosunkowo niskiej wydajności kwantowej (przy wysokich współczynnikach ekstynkcji) wolnych barwników cyjaninowych, okazują się one użyteczne jako znaczniki biocząsteczek takich jak RNA do monitorowania *in vitro* zachodzących z ich udziałem procesów.



Rysunek 66 (A) Porównanie właściwości emisyjnych dla sond zawierających pary FRET, w zależności od wariantu użytego znacznika. (B) Porównanie przebiegu reakcji dekapingu w czasie z udziałem sondy sCy3-RNA-sCy5 oraz sCy5-RNA-sCy3.

Sondy fluorescencyjne, których działanie opiera się o mechanizm wygaszania fluorescencji (Rysunek 65B) zaprojektowano tak, aby umożliwić detekcję wzrostu FLINT w odpowiedzi na działanie enzymu hDcp2/Dcp1. Obie uzyskane sondy (B1 i B2) zawierały strukturę kapu-0 na końcu 5' RNA, do której posttranskrypcyjnie dołączono wygaszacz z serii Black Hole Quencher (BHQ). W nienaruszonym stanie sondy te powinny wykazywać jedynie nieznaczny poziom fluorescencji (FLINT), wynikający z właściwości układu, warto jednak pamiętać, że mikrośrodowisko (dodatki jonowe, pH i temperatura) oraz inherentne właściwości barwników wpływają na wydajność procesu wygaszania fluorescencji. Podczas optymalizacji pomiarów na spektrofлуorymetrze ustalono, że najkorzystniejsze stężenia składników wynoszą 60 nM RNA, 10 nM enzymu i 1 mM MgCl₂. Widma fluorescencyjne sondy B1, wzbudzonej wiązką o długości fali 620 nm, rejestrowano w zakresie 640 – 800 nm, osiągając maksimum emisji dla JF646 przy 672 nm (Rysunek U. 6), podczas gdy sondę B2, wzbudzaną wiązką o długości fali 540 nm, monitorowano w zakresie 550 – 700 nm, z maksimum intensywności emisji dla JF549 przy 579 nm (Rysunek U. 7). Po upływie czasu, niezbędnego do stabilizacji widma (około 5 – 10 minut), wprowadzano enzym do roztworu. Kontrolę stabilności sondy przeprowadzono, wykonując analogiczne pomiary z wykorzystaniem katalitycznie nieaktywnego mutantu hDcp2/Dcp1 (E148Q). Zgodnie z oczekiwaniami w obu przypadkach, podczas 4-godzinnej rejestracji widm, zaobserwowano około 200% wzrost FLINT, świadczący

o oddyfundowaniu kapu z wygaszaczem, co jest jednoznaczne z enzymatycznym dekapowaniem RNA (Rysunek 67). Degradację enzymatyczną potwierdzono również wykonując analizę elektroforetyczną (15% PAGE) i wizualizując uzyskany żel (przykładowy żel uzyskany dla sondy B2 zaprezentowano w materiałach uzupełniających – Rysunek U. 8, natomiast dla sondy A4 – Rysunek U. 5).



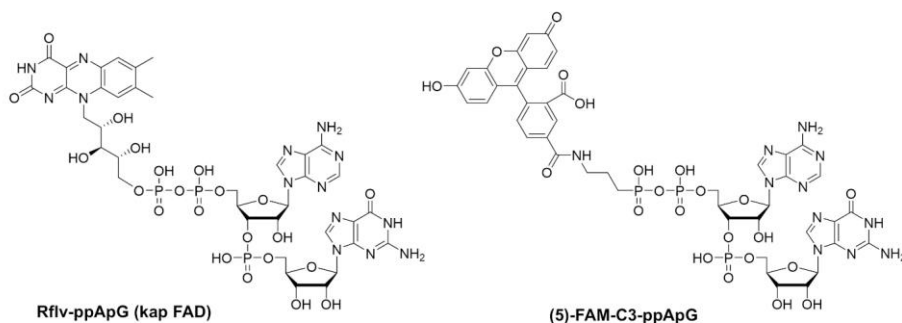
Rysunek 67 Zmiany intensywności fluorescencji sondy B2 w czasie, w wyniku aktywności enzymu hDcp2/Dcp1. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.

9.2 Monitorowanie aktywności DXO

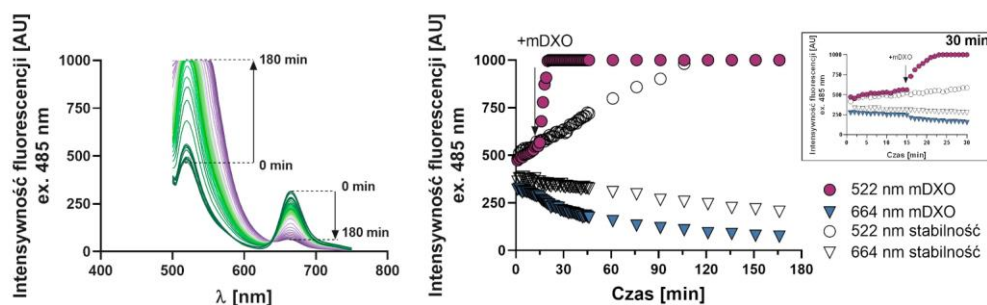
W ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto również próbę monitorowania procesu dekapingu katalizowanego przez enzym mDXO. W tym celu opracowano trzy sondy fluorescencyjne, zawierające w swojej strukturze analog niekanonicznego kapu NAD, który był preferowanym substratem dla tego enzymu. Każda z sond została zaprojektowana z barwnikiem sCy5 na końcu 5' oraz barwnikiem sCy3 na końcu 3', co w głównej mierze podyktowane było dostępnością reagentów. Ze względu na brak dostępności katalitycznie nieaktywnego wariantu enzymu mDXO, kontrolę stabilności sond w tych eksperymentach stanowiły próbki zawierające wyłącznie badaną sondę, bez dodatku enzymu. Już na etapie analiz zmierzających do ustalenia optymalnego stężenia poszczególnych składników mieszaniny pomiarowej zaobserwowano nietypowy przebieg wykresów zależności FLINT od czasu. W każdym przypadku (sonda E1, E2, E3) próbka badana wykazywała mniejsze lub porównywalne zmiany FLINT w zestawieniu z próbką kontrolną. W przypadku sondy E3 przeprowadzono analizę elektroforetyczną, mającą na celu ustalenie, czy enzym mDXO jest zdolny do katalizowania dekapingu tego RNA. Przypuszczano, że znaczne modyfikacje w strukturze kapu, takie jak przyłączenie stosunkowo dużej cząsteczki barwnika z linkerem zawierającym pochodną cyklooktynu, mogą wpływać negatywnie na rozpoznanie kapu przez enzym, uniemożliwiając związanie substratu w kieszeni wiążącej enzymu. Analiza żelu niespodziewanie ujawniła, że RNA ulega dekapowaniu, a bezpośrednio po tym następuje procesywna degradacja całej struktury, dzięki aktywności egzorybonukleolitycznej mDXO (Rysunek U. 17). Analizując przyczyny, które doprowadzają do pozornie wyższej stabilności sond po dodatku DE należałoby wziąć pod uwagę wpływ dodatków jonowych oraz opisywaną już wcześniej agregację barwników. Istnieje możliwość, że dodatnio naładowana struktura kapu NAD promuje wyższą stabilność RNA i uniemożliwia

oddyfundowanie barwnika po dekapingu. Chociaż sondy te prawdopodobnie nie są odpowiednie do zaprojektowanego testu FLINT, ich unikalna postać i konstrukcja może mieć istotny potencjał w badaniach degradacji RNA za pomocą alternatywnych metod. Biorąc pod uwagę, że mDXO wykazuje wysokie powinowactwo zarówno do kapu NAD, jak i FAD (Rysunek 46B), zmieniono strategię projektowania sond, przyjmując alternatywne podejście. Zważywszy na to, że szkielet główny kapu FAD wykazuje pewne podobieństwo do struktury fluoresceiny, enzym mDXO może potencjalnie rozpoznawać ten barwnik jako swój substrat. Aby to zweryfikować, podjęto próbę bezpośredniego przyłączenia analogu fluoresceiny do dinukleotydu ppApG (Rysunek 68A) i zaprojektowano sondy, które zawierały dwa izomery karboksyfluoresceiny (F1 – (5)-FAM oraz F2 – (6)-FAM), pełniące rolę akceptora FRET oraz sCy5, umieszczoną na końcu 3' RNA, pełniącą funkcję donora FRET. Optymalizacja wykazała, że do efektywnej degradacji RNA, zainicjowanej usunięciem struktury analogu kapu z końca 5' RNA, wystarczy 10 nM stężenie mDXO oraz 1 mM $MgCl_2$, przy zachowaniu 60 nM stężenia sondy (Rysunek 68B). Widmo fluorescencji rejestrowano w zakresie 500 nm – 750 nm, po wzbudzeniu donora wiązką o długości fali 485 nm i już po 3 godzinach od rozpoczęcia pomiarów zaobserwowano całkowity zanik emisji fluorescencji akceptora (Rysunek U. 18, Rysunek U. 19).

A



B

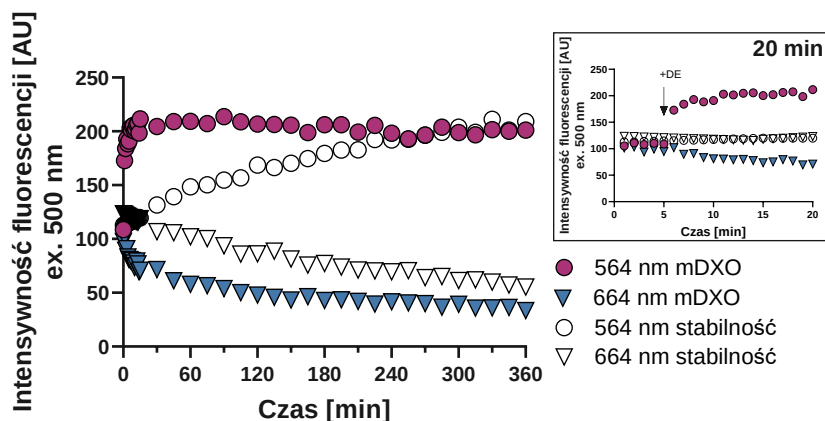


Rysunek 68 (A) Struktury chemiczne kapu FAD oraz dinukleotydu (5)-FAM-C3-ppApG, jako potencjalnych substratów enzymu mDXO. (B) Zmiany intensywności fluorescencji sondy F2 ((6)-FAM/sCy5) w czasie, w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$ w temperaturze 20°C.

Zachowanie enzymu mDXO monitorowano także w obecności niemetylowanego kapu Gppp-, który wykazuje jedynie znikome powinowactwo do tego enzymu. Sonda C1 (60 nM),

zawierająca cyjaninowe barwniki w wariantach sulfonowych, stanowiące parę FRET była inkubowana z 50 nM mDXO oraz 5 mM MgCl₂. Zarejestrowane widma fluorescencji wskazywały na stopniowy zanik efektu FRET w czasie, jednakże wykres zmian intensywności fluorescencji dla próbki badanej oraz kontroli pozbawionej DE był niemal identyczny, co uniemożliwia odpowiedź na pytanie czy nastąpiła degradacja RNA (Rysunek U. 9). Osłabienie efektu FRET wynika więc najprawdopodobniej z przyjmowania przez RNA alternatywnej konformacji przestrzennej, która prowadzi do zwiększenia odległości między końcem 5' a 3'.

Podczas wysokoprzepustowego profilowania substratowego DEs wykazano, że mDXO wykazuje umiarkowane powinowactwo do RNA zakończonego niekanoniczną strukturą kapu, będącą pochodną glukozy. W efekcie do monitorowania aktywności mDXO zastosowano sondę fluorescencyjną D1, zaprojektowaną na bazie struktury kapu GlcppUpG (Rysunek 55A) i zawierającą parę barwników FRET (sCy5/sCy3). Podobnie jak w przypadku sondy C1 (sCy5/sCy3), przygotowana do pomiaru próbka zawierała 60 nM sondy, 50 nM mDXO oraz 5 mM MgCl₂. Pomiar FLINT prowadzono przez 6 godzin, rejestrując widmo w zakresie 500 – 750 nm, po wzbudzeniu wiązką o długości fali 500 nm (Rysunek U. 10). Uzyskane wyniki wskazywały jednoznacznie na zajście enzymatycznego dekapingu RNA, w wyniku czego znacząco osłabiony został efekt FRET (Rysunek 69). Zaskakujący okazał się natomiast gwałtowny wzrost FLINT donora, który nastąpił bezpośrednio po dodaniu enzymu do próbki zawierającej sondę, mimo wcześniejszej stabilizacji widma fluorescencji. Taki efekt mógł być spowodowany zmianami konformacyjnymi RNA, które zaszły po dodaniu DE wraz z dodatkami jonowymi w postaci buforu, lub natychmiastowym zajściem reakcji enzymatycznej. Ta sama sonda, w analogicznych warunkach eksperymentalnych została poddana działaniu drożdżowego homologa Rai1. Analiza wykazała, że enzym ten nie prowadzi do degradacji sondy D1, co sugeruje, że ma odmienne preferencje substratowe i nie rozpoznaje kapu GlcppUpG w sposób podobny do enzymu mDXO (Rysunek U. 11). Najnowsze doniesienia literaturowe wskazywały, że inny enzym z rodziny Nudix – ludzki NUDT5 (hNUDT5) jest zaangażowany w degradację RNA zakończonego kapem UDP-Glc.²⁹⁴ Analiza elektroforetyczna potwierdziła, że enzym ten jest zdolny do degradacji UDP-Glc-RNA (Rysunek U. 13), niemniej jednak, żadne z testowanych warunków pomiarowych ani składów próbki nie umożliwiły skutecznej wizualizacji tego procesu przy użyciu sondy D1 i opracowanego testu FLINT (Rysunek U. 12).

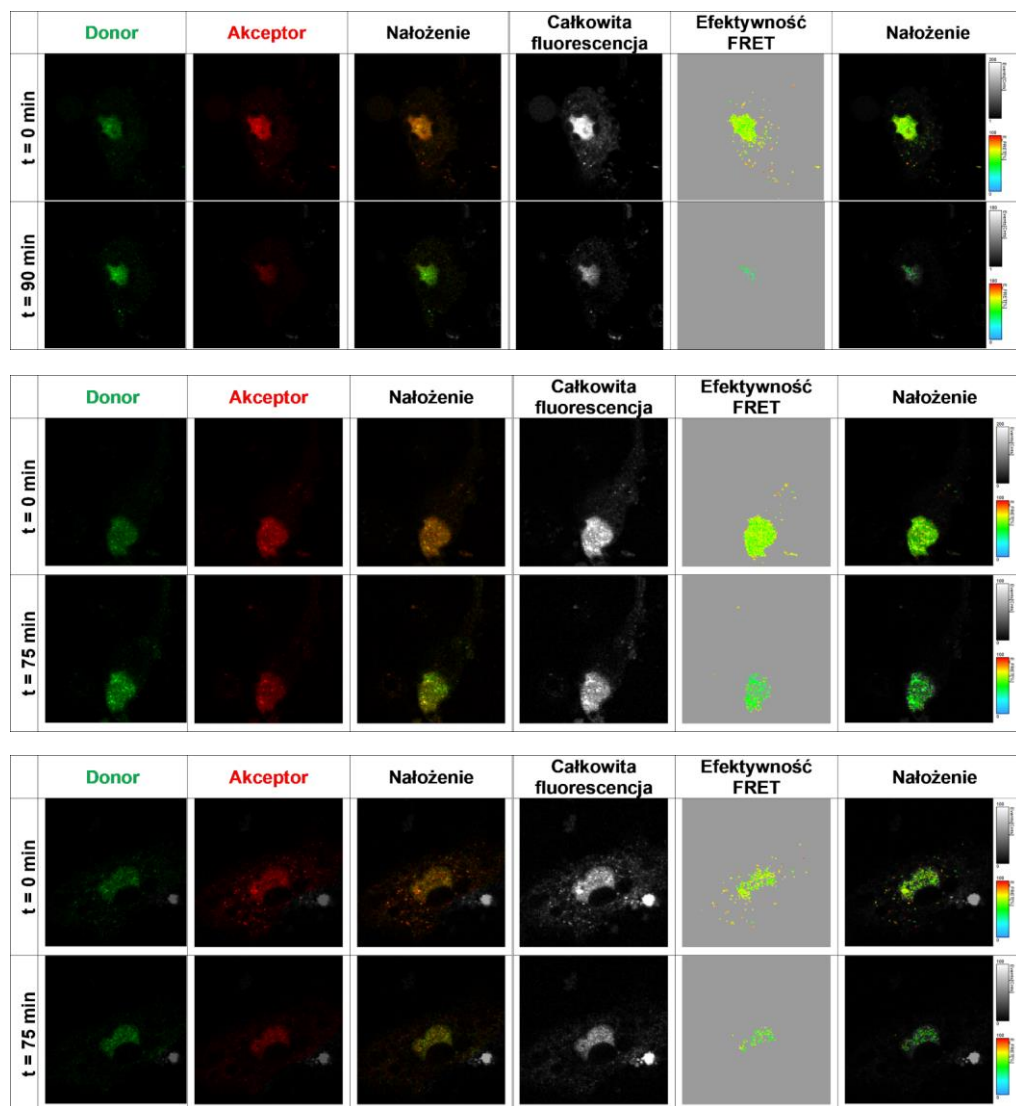


Rysunek 69 Zmiany intensywności fluorescencji sondy D1 w czasie, w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 1,2-krotnie wyższe od stężenia DE (50 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.

9.3 Bioobrazowanie

Skuteczność dwuznakowanych sond fluorescencyjnych w monitorowaniu dekapingu *in vitro* stała się impulsem do dalszych prac nad bardziej złożonymi układami biologicznymi. W ramach tych badań podjęto próbę zastosowania sond w komórkach, co stanowi kolejny krok w rozwijaniu zaawansowanych metod analizy procesów biologicznych związanych z degradacją RNA. Eksperymenty bioobrazowania komórkowego z udziałem dwuznakowanej sondy fluorescencyjnej zostały wykonane przez dr Karinę Kwapiszewską z Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk. Zgodnie z założeniem do eksperymentu wykorzystano sondę fluorescencyjną, zawierającą w swojej strukturze trinukleotydowy analog kapu-0 oraz barwniki stanowiące parę FRET (sCy5-sCy3). Przeprowadzana analiza opierała się na bezpośredniej mikroiniekcji sondy A4 do komórek HeLa (komórki raka szyjki macicy) i obserwowaniu zmian efektywności FRET w czasie. Obrazy zostały uzyskane przy użyciu mikroskopii konfokalnej i przy zastosowaniu detektorów SPAD z odpowiednimi filtrami, obsługiwanych za pomocą oprogramowania SymphoTime. Poziom fluorescencji został zarejestrowany zarówno dla kanału donorowego (Cy3), jak i akceptorowego (Cy5) a analizę FRET przeprowadzono przy użyciu modułu "FRET Image" oprogramowania Symphotime. Najpierw wybrano obszar zainteresowania (ROI) do analizy danych z pojedynczej komórki a następnie obliczono wydajność FRET dla danego zestawu pikseli. Procentowa wydajność FRET (E_{FRET}) została zaprezentowana na obrazach jako skala kolorów, natomiast skala szarości wskazuje ogólną intensywność fluorescencji w komórce (Rysunek 70). Zastosowanie techniki bezpośredniego wstrzyknięcia sondy do komórek ograniczyło straty związane z biodystrybucją RNA i pozwala na zastosowanie niższych stężeń próbki badanej niż w przypadku alternatywnego podejścia (np. nanocząstek lipidowych). Wyniki uzyskane w tym eksperymencie były spójne z danymi z testu FLINT. Obraz rejestrowany na kanale donora ukazuje wzrost intensywności fluorescencji w czasie, przy jednoczesnym jej spadku na kanale akceptora. Co więcej, wyraźne obniżenie wydajności FRET po 75 – 90 minutach jednoznacznie

potwierdza skuteczną hydrolizę kapu w badanej sondzie. Analiza ta umożliwia ocenę stabilności sondy w złożonym środowisku, którego skład nie ogranicza się tylko do jednego enzymu dekapującego. Takie podejście może stanowić podstawę do uzyskania precyzyjnych informacji o dynamice oddziaływań RNA-enzym dekapujący i możliwych interakcjach sondy z komponentami wewnątrzkomórkowymi, w warunkach bardziej zbliżonych do rzeczywistych procesów biologicznych. Przeprowadzone bioobrazowanie w komórkach HeLa wskazuje na potencjał zastosowania dwuznakowych sond fluorescencyjnych do obrazowania procesów związanych z metabolizmem RNA.



Rysunek 70 Mikroiniekcja sondy A4 do komórek HeLa. Obraz przedstawiający zmiany intensywności FRET śledzone na kanałach odpowiadających fluorescencji donora oraz akceptora. Zmiany efektywności FRET rejestrowano w czasie 75 oraz 90 minut od momentu wstrzyknięcia sondy do każdej z trzech zaprezentowanych komórek.

10. Podsumowanie

Dekaping RNA jest jednym z najważniejszych procesów komórkowych przyczyniających się do stabilności transkryptów, a tym samym do regulacji ekspresji genów. Proces ten polega na usuwaniu czapeczki z końca 5' RNA, co jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania wielu mechanizmów komórkowych, w tym kontroli jakości mRNA poddawanego translacji. Zaburzenia tego procesu zostały bezpośrednio powiązane z występowaniem licznych chorób genetycznych. Doniesienia literaturowe wskazują, że w różnych organizmach zidentyfikowano szereg niekanonicznych struktur 5' kapu, w tym analogi kofaktorów i metabolitów, takich jak NAD, FAD i UDP-glukoza. Stale rośnie również liczba prac, w który naukowcy prezentują nieznane dotąd funkcje niekodujących RNA, u których zidentyfikowano struktury kapu. Odkrycia te wymagają ponownej oceny specyficzności substratowej wielu białek, o których informowano, że wykazują aktywność dekapującą. Niestety, obecnie stosowane w tym celu metody są kosztowne i czasochłonne, co czyni je szczególnie nieefektywnymi w badaniach porównawczych.

W odpowiedzi na ten problem, opracowano oparty na strukturach aptamerowych test intensywności fluorescencji (FLINT), który umożliwia wysokoprzepustową ocenę specyficzności substratowej enzymów hydrolizujących kap. Przeprowadzono syntezę chemiczną siedmiu analogów struktury kapu w postaci di- oraz trinukleotydów, które w dalszym kroku stanowiły inicjatory enzymatycznej reakcji transkrypcji *in vitro*. Z powodzeniem zoptymalizowano zarówno etap inkorporacji struktur kapu do łańcucha RNA, jak i izolacji oraz oczyszczania transkryptów, tak aby zapewnić maksymalnie wysoki poziom kapingu i uzyskać homogenne próbki. Sondy zawierające sekwencję aptameru Broccoli wykorzystano następnie do opracowania testu FLINT, umożliwiającego szybką i efektywną ocenę zdolności enzymów dekapujących do rozpoznawania i degradacji transkryptów zawierających kanoniczne i niekanoniczne analogi struktury kapu. Zademonstrowano również przydatność sond Broccoli do ewaluacji i charakterystyki właściwości kinetycznych inhibitorów enzymów dekapujących. Przeprowadzono eksperyment statystyczny, który jednoznacznie potwierdził, że test FLINT spełnia wszystkie kryteria wysokoprzepustowych badań przesiewowych (HTS). To kompleksowe podejście umożliwiło precyzyjne profilowanie i bezpośrednie porównanie preferencji substratowych białek zaangażowanych w degradację RNA. Dodatkowym atutem testu jest jego potencjał do wykorzystania w złożonych układach biologicznych, co otwiera szereg nowych możliwości. Badania te znacząco wzbogacają naszą wiedzę o mechanizmach dekapingu RNA, wprowadzając do użytku efektywne i wygodne narzędzia do analizy stabilności transkryptów.

Wyniki uzyskane w pierwszym etapie badań stanowiły podstawę do opracowania fluorescencyjnych sond RNA, których budowa zapewniałaby selektywność wobec poszczególnych enzymów dekapujących. Praktycznym zastosowaniem dla takich sond jest monitorowanie przebiegu procesu hydrolizy enzymatycznej, najpierw w prostych układach biologicznych, a następnie stopniowo dostosowując je do złożonych systemów. Cel ten udało się pomyślnie zrealizować, przygotowując 13 sond działających w oparciu o rezonansowy transfer energii Förstera oraz mechanizm wygaszania fluorescencji. Dużym wyzwaniem okazało się przygotowanie takich wariantów, które mimo wprowadzonych modyfikacji nie wpływałyby na powinowactwo DE do RNA. Pomimo ciekawych i unikalnych struktur nie wszystkie z syntetyzowanych sond, znalazły zastosowanie w opracowanym teście

spektrofluorymetrycznym. W wyniku czasochłonnego procesu optymalizacji wyselekcjonowano jednak takie RNA, które pomyślnie przeszły wszystkie analizy i oceniono je jako skuteczne do wizualizacji aktywności DEs. Szczególnie obiecujące wydają się być sondy akceptowane przez enzym Dcp2: A3 (sCy3/sCy5) oraz A4 (sCy5/sCy3) oraz przez mDXO: F1 ((5)-FAM/sCy5) oraz F2 ((6)-FAM/sCy5). Przydatność modelowej sondy A4 ostatecznie potwierdzono, analizując jej aktywność w komórkach HeLa, za pomocą mikroskopii konfokalnej. Warto podkreślić, że chociaż niektóre z otrzymanych 5'-kapowanych RNA, nie spełniły wymagań koniecznych do zastosowania w teście FLINT (sondy E1-E3, sCy5/sCy3), ich potencjał badawczy nadal pozostaje wysoki. Struktury tych analogów kapu, pomimo początkowych ograniczeń, mogą znaleźć zastosowanie w innych badaniach, oferując nowe perspektywy w kontekście modyfikacji RNA i interakcji z białkami. Ponadto, proces ich syntezy stanowił nie tylko interesujące wyzwanie chemiczne, ale również poszerzył naszą wiedzę w dziedzinie syntezy chemoenzymatycznej kwasów nukleinowych, otwierając drogę do dalszych modyfikacji i udoskonaleń w przyszłych projektach badawczych.

Prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania przyczyniły się do opracowania narzędzi molekularnych, które mogą ułatwić wyjaśnienie skomplikowanych mechanizmów procesu dekapingu i degradacji RNA. Praca ta nie tylko wnosi istotny wkład w zrozumienie reguł rządzących stabilnością transkryptów, ale także otwiera nowe perspektywy dla badań nad regulacją aktywności enzymów i ekspresji genów. Zaproponowane rozwiązania, takie jak zastosowanie testu FLINT i dwuznakowanych sond fluorescencyjnych opartych na strukturze RNA, stanowią nowatorskie i zarazem bardzo proste podejście do analizy aktywności enzymów dekapujących oraz ich inhibitorów. Dzięki kompatybilności analiz z formatem mikropłytkowym, narzędzia te mają potencjał do znaczącego przyspieszenia badań przesiewowych, co może przyczynić się do odkrycia nowych regulatorów procesów komórkowych i terapeutycznych celów w leczeniu chorób związanych z zaburzeniami procesu degradacji RNA. Otwiera to nowe możliwości badawcze i stanowi istotny krok naprzód w dziedzinie biologii komórki. W przyszłości, dalszy rozwój tych technologii może doprowadzić do wyjaśnienia nieznanych dotąd fundamentalnych mechanizmów komórkowych i opracowywania innowacyjnych podejść terapeutycznych.

11. Syntezy chemiczne analogów kapu

11.1 Spis skrótów odczynników chemicznych stosowanych w procedurach eksperymentalnych

ACN – acetonitryl

AMA – mieszanina 30% amoniaku i 40% metyloaminy w stosunku objętościowym 1/1

amino-PEG2-amina – 2,2'-(etylenodioksy) dietyloamina

BHQ-2/3 – Black Hole Quencher 2/3

CDI – 1,1'-karbonyldiimidazol

Cy3/Cy5 – cyjanina 3/5

DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undeken

DCA – kwas dichlorooctowy

DCM – dichlorometan

DMF – *N,N*-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

DTDP – 2,2'-ditiodipirydyna

EDA – etylenodiamina

EDC – 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid

EDTA – wersenian disodu

Ester NHS – ester *N*-hydroksysukcynoimidu

EtOH – etanol

(5)/(6)-FAM – (5)/(6)-karboksylfluoresceina

FMN – 5'-monofosforan ryboflawiny

GlcP – glukoza-1-fosforan

H₂O MQ – ultraczysta woda

HMDA – heksametylenodiamina

JF549/646 – Janelia Fluor 549/646

MeOH – metanol

NAcGlcP – *N*-acetylglukozamino-1-fosforan

NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

PPh₃ – trifenylfosfina

sCy3/sCy5 – sulfocyjanina 3/5

TEA – trietyloamina

TEAB – bufor wodorowęglanu trietyloamoniowego

TSTU – tetrafluoroboran *N,N,N',N'*-tetrametylo-*O*-(*N*-sukcynimidylo)uroninowy

11.2 Odczynniki chemiczne i sprzęt laboratoryjny

Do przeprowadzenia syntez chemicznych wykorzystano odczynniki chemiczne zakupione w firmie Sigma Aldrich. Syntezy na fazie stałej były prowadzone przy użyciu gotowych, obsadzonych złóż z firmy Cytiva i amidoforsforinów nukleotydów dostarczonych przez firmę LinkTech. Substraty wyjściowe do syntezy analogów kapu, tj. guanozyna, 5'-difosforan guanozyny (GDP), 5'-monofosforan ryboflawiny (FMN), dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD), glukozo-1-fosforan (GlcP), *N*-acetylglukozamino-1-fosforan (NAcGlcP), zostały zakupione w Sigma Aldrich. Barwniki fluorescencyjne i wygaszacze fluorescencji pozyskano od następujących producentów: Tocris (Janelia Fluor 549, Janelia Fluor 646), Lumiprobe ((5)/(6)-FAM, Cy5/sCy3, Cy5/sCy5), Biosearch technologies (BHQ-2, BHQ-3). Wszystkie rozpuszczalniki organiczne, które zostały użyte w syntezach chemicznych prowadzonych w warunkach bezwodnych, tj. dimetylosulfotlenek (DMSO, Honeywell, HPLC grade), *N,N*-dimetyloformamid (DMF, bezwodny, Sigma-Aldrich) i acetonitryl (ACN, HPLC grade, J.T.Baker), zostały dodatkowo wysuszone na sitach molekularnych 4A. Pozostałe rozpuszczalniki: eter dietylowy (CHEMPUR, cz.d.a.), aceton (CHEMPUR, cz.d.a.), metanol (MeOH, HPLC grade, J.T. Baker), etanol (EtOH, CHEMPUR, cz.d.a.) i bezwodnik octowy (CHEMPUR, cz.d.a.) zostały użyte bez dodatkowego oczyszczania. Woda użyta w eksperymentach (H₂O MQ) była pozyskiwana z systemu Millipore Milli-Q i posiadała status ultraczystej.

Konwersję reakcji kontrolowano metodą HPLC na aparacie Agilent Tech Series 1200, zaopatrzonym w detektor DAD i analityczną kolumnę Gemini NX-C18 110Å LC (150 mm × 4,6 mm, 3 μm), przy przepływie wynoszącym 1 ml/min. Do analiz HPLC zastosowano liniowy gradient MeOH w 50 mM octanie amonu. Detekcję absorpcji przeprowadzano przy λ = 260 nm (referencja λ = 360 nm) lub w przypadku związków fluorescencyjnych, przy długości fali przypadającej na maksimum absorpcji fluoroforu. Finalne oczyszczanie produktów przeprowadzano na semi-preparatywnych kolumnach Gemini C18 110Å LC (150 mm × 10 mm, 5 μm) lub HiCHROM C18 150Å (150 mm × 10 mm, 5 μm), przy przepływie wynoszącym odpowiednio 5,0 ml/min i 4,7 ml/min. Do oczyszczania związków zastosowano liniowy gradient ACN w buforze octanowym. Dokładny skład buforów oraz stosowane metody przedstawiono poniżej.

Metoda	Bufor A	Bufor B	Gradient	Kolumna	Przepływ	Aparat
I	50 mM octan amonu, pH 5,9	MeOH/Bufor A, 1/1, v/v	50% Buforu B w 15 min	Gemini NX-C18 110Å LC (150 mm × 4,6 mm, 3 µm)	1,0 ml/min	Agilent Tech Series 1200
II	50 mM octan amonu, pH 5,9	MeOH/Bufor A, 1/1, v/v	100% Buforu B w 15 min	Gemini NX-C18 110Å LC (150 mm × 4,6 mm, 3 µm)	1,0 ml/min	Agilent Tech Series 1200
III	50 mM octan amonu, pH 5,9	ACN/Bufor A 7/3, v/v	50% Buforu B w 30 min	Gemini C18 110Å LC (150 mm × 10 mm, 5 µm)	5,0 ml/min	Agilent Tech Series 1260 Infinity
IV	50 mM octan amonu, pH 5,9	ACN/Bufor A 9/1, v/v	100% Buforu B w 30 min	Gemini C18 110Å LC (150 mm × 10 mm, 5 µm)	5,0 ml/min	Agilent Tech Series 1260 Infinity
V	50 mM octan amonu, pH 5,9	ACN/Bufor A 1/1, v/v	50% Buforu B w 30 min	HiCHROM C18 150Å (150 mm × 10 mm, 5 µm)	4,7 ml/min	Agilent Tech Series 1260 Infinity
VI	50 mM octan trietyloaminy pH 7,0/ACN, 1/1, v/v	ACN/Bufor A 9/1, v/v	100% Buforu B w 15 min	HiCHROM C18 150Å (150 mm × 10 mm, 5 µm)	4,7 ml/min	Agilent Tech Series 1260 Infinity

Złoże anionitowe DEAE Sephadex A-25 (forma HCO_3^-) zostało użyte do izolacji i wstępnego oczyszczania produktów za pomocą chromatografii preparatywnej jonowymiennej. Jako fazę ruchomą zastosowano bufor wodorowęglanu trietyloamoniowego (TEAB) w wodzie dejonizowanej w gradiencie liniowym: A: 0 do 0,7 M TEAB dla monofosforanów nukleozydów, B: 0 do 0,9 M TEAB dla difosforanu nukleozydu, C: 0 do 1,2 M TEAB dla trifosforanu dinukleozydu. Chromatografie każdorazowo przeprowadzano na aparacie Biotage Selekt System (detekcja absorpcji przy $\lambda = 260 \text{ nm}$) z dołączonymi przez producenta handlowo dostępnymi kolumnami.

Reakcje funkcjonalizacji difosforanów nukleozydów były przeprowadzane w reaktorze mikrofalowym CEM Discover, w dedykowanych probówkach. Zaimplementowana metoda zawierała następujące parametry reakcji: $P_{\text{max}} = 5 \text{ W}$, $T_{\text{max}} = 50^\circ\text{C}$, $\pm 1^\circ\text{C}$, czas reakcji: 20 minut.

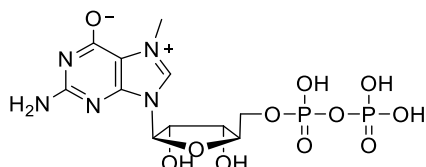
Syntezy dinukleotydów na podłożu stałym były prowadzone przy użyciu aparatu ÄKTA Oligopilot™ Plus 10 (GE Healthcare) oraz dedykowanej kolumny napełnianej złożem PrimerSupport™.

Widma spektrometrii mas o wysokiej rozdzielczości (HRMS) uzyskano przy użyciu spektrometru Micromass LCT z jonizacją elektrorozpylaniem i analizą czasu przelotu (ESI-TOF). Produkty pośrednie analizowano na spektrometrze Sciex QTRAP 3200, rejestrując niskorozdzielcze widma masowe w trybie jonów ujemnych lub dodatnich.

Zależnie od formy uzyskanego produktu, wydajności reakcji obliczano na podstawie uzyskanej masy próbki lub jednostek optycznych (mOD). Pomiary jednostek optycznych wykonywano rejestrując na spektrofotometrze Shimadzu UV-1800 widma związków w zakresie obejmującym długości fali $\lambda = 260$ nm. Wartości współczynników ekstynkcji $\epsilon_{260 \text{ nm}}$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$], dla poszczególnych pochodnych mononukleotydowych wynoszą odpowiednio: G – 12080, A – 15020, U – 9660, m^7G – 11400, NMN – 4200; dla kapu FAD – 49080, dla kapu NAD – 29480, dla kapu Glc β UpG – 19566; dla trinukleotydów: suma $\epsilon_{260 \text{ nm}}$ dla poszczególnych mononukleotydów $\times 0,9$. Analizowane związki każdorazowo rozpuszczano w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,0. Wyjątek stanowiły pochodne 7-metyloguanozyny, dla których widma rejestrowano w buforze o pH 6,0.

Substraty wyjściowe do syntezy analogów kapu (GDP, FMN, Glcp, NAcGlcp) zostały zakupione w postaci soli sodowych. Przed zastosowaniem ich do reakcji prowadzonych w rozpuszczalnikach organicznych, konieczna była wymiana soli sodowych na trietyloamoniowe. Handlową sól sodową GDP, ze względu na zanieczyszczenie 5'-monofosforanem guanozyny, nanoszono na kolumnę ze złożem DEAE Sephadex A-25 i przeprowadzano chromatografię jonowymienną według opisanej wyżej procedury, a następnie kilkakrotnie odparowano z dodatkiem EtOH i ACN pod zmniejszonym ciśnieniem. Zebrane frakcje zawierały GDP w postaci soli trietyloamoniowych i dodatkowo były wolne od zanieczyszczeń. Wymianę jonów sodowych na trietyloamoniowe w przypadku monofosforanów (FMN, Glcp i NAcGlcp) przeprowadzono poprzez ich kilkakrotne odparowywanie z dodatkiem buforu TEAB.

11.2.1 m^7GDP

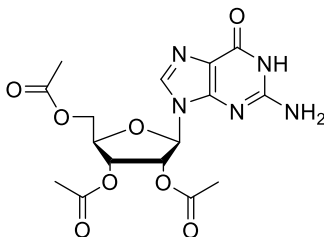


GDP w postaci soli trietyloamoniowej (0,055 mmol) rozpuszczono w DMSO (6,2 ml) a następnie dodano jodek metylu (CH_3I , 14 μl , 0,22 mmol). Reakcję prowadzono przez 4 h w RT. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie H_2O MQ (62 ml), a następnie 3-krotnie przemyto eterem dietylowym (3×20 ml). Do warstwy wodnej dodano szczyptę pirosiarczyny sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), celem redukcji jodu a pH doprowadzono do wartości 7,0 za pomocą wodnego roztworu NaHCO_3 . Frakcję wodną zatężono na wyparce obrotowej. Produkt wyizolowano i oczyszczono na kolumnie jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0,7 M), a następnie odparowano do sucha na wyparce obrotowej. Produkt otrzymano w postaci białego ciała stałego z 68% wydajnością reakcji.

MS ESI (-) obliczono m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_{11}\text{O}_2$: 457,0, znaleziono: 457,0.

11.2.2 m₃^{2,2,7}GDP

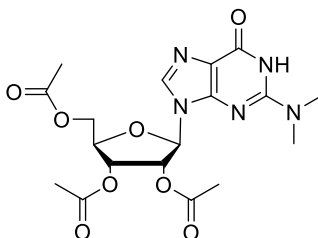
11.2.2.1 2',3',5'-tri-O-acetyloguanozyna (tri-O-Ac-G)



Guanozynę (8,8 mmol, 2,5 g) zawieszono w bezwodnym ACN (100 ml), a następnie dodano 4-dimetyloaminopirydynę (DMAP, 0,66 mmol, 81 mg) i TEA (4,9 ml). Zawartość kolby mieszano przez 5 minut na mieszadło magnetycznym w RT, a następnie dodano bezwodnik octowy (3,0 ml, 32 mmol). Reakcję prowadzono przy ciągłym mieszaniu przez 50 minut w RT w zamkniętej kolbie. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą RP-HPLC (Metoda I) i MS o niskiej rozdzielczości. Po tym czasie reakcję zakończono dodając do kolby 1,3 ml MeOH i mieszając jeszcze przez chwilę. Rozpuszczalniki odparowano do sucha na wyparce obrotowej, a następnie dodano zimny aceton (50 ml) i chłodzono przez 30 minut. W kolbie wytrącił się biały osad, który przefiltrowano na lejku Büchnera i przemyto dodatkową porcją zimnego acetonu (50 ml). Produkt wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt końcowy uzyskano w postaci białego proszku z 87% wydajnością reakcji.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₁₆H₁₈N₅O₈: 408,1, znaleziono: 408,1.

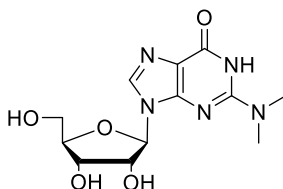
11.2.2.2 2',3',5'-tri-O-acetylo-2-N,2-N-dimetyloguanozyna (tri-O-Ac-m₂^{2,2}G)



Do roztworu acetylowanej guanozyny (5,0 g, 12 mmol) w 99,9% CH₃COOH (150 ml) dodano paraformaldehyd (1,1 g, 37 mmol) i mieszano przez 3 h w 45°C. Po tym czasie dodano NaBH₃CN (2,3 g, 37 mmol) i ponownie mieszano przez 3 h w 45°C. Sekwencję dodawania paraformaldehydu i NaBH₃CN w odstępach 3 h powtórzono jeszcze dwa razy. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) oraz rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości. Rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej, a osad zawieszono w mieszaninie DCM/pirydyna (16 ml, 1/1, v/v). Roztwór przemywano 3-krotnie nasyconym NaHCO₃ (3×16 ml), a warstwy wodne ekstrahowano roztworem DCM/pirydyna (16 ml, 2/1, v/v). Warstwę organiczną zebrano i wysuszono nad Na₂SO₄, a następnie przefiltrowano i odparowano z dodatkiem toluenu na wyparce obrotowej, aż do usunięcia pozostałości pirydyny. Produkt otrzymano jako białoszare ciało stałe z wydajnością 66%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₁₈H₂₂N₅O₈: 436,1, znaleziono: 436,1

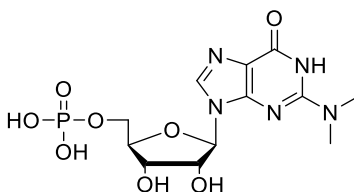
11.2.2.3 2-*N*,2-*N*-dimetyloguanozyna ($m_2^{2,2}G$)



Zabezpieczoną dimetyloguanozynę (2,5 g, 6,3 mmol) rozpuszczono w roztworze H₂O/MeOH (25 ml, 1/1, v/v) i ogrzano do 71°C. Po osiągnięciu tej temperatury dodano TEA (5,6 ml, 40 mmol) i całą mieszaninę mieszano przez kolejne 4 h. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą RP-HPLC (Metoda I) i MS o niskiej rozdzielczości. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie wysuszono w eksyktorze. Produkt otrzymano jako białe ciało stałe z 87% wydajnością.

MS ESI (+) obliczono m/z $[M+H]^+$ C₁₂H₁₈N₅O₅⁺: 312,1, znaleziono: 312,2

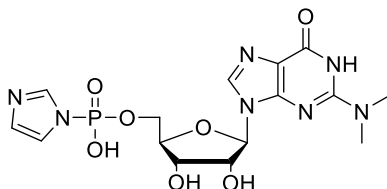
11.2.2.4 5'-monofosforan 2-*N*,2-*N*-dimetyloguanozyny ($m_2^{2,2}GMP$)



Odbezpieczoną 2-*N*,2-*N*-dimetyloguanozynę (0,65 g, 2,1 mmol) zawieszono w fosforanie trimetylu (PO(OCH₃)₃, 4,4 ml, 38 mmol), następnie dodano świeżo destylowany chlorek fosforylu (POCl₃, 0,58 ml, 6,3 mmol) i kolbę szczelnie zamknięto septą. Zawartość kolby mieszano przez 2 h na lodzie, a przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) oraz rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono dodając 45 ml 0,6 M roztworu TEAB. Związek oczyszczono na kolumnie jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) stosując liniowy gradient buforu TEAB (0 – 0,7 M). Po odparowaniu buforu osad wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano białe ciało stałe z wydajnością 41%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₁₂H₁₇N₅O₈P⁻: 390,1, znaleziono: 390,1

11.2.2.5 *P*-imidazolid 2-*N*,2-*N*-dimetyloguanozyny 5'-monofosforanu ($m_2^{2,2}GMP-Im$)

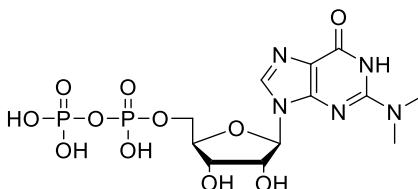


Sól trietyloamoniową 5'-monofosforanu 2-*N*,2-*N*-dimetyloguanozyny (2,31 mmol), imidazol (1,6 g, 23 mmol) i DTDP (1,6 g, 6,9 mmol) zawieszono w bezwodnym DMF (7,0 ml). Następnie dodano TEA (6,9 mmol, 0,97 ml) oraz PPh₃ (1,8 g, 6,9 mmol) i mieszano przez 3 h

w RT. Po tym czasie reakcję zakończono dodając roztwór LiClO_4 (0,74 g, 6,9 mmol) w zimnym ACN (70 ml). Po schłodzeniu mieszaniny przez 1 h w 4°C , osad 3-krotnie odwirowano, przemywając za każdym razem nową porcją ACN, aż do uzyskania bezbarwnego roztworu nad osadem. Produkt końcowy wysuszone pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując jasnoszare ciało stałe z 93% wydajnością. Jakość produktu zweryfikowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) oraz rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}^-$: 440,1, znaleziono: 440,0

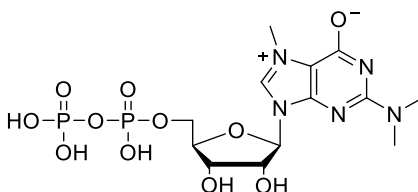
11.2.2.6 5'-difosforan 2-N,2-N-dimetyloguanozyny ($m_2^{2,2}\text{GDP}$)



Zaktywowany monofosforan 2-N,2-N-dimetyloguanozyny (2,2 mmol) zawieszono w DMF (25 ml), a następnie dodano fosforan trietyloamoniowy (3,7 g, 9,2 mmol) i mieszano do rozpuszczenia substratów. Następnie dodano ZnCl_2 (5,0 g, 37 mmol) i energicznie mieszano w RT przez 3 h. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) i MS o niskiej rozdzielczości. Po 3 h reakcję zakończono dodając wodny roztwór (250 ml) EDTA (14 g, 37 mmol) i NaHCO_3 (6,9 g, 82 mmol) w celu doprowadzenia do pH 7,0. Produkt oczyszczono na kolumnie jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0,9 M), a następnie odparowano do sucha z dodatkiem EtOH. Produkt otrzymano w postaci białego proszku z 34% wydajnością.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2^-$: 470,0, znaleziono: 470,1

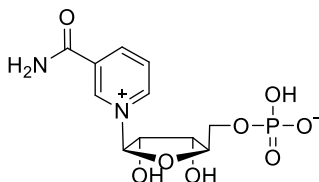
11.2.2.7 5'-difosforan 2-N,2-N,7-N-trimetyloguanozyny ($m_3^{2,2,7}\text{GDP}$)



5'-difosforan 2-N,2-N-dimetyloguanozyny w postaci soli trietyloamoniowej (0,74 mmol) rozpuszczono w H_2O MQ (7,2 ml). Za pomocą lodowatego CH_3COOH roztwór doprowadzono do pH 4,0, po czym mieszano jeszcze przez 1 h w RT. Następnie w 10 równych porcjach co 5 minut dodawano $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ (0,72 μl , 7,6 μmol), cały czas energicznie mieszając. Roztwór 1 M NaOH użyto do utrzymania pH 4,0. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) i MS o niskiej rozdzielczości. Po 2,5 h nastąpiła pełna konwersja a mieszaninę 3-krotnie ekstrahowano DCM aby wyizolować produkt. Warstwę wodną zebrano i zatężono na wyparce obrotowej. Wyizolowany produkt oczyszczono na kolumnie jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0,9 M), a następnie odparowano do sucha. Produkt otrzymano w postaci białego proszku z 57% wydajnością.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $C_{13}H_{21}N_5O_{11}P_2$: 485,1, znaleziono: 485,0

11.2.3 Mononukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NMN)



Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy w postaci soli sodowej (NAD^+ , 0,44 mmol) rozpuszczono w wodzie (50 ml) i podgrzano do temperatury $50^\circ C$. Następnie małymi porcjami dodawano $ZrCl_4$ (0,51 g, 2,2 mmol) i mieszano przez 2 h. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I). Reakcję zakończono poprzez dodanie 24 ml 0,5 M Na_3PO_4 . Roztwór doprowadzono do pH 7,0 za pomocą 1 M $NaOH$ ($\sim 9,0$ ml), odwirowano powstały osad i zebrano supernatant. Osad przemyto trzykrotnie H_2O MQ. Połączony supernatant zatężono na wyparce obrotowej do jednej trzeciej jego początkowej objętości i oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 – 0,6 M). Produkt końcowy otrzymano w postaci białego proszku z 46% wydajnością reakcji.

MS ESI (+) obliczono m/z $[M+H]^+$ $C_{11}H_{16}N_2O_8P^+$: 335,1, znaleziono: 335,0

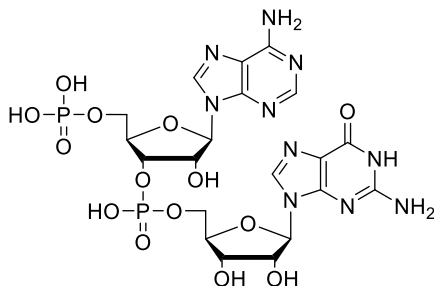
11.3 Synteza 5'-monofosforanów dinukleotydów na podłożu stałym

Procedura ogólna A:

Synteza 5'-monofosforanów dinukleotydów była prowadzona na aparacie ÄKTA Oligopilot™ Plus 10 z zastosowaniem chemii amidofosforynów. W dedykowanej do aparatu kolumnie umieszczono odpowiednie złożo polistyrenowe o wysokim stopniu obsadzenia, odpowiednio: Primer Support 5G Ribo G 300 lub Primer Support 5G Ribo A 300, a następnie wypełniono kolumnę bezwodnym ACN. Każda z reakcji była prowadzona w największej możliwej skali (50 μ mol), co uwarunkowane było parametrami kolumny i stopniem obsadzenia złoża. Roztwór BTT aktywatora w ACN (0,3 M), roztwór zabezpieczonego amidofosforynu nukleozydu (adenozyny, 2'-OMe-adenozyny lub urydyny, 0,2 M) w ACN (*etap 1*) oraz roztwór bis (cyjanoetylo)-N,N-diizopropylamidofosforynu (P -ite(CNE) $_2$ N,N-(iPr) $_2$, 0,2 M) w ACN (*etap 2*) były przez 15 minut recyrkulowane przez kolumnę. Detrytylację prowadzono przy użyciu roztworu kwasu dichlorooctowego w toluenie (DCA, 3%, v/v), natomiast utlenianie przeprowadzano przy użyciu roztworu jodu w pirydynie (50 mM). Do zabezpieczania grup funkcyjnych nieprzereagowanych w cyklu substratów wykorzystano roztwór N-metyloimidazolu w ACN (20%, v/v) oraz mieszaniny 40% (v/v) bezwodnika octowego i 40% (v/v) pirydyny w ACN. Przemywanie zawartości kolumny roztworem dietyloaminy w ACN (DEA, 20%, v/v) służyło usunięciu grup 2-cyjanoetylowych. Na ostatnim etapie podłoże stałe z dołączonym dinukleotydem było przepłukiwane ACN i suszone argonem, aż do uzyskania produktu w formie suchego i sypkiego ciała stałego. Zawartość kolumny przeniesiono do probówki typu falcon. Dinukleotyd odcięto od złoża, z jednoczesnym odbezpieczeniem zasad azotowych, inkubując go przez 2 h w temperaturze $45^\circ C$ z mieszaniną 30% amoniaku i 40%

metyloaminy (AMA, 1/1, v/v, 5 ml). Ziarna złoże usunięto stosując filtrację z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych. Złoże dodatkowo przemyto 50% EtOH, celem zmaksymalizowania wydajności syntezy. Zebrany roztwór zatężono na wyparce obrotowej, usuwając tym samym pozostałości roztworu AMA, następnie zliofilizowano i zawieszono w DMSO (100 μ l). Usuwanie grupy zabezpieczającej 2'-O-TBDMS prowadzone było poprzez dodanie do próbki z dinukleotydem trihydrofluorku trietyloaminy (TEA*3HF, 125 μ l) oraz TEA (150 μ l) i wytrząsanie mieszaniny przez 3 h w 65°C. Reakcję zakończono przez rozcieńczenie wodnym roztworem NaHCO₃, doprowadzając pH do 7,0. Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 0,9 M), a następnie oczyszczono przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda III). Przebieg poszczególnych etapów był kontrolowany za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II) i MS o niskiej rozdzielczości. Końcowy produkt syntezy (w postaci soli amonowej) poddano 3-krotnej liofilizacji, a jego strukturę potwierdzono za pomocą widm wysokorozdzielczej MS.

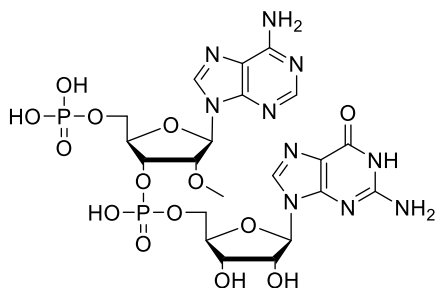
11.3.1 pApG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej A. W reakcji zastosowano złoże Primer Support 5G Ribo G 300 (162 mg, 50,0 μ mol), 200 mM roztwór amidofosforynu rybonukleozydu A-(Bz)-CE (143 mg, 145 μ mol) w bezwodnym ACN oraz 200 mM roztwór P-ite(CNE)₂N,N-(iPr)₂ (200 μ l, 0,765 mmol) w bezwodnym ACN. Etapy odbezpieczania, odcinania od złoże i oczyszczania przeprowadzono zgodnie z opisaną procedurą. W wyniku syntezy otrzymano pApG w postaci białego proszku z 71% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z [M-H]⁻ C₂₀H₂₅N₁₀O₁₄P₂⁻: 691,10324, znaleziono: 691,10381.

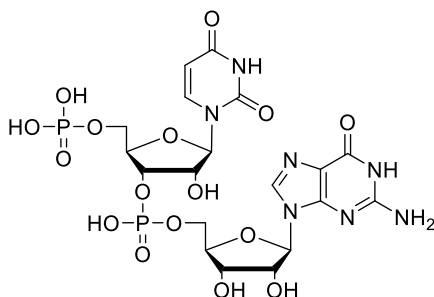
11.3.2 pAmpG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej A. W reakcji zastosowano złoże Primer Support 5G Ribo G 300 (162 mg, 50,0 μ mol), 200 mM roztwór amidofosforynu rybonukleozydu 2'-OMe-A-(Bz)-CE (129 mg, 145 μ mol) w bezwodnym ACN oraz 200 mM roztwór P-ite(CNE)₂N,N-(iPr)₂ (200 μ l, 0,765 mmol) w bezwodnym ACN. Etapy odbezpieczania, odcinania od złoża i oczyszczania przeprowadzono zgodnie z opisaną procedurą. W wyniku syntezy otrzymano pApG w postaci białego proszku z 70% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z [M-H]⁻ C₂₁H₂₇N₁₀O₁₄P₂⁻: 1007,14928, znaleziono: 1007,15076.

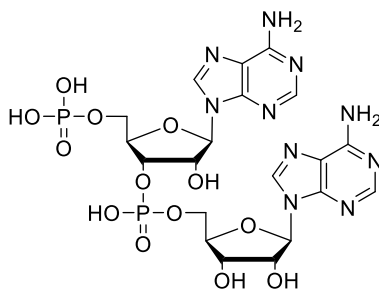
11.3.3 pUpG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej A. W reakcji zastosowano złoże Primer Support 5G Ribo G 300 (166 mg, 50,0 μ mol), 200 mM roztwór amidofosforynu rybonukleozydu U-(CE) (125 mg, 145 μ mol) w bezwodnym ACN oraz 200 mM roztwór P-ite(CNE)₂N,N-(iPr)₂ (200 μ l, 0,765 mmol) w bezwodnym ACN. Etapy odbezpieczania, odcinania od złoża i oczyszczania przeprowadzono zgodnie z opisaną procedurą. W wyniku syntezy otrzymano pUpG w postaci białego proszku z 64% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z [M-H]⁻ C₁₉H₂₄N₇O₁₆P₂⁻: 668,07602, znaleziono: 669,07628

11.3.4 pApA



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej A. W reakcji zastosowano złoże Primer Support 5G Ribo A 300 (162 mg, 50,0 μmol), 200 mM roztwór amidofosforynu rybonukleozydu A-(Bz)-CE (143 mg, 145 μmol) w bezwodnym ACN oraz 200 mM roztwór P-ite(CNE)₂N,N-(iPr)₂ (200 μl , 0,765 mmol) w bezwodnym ACN. Etapy odbezpieczania, odcinania od złoża i oczyszczania przeprowadzono zgodnie z opisaną procedurą. W wyniku syntezy otrzymano pApA w postaci białego proszku z 66% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ C₂₀H₂₅N₁₀O₁₃P₂: 675,10833, znaleziono: 675,10840.

11.4 Aktywacja

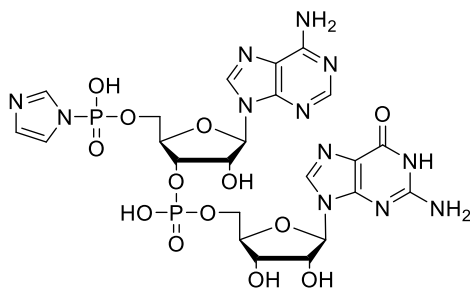
Procedura ogólna B:

Dinukleotyd w postaci soli amonowej (1 eq.), imidazol (16 eq.) i DTDP (6 eq.) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml na 50 μmol dinukleotydu). Następnie dodano TEA (6 eq.) oraz PPh₃ (6 eq.) i mieszano przez 2 h w RT. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) oraz rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości. Po tym czasie reakcję zakończono dodając roztwór NaClO₄ (6 eq.) w zimnym ACN (10 $\times$ objętość DMSO). Po schłodzeniu mieszaniny przez 1 h w 4°C, osad odwirowano a następnie 3-krotnie przemywano zimnym ACN, aż do uzyskania bezbarwnego supernatantu. Zaktywowany dinukleotyd w postaci soli sodowej suszono przez noc w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem. Strukturę uzyskanego produktu potwierdzono za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I).

Procedura ogólna C:

Mononukleotyd w postaci soli trietyloamoniowej (1 eq.), imidazol (10 eq.) i DTDP (3 eq.) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml na 100 μmol dinukleotydu). Następnie dodano TEA (3 eq.) oraz PPh₃ (3 eq.) i mieszano przez 2,5 h w RT. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) oraz rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości. Po tym czasie reakcję zakończono dodając roztwór LiClO₄ (3 eq.) w zimnym acetonie (10 $\times$ objętość DMSO). Po schłodzeniu mieszaniny przez 1 h w 4°C, osad odwirowano a następnie 3-krotnie przemywano zimnym acetonem, aż do uzyskania bezbarwnego supernatantu. Zaktywowany mononukleotyd w postaci soli sodowej suszono przez noc w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem. Strukturę uzyskanego produktu potwierdzono za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I).

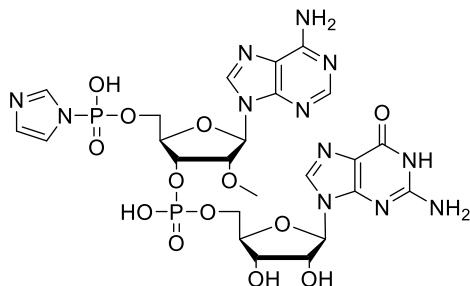
11.4.1 Im-pApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej B. pApG (38 μmol), imidazol (41,3 mg, 600 μmol) i DTDP (50,2 mg, 230 μmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (760 μl). Następnie dodano TEA (32,0 μl , 230 μmol) i PPh_3 (59,7 mg, 230 μmol) i mieszano przez 2 h w RT. Reakcję zakończono dodając roztwór NaClO_4 (27,9 mg, 230 μmol) w zimnym ACN (7,60 ml). Po schłodzeniu mieszaniny przez 1 h w 4°C, osad odwirowano i przemywano zimnym ACN. Produkt końcowy wysuszone pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując jasnożółty proszek z wydajnością 91%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{P}_2^-$: 741,1, znaleziono: 741,1

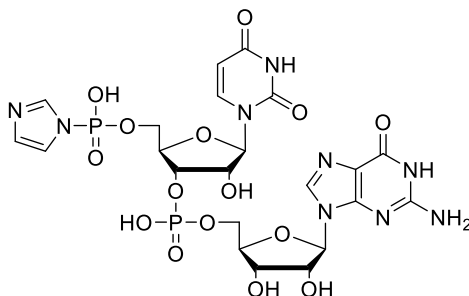
11.4.2 Im-pA_mpG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej B. pA_mpG (38 μmol), imidazol (41,3 mg, 600 μmol) i DTDP (50,2 mg, 230 μmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (760 μl). Następnie dodano TEA (32,0 μl , 230 μmol) i PPh_3 (59,7 mg, 230 μmol) i mieszano przez 2 h w RT. Reakcję zakończono dodając roztwór NaClO_4 (27,9 mg, 230 μmol) w zimnym ACN (7,60 ml). Po schłodzeniu mieszaniny przez 1 h w 4°C, osad odwirowano i przemywano zimnym ACN. Produkt końcowy wysuszone pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując jasnożółty proszek z wydajnością 90%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{P}_2^-$: 755,1, znaleziono: 755,1

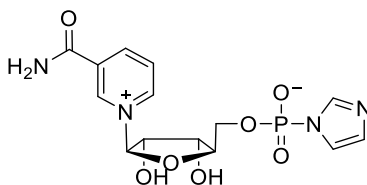
11.4.3 Im-pUpG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej B. pUpG (38 μmol), imidazol (41,3 mg, 600 μmol) i DTDP (50,2 mg, 230 μmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (760 μl). Następnie dodano TEA (32 μl , 230 μmol) i PPh_3 (59,7 mg, 230 μmol) i mieszano przez 2 h w RT. Reakcję zakończono dodając roztwór NaClO_4 (27,9 mg, 230 μmol) w zimnym ACN (7,60 ml). Po schłodzeniu mieszaniny przez 1 h w 4°C, osad odwirowano i przemywano zimnym ACN. Produkt końcowy wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując jasnożółty proszek z wydajnością 92%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{P}_2^-$: 718,1, znaleziono: 718,0

11.4.4 NMN-Im



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej C. NMN (50 μmol) zawieszono w DMSO (500 μl). Dodano imidazol (34,0 mg, 500 μmol), DTDP (33,0 mg, 150 μmol), TEA (21,0 μl , 150 μmol) i PPh_3 (369 mg, 150 μmol). Reakcję mieszano w RT przez 2,5 h, po czym za pomocą analizy RP-HPLC (Metoda I) i MS o niskiej rozdzielczości stwierdzono całkowitą konwersję substratu w produkt. Reakcję zakończono poprzez dodanie zimnego roztworu LiClO_4 w acetonie (5,00 ml). Po schłodzeniu mieszaniny przez 1 h w 4°C, osad odwirowano i przemywano zimnym acetonem. Produkt końcowy wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując szaro-żółty proszek z 70% wydajnością reakcji.

MS ESI (+) obliczono m/z $[M+H]^+$ $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}^+$: 385,1, znaleziono: 385,1

11.5 Reakcje sprzęgania do kapów

Procedura ogólna D:

Mononukleotyd w postaci soli trietyloamoniowej (1,0 eq.) i odpowiedni zaktywowany dinukleotyd w postaci soli sodowej (1,25 eq.) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml na 50 μmoli mononukleotydu) i dodano nadmiar bezwodnego ZnCl_2 (16 eq.). Mieszaninę

reakcyjną mieszano w RT przez 12-30 h. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II) i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem ($10\times$ objętość DMSO) EDTA (16 eq.) i NaHCO_3 (połowa masy EDTA). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 1,2 M), a następnie oczyszczono przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda V). Końcowy produkt syntezy (w postaci soli amonowej) poddano 3-krotnej liofilizacji, a jego czystość potwierdzono za pomocą analitycznego RP-HPLC.

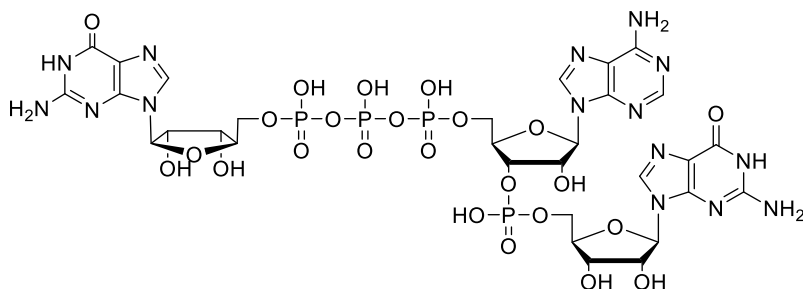
Procedura ogólna E:

Mononukleotyd w postaci soli trietyloamoniowej (1,0 eq.) i odpowiedni zaktywowany dinukleotyd w postaci soli sodowej (1,5 eq.) zawieszono w bezwodnym DMF lub DMSO (1,0 ml na 50 μmoli mononukleotydu) i dodano nadmiar bezwodnego MgCl_2 (8,0 eq.). Mieszaninę reakcyjną mieszano w RT przez 5-24 h. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I lub II) i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem ($10\times$ objętość DMF lub DMSO) EDTA (8,0 eq.) i NaHCO_3 (połowa masy EDTA). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 0,9 – 1,2 M), a następnie oczyszczono przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda III lub V). Końcowy produkt syntezy (w postaci soli amonowej) poddano 3-krotnej liofilizacji, a jego czystość potwierdzono za pomocą analitycznego RP-HPLC.

Procedura ogólna F:

Zaktywowany mononukleotyd w postaci soli litowej (5,0 eq.) i odpowiedni dinukleotyd w postaci soli amonowej (1,0 eq.) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml na 15 μmoli mononukleotydu) i dodano nadmiar bezwodnego ZnCl_2 (40 eq.). Mieszaninę reakcyjną mieszano w RT przez 92 h. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem ($10\times$ objętość DMSO) EDTA (40 eq.) i NaHCO_3 (połowa masy EDTA). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 0,9 M), a następnie oczyszczono przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda V). Końcowy produkt syntezy (w postaci soli amonowej) poddano 3-krotnej liofilizacji, a jego czystość potwierdzono za pomocą analitycznego RP-HPLC.

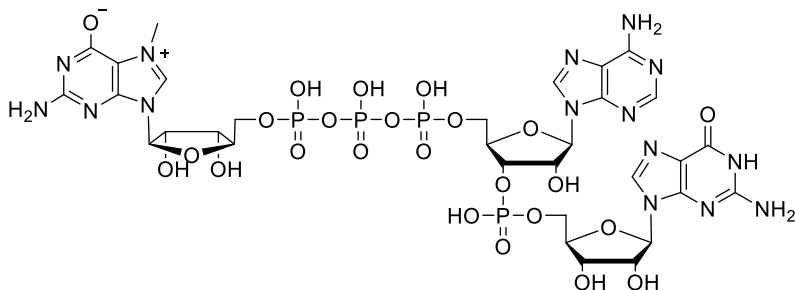
11.5.1 GpppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej D. GDP (0,055 mmol), Im-pApG (0,069 mmol) oraz ZnCl_2 (0,15 g, 1,1 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,1 ml). Reakcję prowadzono w RT przez 30 h. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II) i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (11 ml) EDTA (0,41 g, 1,1 mmol) i NaHCO_3 (0,20 g, 2,4 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano trinukleotyd GpppApG w postaci białego proszku z 68% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_{15}\text{O}_{24}\text{P}_4$: 1116,11701, znaleziono: 1116,11808.

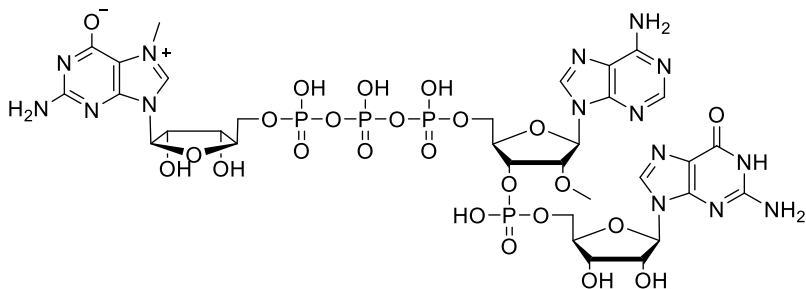
11.5.2 $m^7\text{GpppApG}$



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej D. $m^7\text{GDP}$ (50 μmol), Im-pApG (63 μmol) oraz ZnCl_2 (0,14 g, 1,0 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml). Reakcję prowadzono przez 12 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (10 ml) EDTA (0,37 g, 1,0 mmol) i NaHCO_3 (0,19 g, 2,2 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano trinukleotyd $m^7\text{GpppApG}$ w postaci białego proszku z 65% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_{15}\text{O}_{24}\text{P}_4$: 1130,13266, znaleziono: 1130,13473.

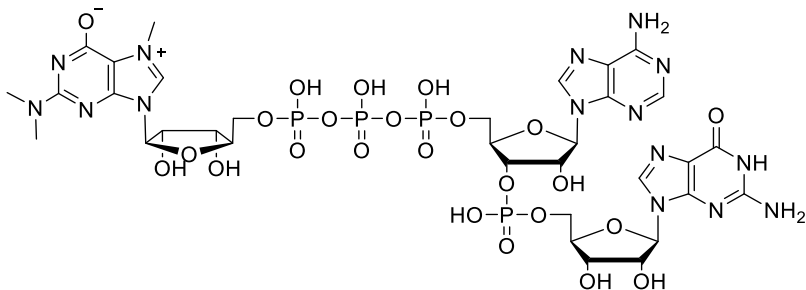
11.5.3 m⁷GpppA_{mp}G



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej D. m⁷GDP (50 μmol), Im-pA_{mp}G (63 μmol) oraz ZnCl₂ (0,14 g, 1,0 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml). Reakcję prowadzono przez 15 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (10 ml) EDTA (0,37 g, 1,0 mmol) i NaHCO₃ (0,19 g, 2,2 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano trinukleotyd m⁷GpppA_{mp}G w postaci białego proszku z 58% wydajnością.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₃₂H₄₂N₁₅O₂₄P₄: 1144,14831, znaleziono: 1144,14916.

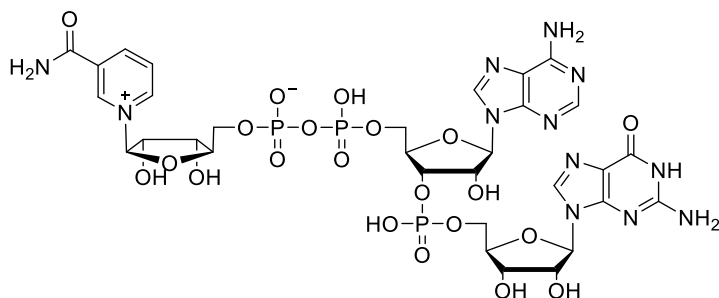
11.5.4 m₃^{2,2,7}GpppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej E. m₃^{2,2,7}GDP (0,20 mmol), Im-pApG (0,30 mmol) oraz MgCl₂ (0,15 g, 1,6 mmol) zawieszono w bezwodnym DMF (4,0 ml). Reakcję prowadzono przez 5 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (40 ml) EDTA (0,59 g, 1,6 mmol) i NaHCO₃ (0,30 g, 3,5 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 1,2 M), a następnie oczyszczono przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda III). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano produkt w postaci białego proszku z 43% wydajnością.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₃₃H₄₄N₁₅O₂₄P₄: 1158,16396, znaleziono: 1158,16535.

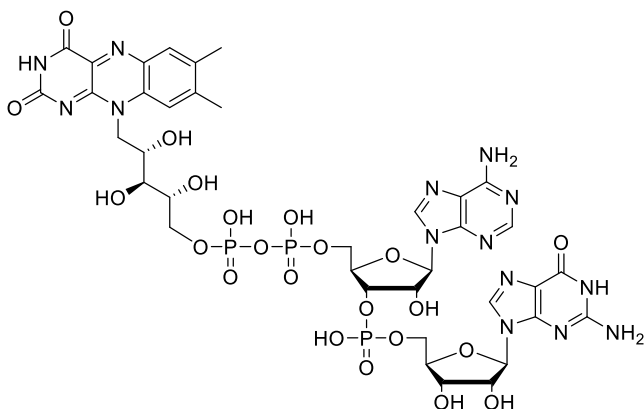
11.5.5 NRppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej F. NMN-Im (0,12 mmol), pApG (17 mg, 0,023 mmol) oraz ZnCl_2 (0,13 mg, 0,92 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (8,0 ml). Reakcję prowadzono przez 92 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (80 ml) EDTA (0,34 g, 0,92 mmol) i NaHCO_3 (0,17 g, 2,0 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano dinukleotyd NRppApG w postaci białego proszku z 54% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczone m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_{12}\text{O}_{21}\text{P}_3^-$: 1007,14928, znalezione: 1007,15076.

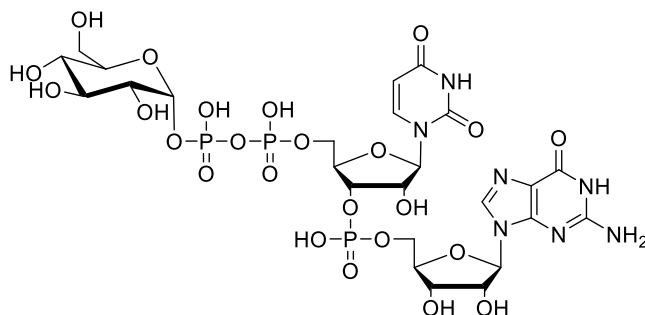
11.5.6 RflvppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej E. Rflvp (19,7 mg, 30,0 μmol), Im-pApG (45,0 μmol) oraz MgCl_2 (22,9 mg, 0,24 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (600 μl). Reakcję prowadzono przez 24 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (6,00 ml) EDTA (89,3 mg, 240 μmol) i NaHCO_3 (44,6 mg, 530 μmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 0,9 M), a następnie oczyszczono przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda V). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano dinukleotyd RflvppApG w postaci białego proszku z 80% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczone m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_{14}\text{O}_{22}\text{P}_3^-$: 1129,19729, znalezione: 1129,19843.

11.5.7 GlcppUpG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej E. Glcp (23,1 mg, 50,0 μmol), ImpUpG (75,0 μmol) oraz MgCl_2 (38,0 mg, 400 μmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (600 μl). Reakcję prowadzono przez 5 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (6,00 ml) EDTA (149 mg, 800 μmol) i NaHCO_3 (74,4 mg, 890 μmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 0,9 M), a następnie oczyszczono przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda III). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano dinukleotyd GlcppUpG w postaci białego proszku z 81% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczone m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{24}\text{P}_3^-$: 910,09518, znalezione: 910,09692.

11.6 Synteza mononukleotydów sfunkcjonalizowanych linkerem aminowym

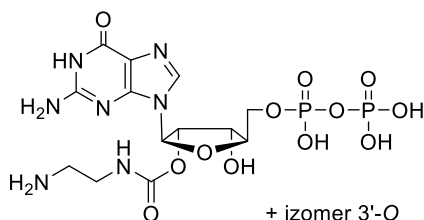
Procedura ogólna G:

GDP w postaci soli trietyloamoniowej (1 eq.) rozpuszczono w DMSO (0,1 M). Do roztworu dodano 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI, 10 eq.), a następnie przeniesiono do probówki dedykowanej do reaktora mikrofalowego, zaopatrzonej w element mieszający. Probówkę umieszczono w reaktorze mikrofalowym na 20 min ($P_{\text{max}} = 5 \text{ W}$, $T_{\text{max}} = 50^\circ\text{C}$, $\pm 1^\circ\text{C}$). Zawartość probówki przeniesiono do kolby okrągłodennej, dodano H_2O MQ (16 eq.) i mieszano, aż do zhydrolizowania nadmiaru CDI (~ 20 minut, aż do momentu, gdy z roztworu przestanie wydzielać się CO_2 w postaci pęcherzyków). Do mieszaniny reakcyjnej dodano odpowiedni linker diaminowy (etylenodiamina (EDA)/heksametylenodiamina (HMDA)/2,2'-(etylenodioksy) dietyloamina (amino-PEG2-amina), 5 – 10 eq.) oraz 1,8-diazabicyklo-7-en (DBU, 0,5 – 1 eq.). Zawartość kolby mieszano w RT przez noc, a następnie reakcję zakończono poprzez dodanie 0,5% kwasu solnego (HCl), do uzyskania pH 1,0, celem hydrolizy imidazolidu. Ostatecznie roztwór zobojętniono za pomocą 1 M NaOH. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda I) oraz MS o niskiej rozdzielczości. Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) z liniowym gradientem TEAB (0 do 0,9 M), a następnie załadowano na wyparcie obrotowej i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt końcowy (LX_N -GDP, gdzie LX_N to odpowiedni linker diaminowy) stanowił mieszaninę dwóch regioizomerów z linkerami przyłączonymi do GDP w pozycjach: 2'-O / 3'-O rybozy.

Procedura ogólna H:

Metylowanie pozycji N⁷ sfunkcjonalizowanych GDP było przeprowadzone w środowisku wodnym. Substrat LX_N-GDP w postaci soli trietyloamoniowej (1 eq.) rozpuszczono w H₂O MQ (0,1 M). Za pomocą lodowatego CH₃COOH roztwór doprowadzono do pH 4, po czym mieszano jeszcze przez 1 h w RT. Następnie dodano siarczan dimetylu ((CH₃O)₂SO₂, 10 eq.) i energicznie mieszano przez 4 h. 1 M roztwór NaOH użyto do utrzymania pH na poziomie 4 przez cały czas trwania reakcji. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II) i MS o niskiej rozdzielczości. Mieszaninę reakcyjną przemywano 3-krotnie DCM. Warstwę wodną zebrano i zateżono na wyparce obrotowej. Wyizolowany produkt oczyszczono na kolumnie jonowymiennej (DEAE Sephadex A-25) stosując liniowy gradient TEAB (0 – 1 M), a następnie odparowano do sucha z dodatkiem EtOH.

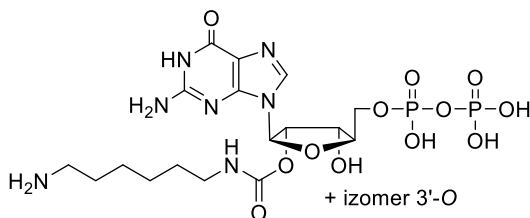
11.6.1 L_{2N}-GDP



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej G. Do reakcji wykorzystano GDP (250 μmol) oraz CDI (0,405 g, 2,50 mmol), rozpuszczone w 2,5 ml DMSO. Na etapie dołączania linkera zastosowano EDA (150 mg, 2,50 mmol) oraz DBU (37,3 μl, 250 μmol). Oczyszczanie L_{2N}-GDP przebiegało zgodnie z opisaną wyżej procedurą. Produkt końcowy wyizolowano w postaci jasnożółtego ciała stałego z wydajnością reakcji wynoszącą 52%.

MS ESI (-) obliczone m/z [M-H]⁻ C₁₃H₂₀N₇O₁₂P₂⁻: 528,1, znalezione: 527,9.

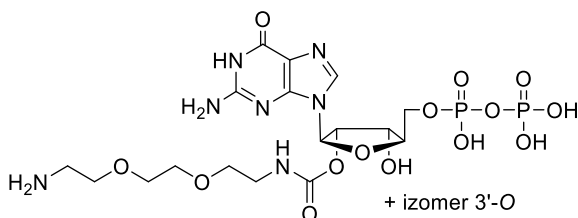
11.6.2 L_{6N}-GDP



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej G. Do reakcji wykorzystano GDP (250 μmol) oraz CDI (0,405 g, 2,50 mmol), rozpuszczone w 2,5 ml DMSO. Na etapie dołączania linkera zastosowano HMDA (291 mg, 2,50 mmol) oraz DBU (18,7 μl, 125 μmol). Oczyszczanie L_{6N}-GDP przebiegało zgodnie z opisaną wyżej procedurą. Produkt końcowy wyizolowano w postaci jasnożółtego ciała stałego z wydajnością reakcji wynoszącą 43%.

MS ESI (-) obliczone m/z [M-H]⁻ C₁₇H₂₈N₇O₁₂P₂⁻: 584,1, znalezione: 584,4.

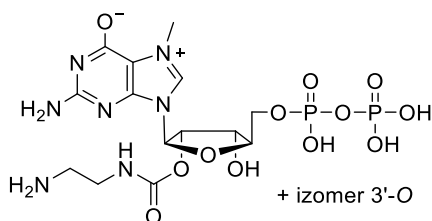
11.6.3 LPEG2_N-GDP



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej G. Do reakcji wykorzystano GDP (250 μmol) oraz CDI (0,405 g, 2,50 mmol), rozpuszczone w 2,5 ml DMSO. Na etapie dołączania linkera zastosowano amino-PEG2-aminę (185 mg, 1,25 mmol) oraz DBU (37,3 μl , 250 μmol). Oczyszczanie LPEG2_N-GDP przebiegało zgodnie z opisaną wyżej procedurą. Produkt końcowy wyizolowano w postaci jasnożółtego ciała stałego z wydajnością reakcji wynoszącą 45%.

MS ESI (-) obliczone m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2^-$: 616,1, znalezione: 616,5.

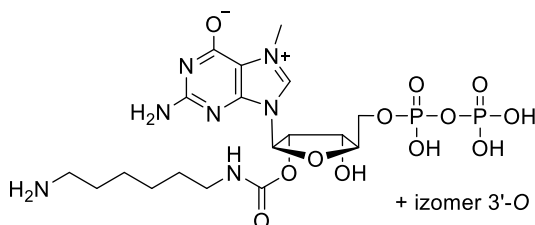
11.6.4 L2_N-m⁷GDP



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej H. Do reakcji wykorzystano L2_N-GDP (54,0 μmol) rozpuszczony w 540 μl H₂O MQ oraz (CH₃O)₂SO₂ (51,2 μl , 540 μmol). Oczyszczanie L2_N-m⁷GDP przebiegało zgodnie z opisaną procedurą. Produkt końcowy wyizolowano w postaci białego ciała stałego z wydajnością reakcji wynoszącą 40%.

MS ESI (-) obliczone m/z $[M-H]^-$ $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{P}_2^-$: 542,1, znalezione: 542,3.

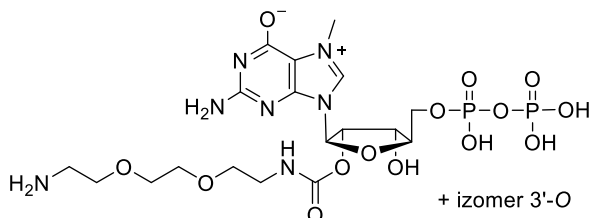
11.6.5 L6_N-m⁷GDP



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej H. Do reakcji wykorzystano L6_N-GDP (54,0 μmol) rozpuszczony w 540 μl H₂O MQ oraz (CH₃O)₂SO₂ (51,2 μl , 540 μmol). Oczyszczanie L6_N-m⁷GDP przebiegało zgodnie z opisaną procedurą. Produkt końcowy wyizolowano w postaci białego proszku z wydajnością reakcji wynoszącą 49%.

MS ESI (-) obliczone m/z $[M-H]^-$ $C_{18}H_{30}N_7O_{12}P_2^-$: 598,1, znalezione: 598,0.

11.6.6 LPEG2_N-m⁷GDP

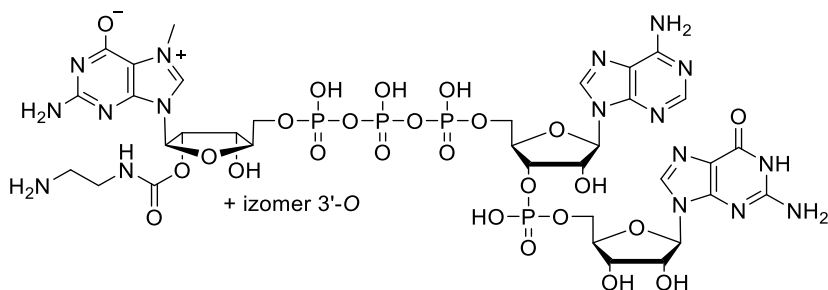


Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej H. Do reakcji wykorzystano LPEG2_N-GDP (54,0 μmol) rozpuszczony w 540 μl H₂O MQ oraz (CH₃O)₂SO₂ (51,2 μl, 540 μmol). Oczyszczanie LPEG2_N-m⁷GDP przebiegało zgodnie z opisaną procedurą. Produkt końcowy wyizolowano w postaci białego proszku z wydajnością reakcji wynoszącą 55%.

MS ESI (-) obliczone m/z $[M-H]^-$ $C_{18}H_{30}N_7O_{14}P_2^-$: 630,1, znalezione: 630,2.

11.7 Reakcje sprzęgania do sfunkcjonalizowanych analogów kapu

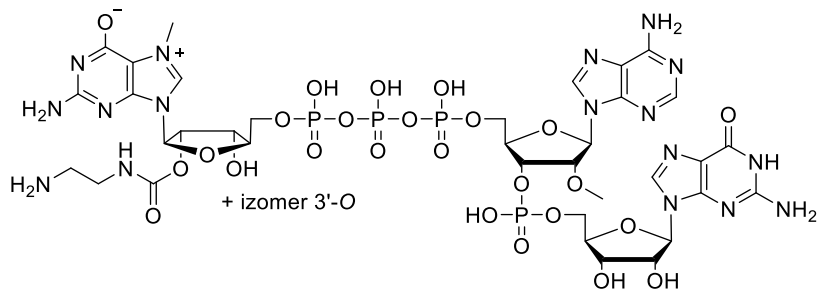
11.7.1 L2_N-m⁷GpppApG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej D. L2_N-m⁷GDP (50,0 μmol), Im-pApG (63,0 μmol) oraz ZnCl₂ (136 mg, 1,00 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml). Reakcję prowadzono przez 12 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (10,0 ml) EDTA (372 mg, 1,00 mmol) i NaHCO₃ (186 mg, 2,20 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano sól amonową trinukleotydu 2'-O/3'-O-L2_N-m⁷GpppApG w postaci białego proszku z 38% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $C_{34}H_{46}N_{17}O_{25}P_4^-$: 1216,18067, znalezione: 1216,18078.

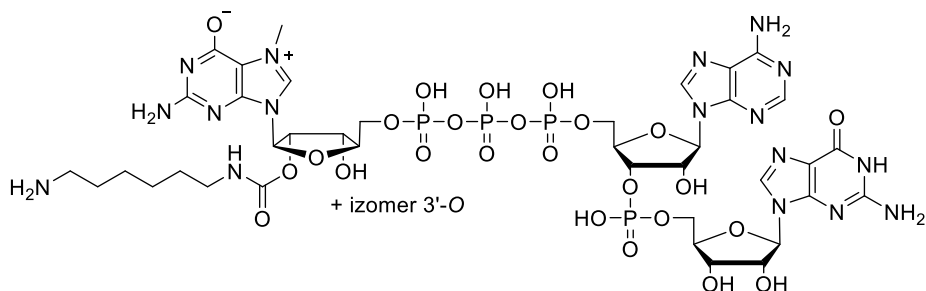
11.7.2 L_{2N}-m⁷GpppA_mpG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej D. L_{2N}-m⁷GDP (50 μmol), Im-pA_mpG (63 μmol) oraz ZnCl₂ (136 mg, 1,00 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml). Reakcję prowadzono przez 10 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (10 ml) EDTA (372 mg, 1,00 mmol) i NaHCO₃ (186 mg, 2,20 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano sól amonową trinukleotydu 2'-O/3'-O- L_{2N}-m⁷GpppA_mpG w postaci białego proszku z 40% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₃₅H₄₈N₁₇O₂₅P₄: 1230,19632, znaleziono: 1230,19599.

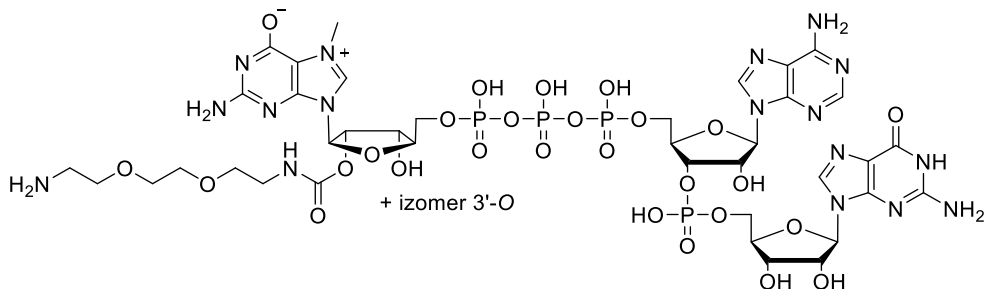
11.7.3 L_{6N}-m⁷GpppApG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej D. L_{6N}-m⁷GDP (50 μmol), Im-pApG (63 μmol) oraz ZnCl₂ (136 mg, 1,00 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml). Reakcję prowadzono przez 12 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (10 ml) EDTA (372 mg, 1,00 mmol) i NaHCO₃ (186 mg, 2,20 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano sól amonową trinukleotydu 2'-O/3'-O- L_{6N}-m⁷GpppApG w postaci białego proszku z 43% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₃₈H₅₄N₁₇O₂₅P₄: 1272,24327, znaleziono: 1272,24350

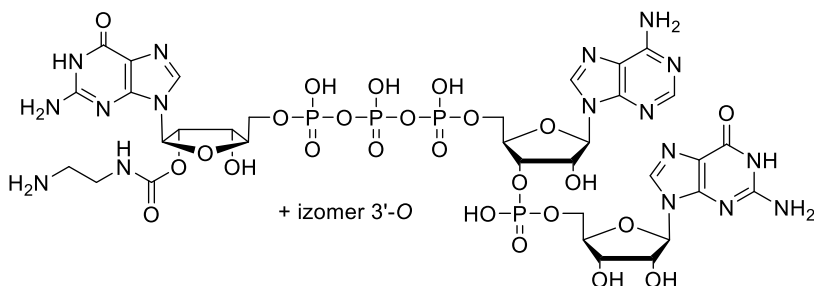
11.7.4 LPEG2_N-m⁷GpppApG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej D. LPEG2_N-m⁷GDP (50 μmol), Im-pApG (63 μmol) oraz ZnCl₂ (136 mg, 1,00 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml). Reakcję prowadzono przez 12 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (10 ml) EDTA (372 mg, 1,00 mmol) i NaHCO₃ (186 mg, 2,20 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano sól amonową trinukleotydu 2'-O/3'-O- LPEG2_N-m⁷GpppApG w postaci białego proszku z 35% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₃₈H₅₅N₁₇O₂₇P₄⁻: 1304,23310, znaleziono: 1304,23353.

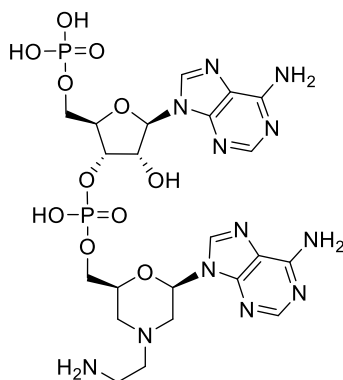
11.7.5 L_{2N}-GpppApG



Syntezę przeprowadzono według Procedury ogólnej D. L_{2N}-GDP (50 μmol), Im-pApG (63 μmol) oraz ZnCl₂ (136 mg, 1,00 mmol) zawieszono w bezwodnym DMSO (1,0 ml). Reakcję prowadzono przez 12 h w RT. Postęp reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono rozcieńczając ją wodnym roztworem (10 ml) EDTA (372 mg, 1,00 mmol) i NaHCO₃ (186 mg, 2,20 mmol). Produkt wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej oraz oczyszczono zgodnie z w/w procedurą. Ostatecznie otrzymano sól amonową trinukleotydu 2'-O/3'-O- L_{2N}-GpppApG w postaci białego proszku z 46% wydajnością reakcji.

HRMS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ C₃₃H₄₄N₁₇O₂₅P₄⁻: 1202,16502, znaleziono: 1202,16499.

11.8 Funkcjonalizacja dinukleotydu pApA linkerem aminowym, pApA-EDA



pApA w postaci soli trietyloamoniowej (0,026 mmol) rozpuszczono w H₂O MQ (1,3 ml) a następnie dodano świeżo przygotowany 0,25 M roztwór NaIO₄ (0,16 ml). Mieszaninę inkubowano przez 30 min bez dostępu światła w RT. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą analitycznego HPLC (Metoda II). Otrzymany pApA-dial zmieszano ze świeżo przygotowanym 1 M wodnym roztworem cyjanoborowodoru sodu (NaBH₃CN, 0,1 ml), 0,4 M wodnym roztworem EDA (75 µl) oraz 1 M wodnym buforem fosforanowym KH₂PO₄, pH 6,2 (0,4 ml). Mieszaninę inkubowano przez 30 minut bez dostępu światła w RT, monitorując przebieg reakcji za pomocą analitycznego HPLC (Metoda II). Reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie próbki H₂O MQ (8,0 ml) a następnie oczyszczano przy użyciu semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda III). Końcowy produkt syntezy poddano 3-krotnej liofilizacji, a jego strukturę potwierdzono za pomocą MS o niskiej rozdzielczości. Ostatecznie otrzymano dinukleotyd pApA-EDA w postaci białego proszku z 41% wydajnością reakcji.

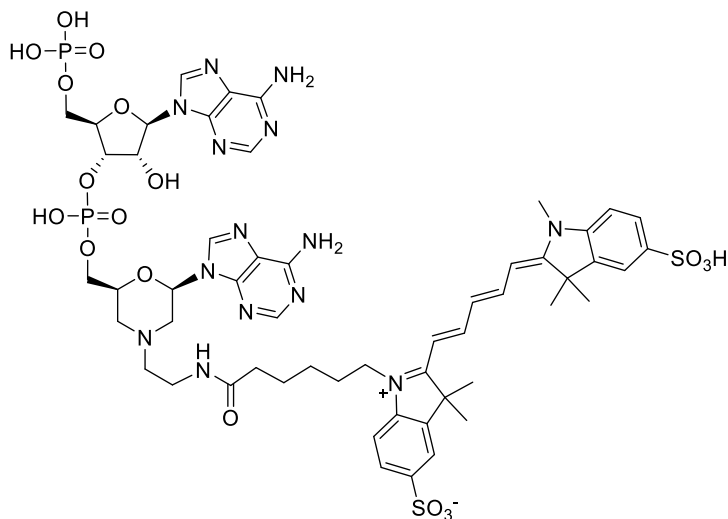
MS ESI (+) obliczono m/z $[M+H]^+$ C₂₂H₃₃N₁₂O₁₁P₂⁺: 703,2, znaleziono: 703,2.

11.9 Znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi

Procedura ogólna I:

Barwnik fluorescencyjny w postaci estru NHS (1 eq.) rozpuszczono w DMSO (40 mM) i dodano do próbki eppendorfa zawierającej pApA-EDA w postaci soli amonowej (1 eq.) zawieszonego w DMSO (40 mM). Do mieszaniny reakcyjnej dodano TEA (2,0 eq.) a następnie całość przeniesiono na 4 h do inkubatora (27°C) z funkcją wytrząsania (1200 rpm). Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika) oraz widm rejestrowanych na MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono poprzez 10-krotne rozcieńczenie buforem A (50 mM octan amonu, pH 5,9). Związek wyizolowano i oczyszczono za pomocą semi-preparatywnego RP-HPLC (Metoda IV, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika) a następnie 3-krotnie zliofilizowano.

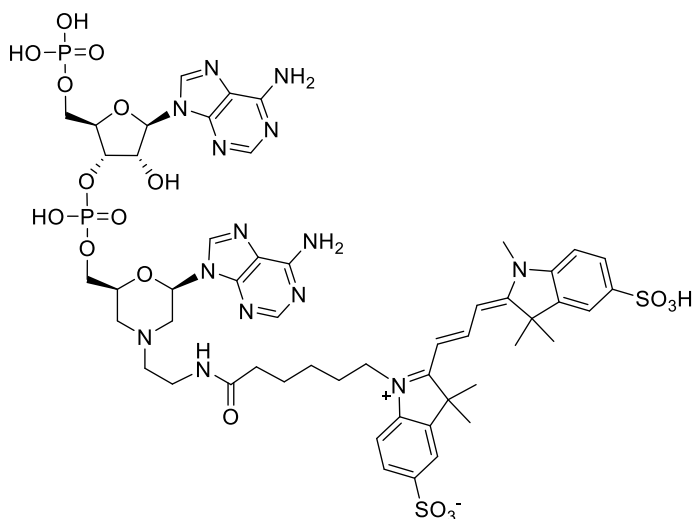
11.9.1 pApA-sCy5



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej I. sulfocyjaninę 5 (sCy5, 1,6 mg, 2,0 μmol) rozpuszczono w DMSO (50,0 μl) i dodano do pApA-EDA (1,5 mg, 2,0 μmol) zawieszonego w 50 μl DMSO. Do mieszaniny reakcyjnej dodano TEA (0,60 μl , 4,0 μmol) a następnie całość inkubowano 4 h w 27°C. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie buforem A (0,90 ml). Izolację produktu i jego oczyszczanie przeprowadzono zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano wyznakowany dinukleotyd pApA-sCy5 w postaci soli amonowej, z wydajnością 30%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $C_{54}H_{67}N_{14}O_{18}P_2S_2^-$: 1325,4, znaleziono: 1325,4.

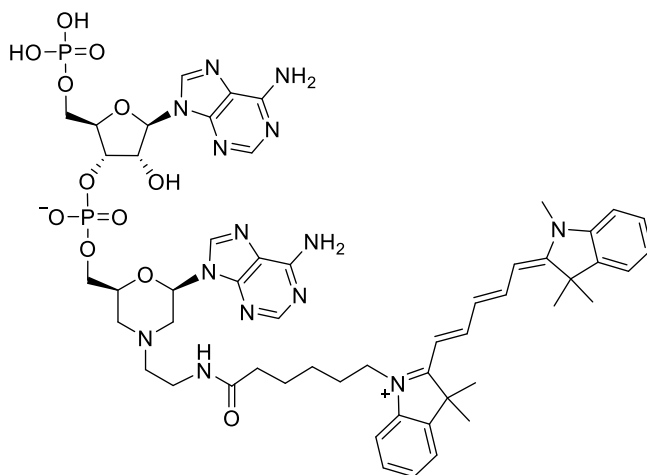
11.9.2 pApA-sCy3



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej I. sulfocyjaninę 3 (sCy3, 1,5 mg, 2 μ mol) rozpuszczono w DMSO (50 μ l) i dodano do pApA-EDA (1,5 mg, 2,0 μ mol) zawieszonego w 50 μ l DMSO. Do mieszaniny reakcyjnej dodano TEA (0,60 μ l, 4,0 μ mol) a następnie całość inkubowano 4 h w 27°C. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie buforem A (0,9 ml). Izolację produktu i jego oczyszczanie przeprowadzono zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano wyznakowany dinukleotyd pApA-sCy3 w postaci soli amonowej, z wydajnością 32%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-H]^-$ $C_{52}H_{65}N_{14}O_{18}P_2S_2^-$: 1299,4, znaleziono: 1299,6.

11.9.3 pApA-Cy5



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej I. cyjaninę 5 (Cy5, 1,5 mg, 2,0 μ mol) rozpuszczono w DMSO (50 μ l) i dodano do pApA-EDA (1,5 mg, 2,0 μ mol) zawieszonego w 50 μ l DMSO. Do mieszaniny reakcyjnej dodano TEA (0,60 μ l, 4,0 μ mol) a następnie całość inkubowano 4 h w 27°C. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą analitycznego RP-HPLC i MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie buforem A (0,90 ml). Izolację produktu i jego oczyszczanie przeprowadzono zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano wyznakowany dinukleotyd pApA-Cy5 w postaci soli amonowej, z wydajnością 25%.

MS ESI (+) obliczono m/z $[M+2H]^{2+}$ $C_{54}H_{68}N_{14}O_{12}P_2$: 584,2, znaleziono: 584,5.

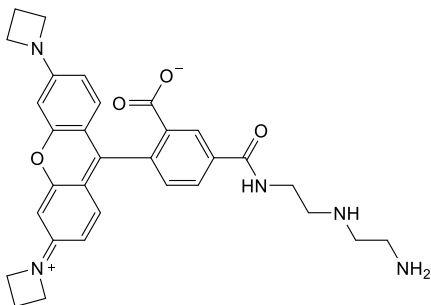
11.10 Funkcjonalizacja barwników fluorescencyjnych

Procedura ogólna J:

Barwnik fluorescencyjny w postaci estru NHS (1,0 eq.) umieszczono w probówce typu eppendorf i zawieszono w DMSO (40 mM) a następnie dodano TEA (7,5 eq.). Całość przeniesiono do inkubatora (25°C) i wytrząsano zawartość przez ~10 min, bez dostępu światła, aż do całkowitego rozpuszczenia barwnika. Do mieszaniny dodano dietylenotriaminę (DETA,

29 eq.) i całość inkubowano przez kolejną godzinę w tych samych warunkach. Po tym czasie do mieszaniny dodano 1 eq. 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid (EDC) oraz ponownie DETA (10 eq.). Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach silikażelowych TLC w układzie: DCM/MeOH/lodowaty CH_3COOH , 9/1/0,5, v/v/v, wizualizując poszczególne frakcje poprzez wybarwienie etanolowym roztworem ninhydryny oraz w świetle UV (254 nm). Reakcję zakończono po 2 h a następnie mieszaninę kilkakrotnie odparowano na wyparce obrotowej z 80% EtOH. Produkt wyizolowano i oczyszczono na semi-preparatywnym HPLC (Metoda VI, detekcja przy maksimum absorpcji barwnika) a następnie zliofilizowano. Czystość związku potwierdzono rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości.

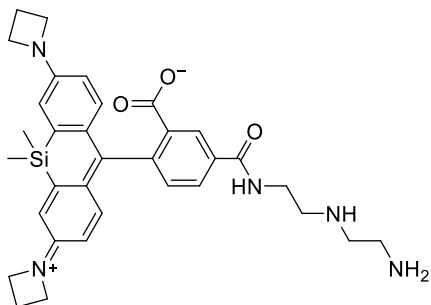
11.10.1 Janelia Fluor 549-DETA



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej J. W probówce typu eppendorf zawieszono barwnik Janelia Fluor 549 (JF549, 1,5 mg, 2,7 μ mol) w 70 μ l DMSO a następnie dodano TEA (2,8 μ l, 20 μ mol). Po 10 minutach do próbówki dodano DETA (8,5 μ l, 78 μ mol), a po kolejnej godzinie EDC (0,5 mg, 2,7 μ mol). Proces kontroli przebiegu reakcji a także izolacja i oczyszczanie produktu przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano JF549-DETA w postaci soli trietyloamoniowej z wydajnością 25%.

MS ESI (+) obliczono m/z $[M+H]^+$ $C_{31}H_{34}N_5O_4^+$: 540,3, znaleziono: 540,4.

11.10.2 Janelia Fluor 646-DETA



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej J. W probówce typu eppendorf zawieszono barwnik Janelia Fluor 646 (JF646, 1,6 mg, 2,7 μ mol) w 70 μ l DMSO a następnie dodano TEA (2,8 μ l, 20 μ mol). Po 10 minutach do próbówki dodano DETA (8,5 μ l, 78 μ mol), a po kolejnej godzinie EDC (0,5 mg, 2,7 μ mol). Proces kontroli przebiegu reakcji, a także

izolacja i oczyszczanie produktu przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano JF646-DETA w postaci soli trietyloamoniowej z wydajnością 20%.

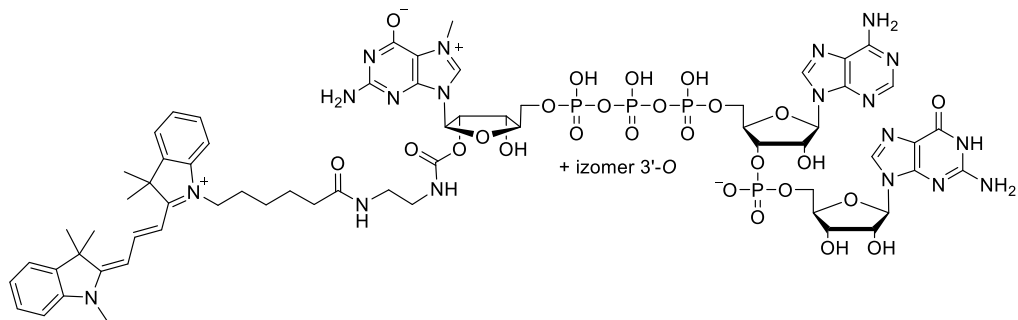
MS ESI (+) obliczono m/z $[M+H]^+$ $C_{33}H_{40}N_5O_3Si^+$: 582,3, znaleziono: 582,3.

11.11 Znakowanie fluorescencyjne di- i trinukleotydów

Procedura ogólna K:

Cy3 w postaci kwasu karboksylowego (1,5 eq.) rozpuszczono w DMSO (0,50 M). Następnie dodano TEA (1 eq.) oraz tetrafluoroboran *N,N,N',N'*-tetrametylo-*O*-(*N*-sukcynimidylo)uronowy (TSTU, 1 eq.) i inkubowano w ciemności przez 30 min w RT. Następnie do mieszaniny dodano odpowiednio sfunkcjonalizowany linkerem aminowym analog kapu (1 eq.) zawieszony w DMSO (0,45 M) z niewielkim dodatkiem H₂O MQ (2,0 μl) wspomagającym rozpuszczanie substratu. Całość przeniesiono na 12 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm). Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika) i wykonując widma MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono rozcieńczając mieszaninę 2-krotnie buforem A (50 mM octan amonu pH 5,9) a następnie 4-krotnie przemywano octanem etylu. Frakcję wodną oczyszczano na semi-preparatywnym RP-HPLC (Metoda VI, detekcja przy maksimum absorpcji barwnika) a następnie zliofilizowano. Czystość związku potwierdzono za pomocą analitycznego RP-HPLC.

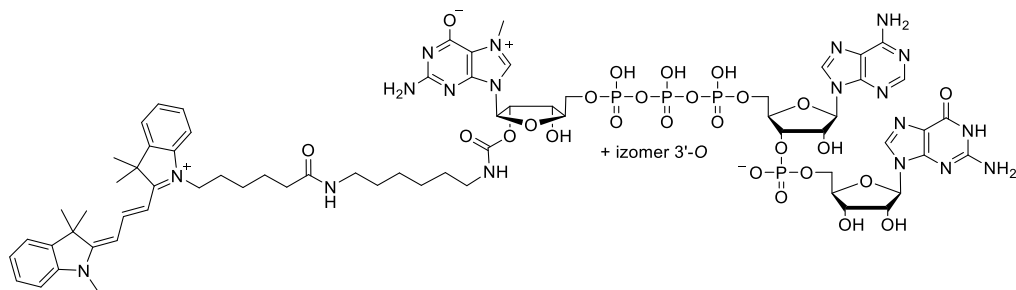
11.11.1 Cy3-L2_N-m⁷GpppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej K. Cy3 w postaci kwasu karboksylowego (6,5 mg, 13 μmol) rozpuszczono w 25 μl DMSO. Następnie dodano TEA (1,9 μl, 13 μmol) oraz TSTU (4,0 mg, 13 μmol) i inkubowano bez dostępu światła przez 30 min w RT. Do mieszaniny dodano L2_N-m⁷GpppApG (9,0 μmol) zawieszony w DMSO (20 μl) z niewielkim dodatkiem H₂O MQ (2 μl) wspomagającym rozpuszczanie substratu. Całość przeniesiono na 12 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm). Proces kontroli przebiegu reakcji a także izolacja i oczyszczanie produktu przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano produkt w postaci soli amonowej z wydajnością 24%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-2H]^{2-}$ $C_{64}H_{79}N_{19}O_{26}P_4^{2-}$: 826,7, znaleziono: 826,7.

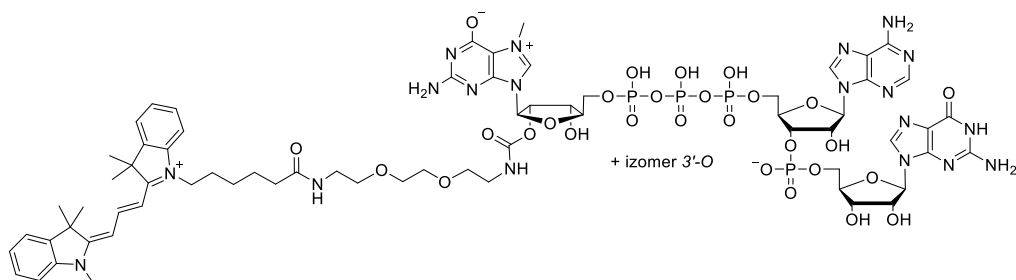
11.11.2 Cy3-L6_N-m⁷GpppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej K. Cy3 w postaci kwasu karboksylowego (6,5 mg, 13 μ mol) rozpuszczono w 25 μ l DMSO. Następnie dodano TEA (1,9 μ l, 13 μ mol) oraz TSTU (4,0 mg, 13 μ mol) i inkubowano bez dostępu światła przez 30 min w RT. Następnie do mieszaniny dodano L6_N-m⁷GpppApG (9,0 μ mol) zawieszony w DMSO (20 μ l) z niewielkim dodatkiem H₂O MQ (2,0 μ l) wspomagającym rozpuszczanie substratu. Całość przeniesiono na 12 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm). Proces kontroli przebiegu reakcji a także izolacja i oczyszczanie produktu przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano produkt w postaci soli amonowej z wydajnością 20%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-2H]^{2-}$ C₆₈H₈₇N₁₉O₂₆P₄²⁻: 854,8, znaleziono: 854,8.

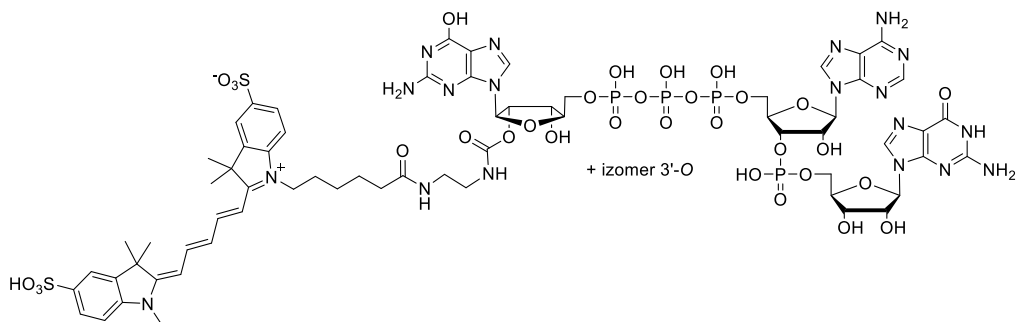
11.11.3 Cy3-LPEG2_N- m⁷GpppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej K. Cy3 w postaci kwasu karboksylowego (6,5 mg, 13 μ mol) rozpuszczono w 25 μ l DMSO. Następnie dodano TEA (1,9 μ l, 13 μ mol) oraz TSTU (4,0 mg, 13 μ mol) i inkubowano bez dostępu światła przez 30 min w RT. Następnie do mieszaniny dodano LPEG2_N-m⁷GpppApG (9 μ mol) zawieszony w DMSO (20 μ l) z niewielkim dodatkiem H₂O MQ (2,0 μ l) wspomagającym rozpuszczanie substratu. Całość przeniesiono na 12 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm). Proces kontroli przebiegu reakcji a także izolacja i oczyszczanie produktu przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano produkt w postaci soli amonowej z wydajnością 36%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-2H]^{2-}$ C₆₈H₈₇N₁₉O₂₈P₄²⁻: 870,7, znaleziono: 870,7.

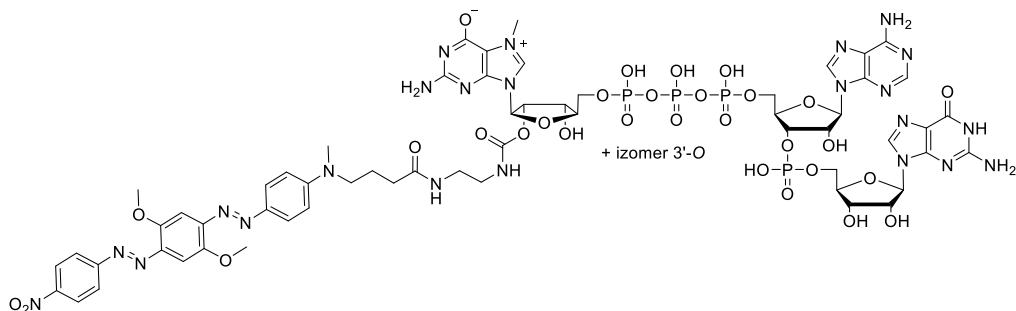
11.11.4 sCy5-L2_N-GpppApG



Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej K. sCy5 w postaci kwasu karboksylowego (9,0 mg, 13 μ mol) rozpuszczono w 25 μ l DMSO. Następnie dodano TEA (1,9 μ l, 13 μ mol) oraz TSTU (4,0 mg, 13 μ mol) i inkubowano bez dostępu światła przez 30 min w RT. Następnie do mieszaniny dodano L2_N-m⁷GpppApG (9,0 μ mol) zawieszony w DMSO (20 μ l) z niewielkim dodatkiem H₂O MQ (2 μ l) wspomagającym rozpuszczanie substratu. Całość przeniesiono na 12 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm). Proces kontroli przebiegu reakcji a także izolacja i oczyszczanie produktu przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Finalnie otrzymano produkt w postaci soli amonowej z wydajnością 52%.

MS ESI (-) obliczono m/z $[M-2H]^{-2}$ C₆₅H₇₉N₁₉O₃₂P₄S₂⁻: 912,7, znaleziono: 912,6.

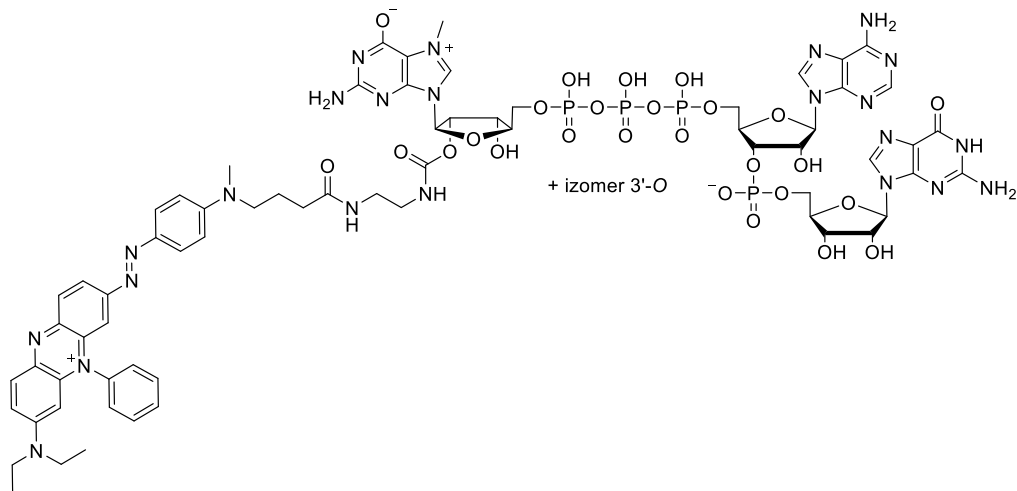
11.11.5 BHQ-2-L2_N-m⁷GpppApG



BHQ-2 w postaci estru NHS (2,0 mg, 3,3 μ mol) rozpuszczono w 60 μ l DMSO. Następnie dodano TEA (0,9 μ l, 6,7 μ mol) oraz L2_N-m⁷GpppApG (2,2 μ mol) zawieszony w DMSO (60 μ l) z niewielkim dodatkiem 0,25 M NaHCO₃ (0,5 μ l) wspomagającym rozpuszczanie substratu. Całość przeniesiono na 6 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm). Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika) i wykonując widma MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono rozcieńczając mieszaninę 2-krotnie H₂O MQ a następnie 3-krotnie przemywano octanem etylu. Frakcję wodną oczyszczano na semi-preparatywnym RP-HPLC (Metoda VI, detekcja przy maksimum absorpcji barwnika) a następnie zliofilizowano. Czystość związku potwierdzono za pomocą RP-HPLC. Końcowy produkt otrzymano w postaci soli amonowej z wydajnością 31%.

MS ESI (+) obliczono m/z $[M+2H]^{2+}$ C₅₉H₇₃N₂₃O₃₀P₄²⁺: 853,7, znaleziono: 853,8.

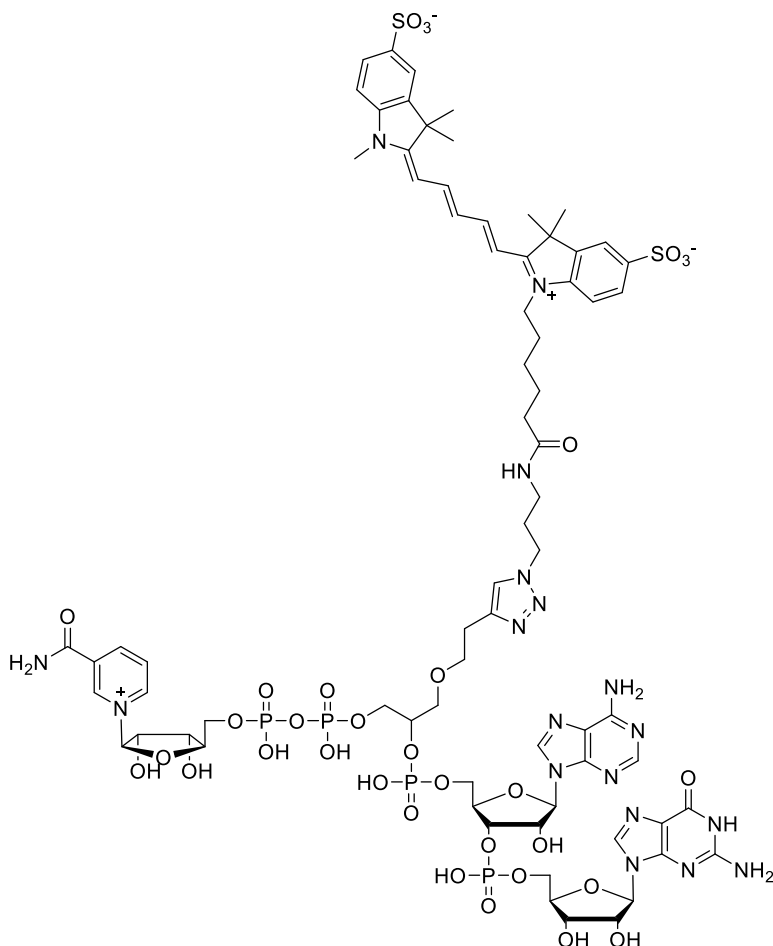
11.11.6 BHQ-3-L2_N-m⁷GpppApG



BHQ-3 w postaci estru NHS (2,1 mg, 2,7 μmol) rozpuszczono w 60 μl DMSO. Następnie dodano TEA (0,75 μl , 5,0 μmol) oraz L2_N-m⁷GpppApG (1,8 μmol) zawieszony w DMSO (60 μl) z niewielkim dodatkiem 0,25 M NaHCO₃ (0,5 μl) wspomagającym rozpuszczanie substratu. Całość przeniesiono na 6 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm). Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II, detekcja przy $\lambda = 260$ nm oraz przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika) i wykonując widma MS o niskiej rozdzielczości. Reakcję zakończono rozcieńczając mieszaninę 2-krotnie H₂O MQ a następnie 3-krotnie przemywano DCM. Frakcję wodną oczyszczano na semi-preparatywnym RP-HPLC (Metoda VI, detekcja przy maksimum absorpcji barwnika) a następnie zliofilizowano. Czystość związku potwierdzono za pomocą RP-HPLC. Końcowy produkt otrzymano w postaci soli amonowej z wydajnością 19%.

MS ESI (+) obliczono m/z $[M+2H]^{2+}$ C₆₇H₈₁N₂₃O₂₆P₄²⁺: 873,7, znaleziono: 873,7.

11.11.7 NRpp-glButyn-sCy5-pApG



10 mM roztwór azydru sCy5 w DMSO (sCy5-N₃, 136 µl, 1,36 µmol) zmieszano z 200 mM wodnym roztworem askorbinianu sodu (68,0 µl, 13,6 µmol). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 10 mM roztwór dinukleotydu NRpp-glButyn-pApG (136 µl, 1,36 µmol) oraz 10 mM wodny roztwór kompleksu CuSO₄:THPTA (272 µl, 2,72 µmol). Całość przeniesiono do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (1000 rpm) na 3 h. Po tym czasie reakcję zakończono poprzez 2-krotne rozcieńczenie H₂O MQ i dodanie 400 µl wodnego roztworu EDTA pH 6,0 o stężeniu wyjściowym 5 mg/ml. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analitycznego RP-HPLC (Metoda II, detekcja przy $\lambda = 260$ nm oraz przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika) oraz rejestrując widma MS o niskiej rozdzielczości. Wyznakowany fluorescencyjnie analog kapu został wyizolowany w mieszaniny reakcyjnej i oczyszczony na semi-preparatywnym HPLC (Metoda VI, detekcja przy maksimum absorpcji barwnika oraz przy $\lambda = 260$ nm) a następnie próbkę 3-krotnie zliofilizowano. Czystość związku potwierdzono za pomocą analitycznego RP-HPLC. Końcowy produkt otrzymano w postaci soli amonowej z wydajnością 58%.

MS ESI (-) obliczono m/z [M-2H]²⁻: C₇₃H₉₂N₁₈O₃₃P₄S₂²⁻: 968,2, znaleziono: 968,0.

12. Reakcje enzymatyczne

12.1 Informacje ogólne

Matryca DNA poliA-Broccoli została dostarczona przez firmę Genomed S.A, natomiast jej synteza przeprowadzona była przez Metabion International AG. Matryca DNA kodująca 35-nukleotydowy fragment RNA została przygotowana poprzez renaturację (ang. *annealing*) dwóch komplementarnych jednoniciowych oligonukleotydów (Genomed S.A) na podstawie dołączonego przez producenta protokołu. Poszczególne substraty użyte w transkrypcjach *in vitro* pochodziły z ThermoFisher Scientific (NTPy, 5× bufor transkrypcyjny, RNaza RiboLock, nieorganiczna pirofosfataza (PPaza), DNaza I oraz polimeraza T7 RNA). Woda użyta w eksperymentach (H₂O MQ) była pozyskiwana z systemu Millipore Milli-Q i poddana autoklawowaniu.

Wstępne oczyszczanie otrzymanych RNA prowadzono na kolumnach Monarch® RNA Cleanup Kit (New England BioLabs). Finalne oczyszczanie RNA przeprowadzano z wykorzystaniem RP-HPLC na semi-preparatywnych kolumnach Phenomenex Clarity Oligo RP (150 mm × 4,6 mm, 3 µm) przy przepływie wynoszącym 1 ml/min. Kolumnę termostatowano podczas przeprowadzanej analizy, utrzymując temperaturę 60°C. Do oczyszczania związków zastosowano liniowy gradient ACN w buforze trietyloaminy. Dokładny skład buforów oraz stosowane metody przedstawiono poniżej. Bufory przed ich zastosowaniem były filtrowane a następnie autoklawowane. Detekcję absorpcji przeprowadzano przy λ = 260 nm (referencja λ = 360 nm, detektor DAD) lub w przypadku znakowanych RNA, przy długości fali przypadającej na maksimum emisji znacznika (detektor FLD). Wizualizację żeli poliakrylamidowych przeprowadzano na aparacie Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Wszystkie próbki użyte podczas syntez RNA (próbki typu eppendorf, próbki typu falcon) oraz wymienne końcówki do pipet automatycznych posiadały status „RNAse free”, zapewniony przez producenta. Reakcje z udziałem barwników fluorescencyjnych były prowadzone przy ograniczonym dostępie do światła.

Metoda	Bufor A	Bufor B	Gradient	Kolumna	Przepływ	Aparat
VII	100 mM octan trietyloaminy, pH 7,0	200 mM octan trietyloaminy, pH 7,0/ACN, 1/1, v/v	70% Buforu B w 30 min	Phenomenex, Clarity Oligo RP (150 mm × 4,6 mm, 3 µm), T = 60°C	1 ml/min	Agilent Tech Series 1290 Infinity
VIII	100 mM octan trietyloaminy, pH 7,0	200 mM octan trietyloaminy, pH 7,0/ACN, 1/1, v/v	32,5% Buforu B w 20 min	Phenomenex, Clarity Oligo RP (150 mm × 4,6 mm, 3 µm), T = 60°C	1 ml/min	Agilent Tech Series 1290 Infinity
IX	100 mM octan trietyloaminy, pH 7,0	200 mM octan trietyloaminy, pH 7,0/ACN, 1/1, v/v	100% Buforu B w 26 min	Phenomenex, Clarity Oligo RP (150 mm × 4,6 mm, 3 µm), T = 60°C	1 ml/min	Agilent Tech Series 1290 Infinity

12.2 Transkrypcja *in vitro* na matrycy poliA-Broccoli

Procedura ogólna L:

5'-kapowane RNA uzyskano w wyniku transkrypcji *in vitro* na matrycy DNA kodującej aptamer poliA-Broccoli o długości 70 nukleotydów w sekwencji: 5' – GGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGACGGGUCGGUCCAGAUUAUUCGUAUCUGUCGAGU AGAGUGGGCUCC – 3'. Matryca została zaprojektowana przy użyciu programu do przewidywania struktur drugorzędowych *in silico* RNAfold WebServer. Każdorazowo mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z 1 μ M matrycy DNA, 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, w przypadku niekapowanych RNA: 5 mM NTP, w przypadku 5'-kapowanych RNA: 5 mM ATP/UTP/CTP oraz 2 mM GTP, 200 U inhibitora RNazy RiboLock, 6 mM odpowiedniego analogu kapu, 20 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml polimerazy T7 RNA oraz H₂O MQ do całkowitej objętości 200 μ l. Reakcję inkubowano przez 4 h w temperaturze 37°C, a następnie przez 30 minut inkubowano z 5 μ l DNazy I (1 U/ μ l). Reakcję zakończono poprzez dodanie 12 μ l 0,5 M wodnego roztworu EDTA pH 8 i rozcieńczenie H₂O MQ do objętości 400 μ l. Próbkę podzielono na dwie frakcje. Do każdej z nich dodano po 200 μ l mieszaniny fenol/chloroform 1/1, v/v i trzykrotnie ekstrahowano, zbierając warstwę wodną zawierającą RNA. Próbkę następnie oczyszczano za pomocą HPLC na kolumnie Phenomenex Clarity Oligo-RP w układzie faz odwróconych (Metoda VII). Uzyskane w ten sposób frakcje były następnie wytrącane w niskiej temperaturze (-80°C, 30 min) z 3 M octanem sodu (10% objętości próbki, pH 5,2) w 99% EtOH (3 $\times$ objętość próbki) i z dodatkiem glikogenu (1 μ l/1 ml próbki). Następnie próbki zwirowano (20 min, 4°C, 15000 rpm), roztwór usunięto znad osadu i dodano 500 μ l 80% EtOH, ponownie wirując próbki (10 min, 4°C, 15000 rpm). Etanolowy roztwór dokładnie usunięto a osad wysuszono w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem (~10 min). Jakość RNA sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 20% żelu poliakrylamidowym z 1% dodatkiem APB (PAA/APB/TBE, 180 min, 23 W). Tak wytrącone RNA przechowywano w -80°C a po rozmrożeniu i rozpuszczeniu w H₂O MQ wykorzystywano w dalszych eksperymentach. Wydajność reakcji IVT określano na podstawie masy uzyskanego RNA po etapie oczyszczania za pomocą HPLC i strącania w EtOH oraz podawano w μ g RNA uzyskanych z 1 μ l mieszaniny reakcyjnej. Wydajność kapowania RNA była oceniana na podstawie chromatogramów uzyskanych podczas oczyszczania próbek oraz żeli poliakrylamidowych.

12.2.1 ppp-poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/GTP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), inhibitora RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), MgCl₂ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H₂O MQ (87 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,90 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.2.2 kap-0-poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), GTP (4 μ l, 2 mM), m⁷GpppApG (12 μ l, 6 mM), inhibitora

RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), $MgCl_2$ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H_2O MQ (81 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,86 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.2.3 kap-1-poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), GTP (4 μ l, 2 mM), $m^7GpppA_{mp}G$ (12 μ l, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), $MgCl_2$ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H_2O MQ (81 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,64 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.2.4 TMG kap-poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), GTP (4 μ l, 2 mM), $m_3^{2,2,7}GpppApG$ (12 μ l, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), $MgCl_2$ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H_2O MQ (81 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,71 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.2.5 GpppApG -poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), GTP (4 μ l, 2 mM), GpppApG (12 μ l, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), $MgCl_2$ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H_2O MQ (81 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,36 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.2.6 NAD kap-poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), GTP (4 μ l, 2 mM), NRppApG (12 μ l, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), $MgCl_2$ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H_2O MQ (81 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,20 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.2.7 FAD kap-poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), GTP (4 μ l, 2 mM), RflvppApG (12 μ l, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), $MgCl_2$ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H_2O MQ (81 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,00 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.2.8 GlcppUpG-poliA-Broccoli

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną L. Mieszanina reakcyjna (200 μ l) składała się z matrycy DNA poliA-Broccoli (4 μ l, 1 μ M), 40 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego, ATP/CTP/UTP (10 μ l, 5 mM), GTP (4 μ l, 2 mM), GlcppUpG (12 μ l, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (5 μ l, 1 U/ μ l), MgCl₂ (4 μ l, 20 mM), polimerazy T7 RNA (20 μ l, 0,1 mg/ml) oraz H₂O MQ (81 μ l). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,21 μ g na 1 μ l reakcji IVT.

12.3 Transkrypcja *in vitro* RNA₃₅

Procedura ogólna M:

5'-kapowane RNA uzyskano w wyniku transkrypcji *in vitro* na matrycy DNA kodującej oligorybonukleotyd o długości 35 podjednostek w sekwencji: 5' – GGGGAAGCGGGCAUGCGG CCAGCCAUAAGCCGAUCA – 3'. Mieszanina reakcyjna (100 μ l) składała się z 1 μ M matrycy DNA, 20 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego (pH 7,9), 5 mM ATP/UTP/CTP oraz 2 mM GTP, 200 U inhibitora RNazy RiboLock, 6 mM odpowiedniego analogu kapu, 20 mM MgCl₂, 0,002 U/ μ l nieorganicznej pirofosfatazy (PPaza), 0,125 mg/ml polimerazy T7 RNA oraz H₂O MQ do całkowitej objętości 100 μ l. Reakcję inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C, a następnie przez 30 minut inkubowano z 10 μ l DNazy I (1 U/ μ l). Reakcję zakończono poprzez dodanie 10 μ l 0,5 M wodnego roztworu EDTA pH 8,0. Uzyskane RNA wstępnie oczyszczono przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (500 μ g), a następnie za pomocą RP-HPLC (Metoda VIII, detekcja przy λ = 260 nm). Tak otrzymane RNA było liofilizowane a następnie rozpuszczane w H₂O MQ do pożądanego stężenia. Jakość RNA sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 15% żelu poliakrylamidowym (PAA/TBE, 50 min, 13 W). Wydajność reakcji IVT mierzono wyznaczając masę uzyskanego RNA po etapie oczyszczania za pomocą HPLC i liofilizacji oraz podawano w μ g RNA uzyskanych z 1 μ l mieszaniny reakcyjnej.

Procedura ogólna N:

5'-kapowane RNA uzyskano w wyniku transkrypcji *in vitro* na matrycy DNA kodującej oligorybonukleotyd o długości 35 podjednostek w sekwencji: 5' – GGGGAAGCGGGCAUGCGG CCAGCCAUAAGCCGAUCA – 3'. Mieszanina reakcyjna (50 μ l) składała się z 1 μ M matrycy DNA, 10 μ l 5 $\times$ buforu transkrypcyjnego (pH 7,9), 3 mM ATP/UTP/CTP oraz 2 mM GTP, 200 U inhibitora RNazy RiboLock, 6 mM odpowiedniego analogu kapu w postaci soli sodowej, 24 mM MgCl₂, 0,002 U/ μ l nieorganicznej pirofosfatazy (PPaza), 0,250 mg/ml polimerazy T7 RNA oraz H₂O MQ do całkowitej objętości 50 μ l. Reakcję inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 37°C, a następnie przez 30 minut inkubowano z 5 μ l DNazy I (1U/ μ l). Reakcję zakończono poprzez dodanie 5 μ l 0,5 M wodnego roztworu EDTA pH 8,0. Uzyskane RNA wstępnie oczyszczono przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (500 μ g), a następnie za pomocą RP-HPLC (Metoda VIII, detekcja przy λ = 260 nm). Tak otrzymane RNA było liofilizowane a następnie rozpuszczane w H₂O MQ do pożądanego stężenia. Jakość RNA sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 15% żelu poliakrylamidowym (PAA/TBE, 50 min, 13 W). Wydajność reakcji IVT mierzono

wyznaczając masę uzyskanego RNA po etapie oczyszczania za pomocą HPLC i liofilizacji oraz podawano w µg RNA uzyskanych z 1 µl mieszaniny reakcyjnej.

Procedura ogólna O:

5'-kapowane RNA uzyskano w wyniku transkrypcji *in vitro* na matrycy DNA kodującej oligorybonukleotyd o długości 35 podjednostek w sekwencji: 5' – GGGGAAGCGGGCAUGCGG CCAGCCAUAGCCGAUCA – 3'. Mieszanina reakcyjna (50 µl) składała się z 1 µM matrycy DNA, 10 µl 5× buforu transkrypcyjnego (pH 6,5), 6 mM ATP/UTP/CTP oraz 4 mM GTP, 200 U inhibitora RNazy RiboLock, 10 mM odpowiedniego analogu kapu, 20 mM MgCl₂, 0,002 U/µl nieorganicznej pirofosfatazy (PPaza), 0,125 mg/ml polimerazy T7 RNA oraz H₂O MQ do całkowitej objętości 50 µl. Reakcję inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 37°C, a następnie przez 30 minut inkubowano z 5 µl DNazy I (1 U/µl). Reakcję zakończono poprzez dodanie 5 µl 0,5 M wodnego roztworu EDTA pH 8,0. Uzyskane RNA wstępnie oczyszczono przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (500 µg), a następnie za pomocą RP-HPLC (Metoda VIII, detekcja przy λ = 260 nm). Tak otrzymane RNA było liofilizowane a następnie rozpuszczane w H₂O MQ do pożądanego stężenia. Jakość RNA sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 15% żelu poliakrylamidowym (PAA/TBE, 50 min, 13 W). Wydajność reakcji IVT mierzono wyznaczając masę uzyskanego RNA po etapie oczyszczania za pomocą HPLC i liofilizacji oraz podawano w µg RNA uzyskanych z 1 µl mieszaniny reakcyjnej.

12.3.1 N₃-kap-0-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M. Mieszanina reakcyjna (100 µl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 µl, 1 µM), 20 µl 5× buforu transkrypcyjnego o pH 7,9, ATP/CTP/UTP (5 µl, 5 mM), GTP (2 µl, 2 mM), N₃-m⁷GpppApG (N₃-kap-0, 6 µl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 µl, 1 U/µl), MgCl₂ (2 µl, 20 mM), PPazy (2 µl, 0,002 U/µl), polimerazy T7 RNA (4 µl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (41,4 µl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,43 µg na 1 µl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 97%.

12.3.2 Cy3-L2_N-kap-0-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M. Mieszanina reakcyjna (100 µl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 µl, 1 µM), 20 µl 5× buforu transkrypcyjnego o pH 7,9, ATP/CTP/UTP (5 µl, 5 mM), GTP (2 µl, 2 mM), Cy3-L2_N-m⁷GpppApG (Cy3-L2_N-kap-0, 6 µl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 µl, 1 U/µl), MgCl₂ (2 µl, 20 mM), PPazy (2 µl, 0,002 U/µl), polimerazy T7 RNA (4 µl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (41,4 µl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność reakcji wynosiła 0,35 µg na 1 µl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 75%.

12.3.3 Cy3-L6_N-kap-0-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M. Mieszanina reakcyjna (100 µl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 µl, 1 µM), 20 µl 5× buforu transkrypcyjnego o pH 7,9, ATP/CTP/UTP (5 µl, 5 mM), GTP (2 µl, 2 mM),

Cy3-L6_N-m⁷GpppApG (Cy3-L6_N-kap-0, 6 μl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 μl, 1 U/μl), MgCl₂ (2 μl, 20 mM), PPazy (2 μl, 0,002 U/μl), polimerazy T7 RNA (4 μl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (41,4 μl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność reakcji wynosiła 0,16 μg na 1 μl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 78%.

12.3.4 Cy3-LPEG2_N-kap-0-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M. Mieszanina reakcyjna (100 μl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 μl, 1 μM), 20 μl 5× buforu transkrypcyjnego o pH 7,9, ATP/CTP/UTP (5 μl, 5 mM), GTP (2 μl, 2 mM), Cy3-LPEG2_N-m⁷GpppApG (Cy3-LPEG2_N-kap-0, 6 μl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 μl, 1 U/μl), MgCl₂ (2 μl, 20 mM), PPazy (2 μl, 0,002 U/μl), polimerazy T7 RNA (4 μl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (41,4 μl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność reakcji wynosiła 0,34 μg na 1 μl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 71%.

12.3.5 sCy5-L2_N-GpppApG-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M. Mieszanina reakcyjna (100 μl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 μl, 1 μM), 20 μl 5× buforu transkrypcyjnego o pH 7,9, ATP/CTP/UTP (5 μl, 5 mM), GTP (2 μl, 2 mM), sCy5-L2_N-GpppApG (6 μl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 μl, 1 U/μl), MgCl₂ (2 μl, 20 mM), PPazy (2 μl, 0,002 U/μl), polimerazy T7 RNA (4 μl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (41,4 μl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność reakcji wynosiła 0,56 μg na 1 μl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 83%.

12.3.6 NRpp-glButyn-sCy5-pApG-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M, wprowadzając drobne modyfikacje. Mieszanina reakcyjna (100 μl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 μl, 1 μM), 10 μl 10× buforu transkrypcyjnego o pH 6,5, ATP/CTP/UTP (6 μl, 6 mM), GTP (2 μl, 2 mM), NRpp-glButyn-sCy5-pApG (6 μl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 μl, 1 U/μl), MgCl₂ (2 μl, 20 mM), PPazy (2 μl, 0,002 U/μl), polimerazy T7 RNA (4 μl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (48,4 μl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 0,24 μg na 1 μl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 80%.

12.3.7 (5)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną N. Mieszanina reakcyjna (50 μl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (2,5 μl, 1 μM), 10 μl 5× buforu transkrypcyjnego o pH 7,9, ATP/CTP/UTP (1,5 μl, 3 mM), GTP (1 μl, 2 mM), (5)-FAM-C3-ppApG (6 μl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (1,25 μl, 1 U/μl), MgCl₂ (6 μl, 24 mM), PPazy (1 μl, 0,002 U/μl), polimerazy T7 RNA (3,75 μl, 0,250 mg/ml) oraz H₂O MQ (14 μl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność reakcji wynosiła 1,40 μg na 1 μl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 72%.

12.3.8 (6)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną N. Mieszanina reakcyjna (50 µl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (2,5 µl, 1 µM), 10 µl 5× buforu transkrypcyjnego o pH 7,9, ATP/CTP/UTP (1,5 µl, 3 mM), GTP (1 µl, 2 mM), (6)-FAM-C3-ppApG (6 µl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (1,25 µl, 1 U/µl), MgCl₂ (6 µl, 24 mM), PPazy (1 µl, 0,002 U/µl), polimerazy T7 RNA (3,75 µl, 0,250 mg/ml) oraz H₂O MQ (14 µl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność reakcji wynosiła 1,37 µg na 1 µl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 69%.

12.3.9 NRpp-glN₃-pApG-RNA₃₅ D1

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M, wprowadzając drobne modyfikacje. Mieszanina reakcyjna (100 µl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 µl, 1 µM), 10 µl 10× buforu transkrypcyjnego o pH 6,5, ATP/CTP/UTP (6 µl, 6 mM), GTP (2 µl, 2 mM), N₃-NRppApG D1 (6 µl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 µl, 1 U/µl), MgCl₂ (2 µl, 20 mM), PPazy (2 µl, 0,002 U/µl), polimerazy T7 RNA (4 µl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (48,4 µl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 1,02 µg na 1 µl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 86%.

12.3.10 NRpp-glN₃-pApG-RNA₃₅ D2

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną M, wprowadzając drobne modyfikacje. Mieszanina reakcyjna (100 µl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (5 µl, 1 µM), 10 µl 1× buforu transkrypcyjnego o pH 6,5, ATP/CTP/UTP (6 µl, 6 mM), GTP (2 µl, 2 mM), N₃-NRppApG D2 (6 µl, 6 mM), inhibitora RNazy RiboLock (2,6 µl, 1 U/µl), MgCl₂ (2 µl, 20 mM), PPazy (2 µl, 0,002 U/µl), polimerazy T7 RNA (4 µl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (48,4 µl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność wynosiła 0,98 µg na 1 µl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 84%.

12.3.11 N₃-NAc-GlcppUpG-RNA₃₅

Reakcję przeprowadzono zgodnie z Procedurą ogólną O. Mieszanina reakcyjna (50 µl) składała się z matrycy DNA kodującej transkrypt o długości 35 nukleotydów (2,5 µl, 1 µM), 5 µl 10× buforu transkrypcyjnego o pH 6,5, ATP/CTP/UTP (3 µl, 6 mM), GTP (2 µl, 4 mM), N₃-NAc-GlcppUpG (5 µl, 10 mM), inhibitora RNazy RiboLock (1,25 µl, 1 U/µl), MgCl₂ (1 µl, 20 mM), PPazy (1 µl, 0,002 U/µl), polimerazy T7 RNA (1,9 µl, 0,125 mg/ml) oraz H₂O MQ (21,4 µl). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Uzyskana wydajność reakcji wynosiła 1,81 µg na 1 µl reakcji IVT, poziom kapowania RNA wynosił 95%.

12.4 Znakowanie posttranskrypcyjne RNA₃₅ na końcu 5'

12.4.1 SPAAC

Procedura ogólna P:

Posttranskrypcyjne znakowanie końca 5' RNA przeprowadzono z zastosowaniem reakcji SPAAC. Mieszanina reakcyjna (30 µl) zawierała wodny roztwór N₃-kap-0-RNA₃₅ (o stężeniu końcowym wynoszącym minimum 10 µM), 100-krotny nadmiar odpowiedniego barwnika, zawierającego linker w postaci pochodnej cyklooktynu i zawieszonego w DMSO (objętość DMSO nie może przekraczać 50% objętości końcowej reakcji) oraz 5 µl 1 M buforu fosforanowego o pH 6,2. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 h w 20°C, przy ograniczonym dostępie do światła. Reakcję zakończono poprzez 5-krotne rozcieńczenie H₂O MQ. Uzyskane RNA wstępnie oczyszczono przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (500 µg), a następnie za pomocą RP-HPLC (Metoda IX, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długościach fal odpowiadających maksimum absorpcji obu barwników). Tak otrzymane RNA było liofilizowane a następnie rozpuszczane w H₂O MQ do pożądanego stężenia. Jakość sondy sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 15% żelu poliakrylamidowym (PAA/TBE, 50 min, 13 W). Wydajność końcową reakcji wyznaczano spektrofotometrycznie.

12.4.1.1 *sCy5-DBCO-kap-0-RNA₃₅*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej P. Mieszanina reakcyjna (30,0 µl) zawierała wodny roztwór N₃-kap-0-RNA₃₅ (22,8 µl, 114 µM), roztwór sCy5-DBCO (2,30 µl, 11,4 mM) w DMSO oraz 5,00 µl 1 M buforu fosforanowego o pH 6,2. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 h w 20°C, przy ograniczonym dostępie do światła. Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 60%.

12.4.1.2 *sCy3-DBCO-kap-0-RNA₃₅*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej P. Mieszanina reakcyjna (30,0 µl) zawierała wodny roztwór N₃-kap-0-RNA₃₅ (22,8 µl, 114 µM), roztwór sCy3-DBCO (2,30 µl, 11,4 mM) w DMSO oraz 5,00 µl 1 M buforu fosforanowego o pH 6,2. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 h w 20°C, przy ograniczonym dostępie do światła. Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 58%.

12.4.1.3 *NRpp-gl-DBCO-sCy5-pApG-RNA₃₅, izomer D1/D2*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej P. Mieszanina reakcyjna (30 µl) zawierała wodny roztwór N₃-NRppApG-RNA₃₅ (D1 oraz D2) (20 µl, 10 µM), roztwór sCy5-DBCO (5,0 µl, 1 mM) w DMSO oraz 5,0 µl 1 M buforu fosforanowego o pH 6,2. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 h w 20°C, przy ograniczonym dostępie do światła. Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła odpowiednio: 43% dla izomeru D1 i 40% dla izomeru D2.

12.4.1.4 *sCy5-NAc-GlcppUpG-RNA₃₅*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej P. Mieszanina reakcyjna (30,0 µl) zawierała wodny roztwór N₃-NAc-GlcppUpG-RNA₃₅ (22,5 µl, 114 µM), roztwór sCy5-DBCO

(2,50 μ l, 11,4 mM) w DMSO oraz 5,00 μ l 1 M buforu fosforanowego o pH 6,2. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 h w 20°C, przy ograniczonym dostępie do światła. Dalsze etapy izolacji i oczyszczania RNA przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 47%.

12.5 Znakowanie końca 3' RNA₃₅

12.5.1 Ligacja

Procedura ogólna R:

Wszystkie reakcje ligacji dinukleotydów pApA-EDA-barwnik do RNA przeprowadzano z udziałem enzymu Ligazy T4 RNA 1 oraz dołączonych do zestawu przez producenta (ThermoFisher Scientific) roztworów. Odpowiednie 5'-kapowane oraz znakowane RNA (10 μ l, 10-100 μ M) przeniesiono do probówki typu eppendorf. Dodano 10 $\times$ bufor Tris-HCl (10 μ l, 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5) i dokładnie wymieszano za pomocą pipety automatycznej. Do mieszaniny dodano 10 μ l DMSO, wodny roztwór ATP (10 μ l, 1 mM), roztwór DTT (3,3 μ l, 3,3 mM), roztwór pApA-EDA-barwnik (100 $\times$ nadmiar w stosunku do RNA), 1,2 U/ μ l inhibitora RNazy RiboLock, 1 U/ μ l Ligazy T4 RNA 1 oraz H₂O MQ do objętości końcowej wynoszące 100 μ l. Probówkę z zawartością przeniesiono na 16 h do inkubatora (20°C) zachowując ograniczony dostęp do światła. Reakcję zakończono poprzez 2-krotne rozcieńczenie H₂O MQ. Uzyskaną sondę wstępnie oczyszczono przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (500 μ g), a następnie za pomocą RP-HPLC (Metoda IX, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długości fal odpowiadających maksimum absorpcji obu barwników). Tak otrzymane RNA było liofilizowane a następnie rozpuszczane w H₂O MQ do pożądanego stężenia. Jakość sondy sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 15% żelu poliakrylamidowym (PAA/TBE, 50 min, 13 W). Wydajność końcową reakcji wyznaczano spektrofotometrycznie.

12.5.1.1 *Cy3-L2_N-kap-0-RNA₃₅-pApA-EDA-Cy5*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 μ l) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-Cy5 (1,5 μ l, 3,0 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, Cy3-L2_N-kap0-RNA₃₅ (10 μ l, 30 μ M). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 73%.

12.5.1.2 *sCy3-DBCO-kap-0-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy5*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 μ l) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy5 (2,5 μ l, 5,0 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, sCy3-DBCO-kap0-RNA₃₅ (10 μ l, 50 μ M). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 81%.

12.5.1.3 *sCy5-DBCO-kap-0-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy3*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 μ l) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy3 (3,2 μ l, 6,4 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, sCy5-DBCO-kap0-RNA₃₅ (10 μ l, 64 μ M). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 65%.

12.5.1.4 *sCy5-NAc-GlcppUpG-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy3*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 µl) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy3 (5,0 µl, 10 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, sCy5-NAc-GlcppUpG-RNA₃₅ (10 µl, 100 µM). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 72%.

12.5.1.5 *sCy5-L2_N-GpppApG-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy3*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 µl) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy3 (1,0 µl, 2,0 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, sCy5-L2_N-GpppApG-RNA₃₅ (10 µl, 20 µM). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 69%.

12.5.1.6 *NRpp-gl-DBCO-sCy5-pApG-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy3 (izomer D1/D2)*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 µl) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy3 (0,5 µl, 1,0 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, NRpp-gl-DBCO-sCy5-pApG-RNA₃₅ (izomer D1/D2) (10 µl, 10 µM). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność obu reakcji wyniosła 54%.

12.5.1.7 *NRpp-glButyn-sCy5-pApG-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy3*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 µl) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy3 (0,75 µl, 1,5 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, NRpp-glButyn-sCy5-pApG-RNA₃₅ (10 µl, 15 µM). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 49%.

12.5.1.8 *(5)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy5*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 µl) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy5 (0,75 µl, 4,5 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, (5)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅ (10 µl, 45 µM). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 84%.

12.5.1.9 *(6)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅-pApA-EDA-sCy5*

Reakcję przeprowadzono według Procedury ogólnej R. Do reakcji (100 µl) zastosowano znakowany dinukleotyd pApA-EDA-sCy5 (0,75 µl, 4,5 mM) oraz 5'-kapowane oraz znakowane RNA, (6)-FAM-C3-ppApG-RNA₃₅ (10 µl, 45 µM). Dalsze etapy izolacji i oczyszczania sondy przebiegały zgodnie z w/w procedurą. Wydajność reakcji wyniosła 82%.

12.6 Jednoczesne znakowanie RNA₃₅ na końcu 5' oraz 3' – reakcja SPAAC + PORA

12.6.1 BHQ-2-DBCO-kap-0-RNA₃₅-EDA-Janelia Fluor 549

Do probówki typu eppendorf zawierającej N₃-kap-0-RNA₃₅ (50 µg, 13,5 µl, 3,7 µg/µl) dodano H₂O MQ (5 µl), 5 µl buforu fosforanowego (o wyjściowym składzie: 0,8 M KH₂PO₄

pH 7,0, 0,2 M NaCl, 10×) oraz 10 mM świeżo przygotowany roztwór wodny NaIO₄ (10 µl) i inkubowano przez 25 min w 25°C. Następnie do roztworu dodano 20 mM roztwór BHQ-2-DBCO (5 µl) w DMSO, 10 mM roztwór JF549-EDA (5 µl) w DMSO i 200 mM świeżo przygotowany roztwór wodny NaBH₃CN (5 µl). Probówkę z zawartością przeniesiono na 4,5 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (400 rpm) i przy ograniczonym dostępie do światła. Uzyskane RNA wstępnie oczyszczono przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (500 µg), a następnie za pomocą RP-HPLC (Metoda IX, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długości fal odpowiadających maksimum absorpcji obu barwników). Tak otrzymane RNA było liofilizowane a następnie rozpuszczane w H₂O MQ do pożądanego stężenia. Jakość sondy sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 15% żelu poliakrylamidowym (PAA/TBE, 50 min, 13 W). Wydajność końcowa reakcji (po etapie oczyszczania za pomocą HPLC i liofilizacji) wynosiła 51%.

12.6.2 BHQ-3-DBCO-kap-0-RNA₃₅-EDA-Janelia Fluor 646

Do próbki typu eppendorf zawierającej N₃-kap-0-RNA₃₅ (50 µg, 13,5 µl, 3,7 µg/µl) dodano H₂O MQ (5 µl), 5 µl buforu fosforanowego (o wyjściowym składzie: 0,8 M KH₂PO₄ pH 7,0, 0,2 M NaCl, 10×) oraz świeżo przygotowany 10 mM roztwór wodny NaIO₄ (5 µl) i inkubowano przez 25 min w 25°C. Następnie do roztworu dodano 104 mM roztwór BHQ-3-DBCO (0,96 µl) w DMSO, 10 mM roztwór JF646-EDA (5 µl) w DMSO i świeżo przygotowany 200 mM roztwór wodny NaBH₃CN (5 µl). Probówkę z zawartością przeniesiono na 5 h do inkubatora (25°C) z funkcją wytrząsania (400 rpm) i przy ograniczonym dostępie do światła. Uzyskane RNA wstępnie oczyszczono przy użyciu zestawu Monarch® RNA Cleanup Kit (500 µg), a następnie za pomocą RP-HPLC (Metoda IX, detekcja przy λ = 260 nm oraz przy długości fal odpowiadających maksimum absorpcji obu barwników). Tak otrzymane RNA było liofilizowane a następnie rozpuszczane w H₂O MQ do pożądanego stężenia. Jakość sondy sprawdzano wykonując analizę elektroforetyczną na 15% żelu poliakrylamidowym (PAA/TBE, 50 min, 13 W). Wydajność końcowa reakcji (po etapie oczyszczania za pomocą HPLC i liofilizacji) wynosiła 11%.

13. Test FLINT

13.1 Informacje ogólne

Enzymy oraz odczynniki potrzebne do przeprowadzenia testu FLINT pochodziły z następujących źródeł: Xrn1/NEBuffer 3 (10×), EcRppH oraz 5'-polyPH (New England BioLabs), ligand DFHBI-1T (LuceRNA), APB, APS oraz TEMED (Sigma Aldrich), SYBR Gold (Invitrogen).

Za ekspresję białek mDXO, hDcp2/Dcp1, hDcp2(E148Q)-Dcp1, hNUDT16, VACV D9 odpowiedzialny był mgr. Tomasz Śpiewła.

Procedurę zwijania aptamerów z ligandem przeprowadzano na termocyklerze (BioRad). Odczyt intensywności fluorescencji prowadzono na czytniku mikropłytek Synergy H1 (BioTek), wykorzystując 96-dółkowe, czarne mikropłytki (Greiner Bio-One). Wizualizację żeli poliakrylamidowych przeprowadzano na aparacie Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

13.1.1 Degradacja RNA przez enzymy dekapujące i Xrn1

Sondy aptamerowe powstałe w wyniku transkrypcji *in vitro* rozdzielono na mniejsze porcje, z których każda zawierała 2,0 µg RNA rozpuszczonego w 20 µl H₂O MQ. Aby zapewnić całkowite rozwinięcie struktur drugorzędowych, próbki ogrzewano do 90°C przez 2 minuty, a następnie schładzano na lodzie przez kolejne 2 minuty. Następnie dodano bufor reakcyjny (NEBuffer 3: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9) oraz roztwór enzymu dekapującego do końcowego stężenia 50 nM. Próbkę inkubowano następnie przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie dodano 2 µl Xrn1 (1 U na 1 µg RNA) i próbki inkubowano przez kolejne 30 minut. Finalna objętość każdej z próbek wynosiła 30 µl. Aktywność enzymów wygaszono poprzez ogrzewanie próbek w 90°C przez 2 minuty a następnie schłodzenie ich na lodzie przez kolejne 2 minuty.

13.1.2 Tworzenie kompleksu aptamer-ligand

Po zatrzymaniu reakcji dekapingu i aktywności enzymatycznej Xrn1, do próbek dodano bufor Tris-HCl (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 125 mM KCl), 5 mM MgCl₂, oraz 10 µM DFHBI-1T. Końcowa objętość każdej próbki wynosiła 150 µl. Próbkę podgrzano do 65°C a następnie powoli ochładzano (1°C/min) do temperatury 25°C.

13.1.3 Pomiary intensywności fluorescencji

Po procedurze ponownego zwijania sondy z ligandem DFHBI-1T, próbki przeniesiono na 96-dółkową czarną mikropłytkę (Greiner Bio-One). Odczyty intensywności fluorescencji przeprowadzono przy użyciu czytnika mikropłytek Synergy H1 (BioTek) w RT, przy długości fali wzbudzenia 472 nm i długości fali emisji 507 nm.

13.1.4 Walidacja za pomocą elektroforezy żelowej z powinowactwem do APB

Po degradacji enzymatycznej i pomiarach emisji fluorescencji, próbki były dalej badane za pomocą elektroforezy żelowej z powinowactwem do APB. Każdy eksperyment został przeanalizowany i zweryfikowany poprzez ocenę intensywności pasma i odległości migracji od odpowiedniej próbki RNA. 1% v/v APB dodano do 20% roztworu akryloamidu/bisakryloamidu (19:1) i inkubowano w 65°C aż do całkowitego rozpuszczenia. Następnie roztwór schłodzono RT i rozcieńczono roztworem 7 M mocznik/1×TBE do 15% akrylamidu. Dodano nadsiarżan amonu (APS) i TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametyloetano-1,2-diamina) i pozostawiono roztwór do polimeryzacji na 40 minut. Po elektroforezie żele barwiono za pomocą SYBR Gold (Invitrogen) i wizualizowano na aparacie Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

13.1.5 Kinetyczny test dekapingu

50 nM hDcp2/Dcp1 inkubowano z substratem reakcji, sondą kap-1-poliA-Broccoli w czterech punktach czasowych: 0, 15, 30 i 60 minut, a następnie dodano 1 U Xrn1 na 1 µg RNA w buforze reakcyjnym (NEBuffer 3) i ponownie inkubowano przez 30 minut. Zastosowano następujące stężenia substratu [µM]: 0, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 5,0. Po każdym punkcie czasowym reakcję natychmiast przerywano przez ogrzewanie w temperaturze 90°C przez 5 minut. W kolejnym etapie przeprowadzono tworzenie kompleksu aptamer-ligand i pomiar intensywności fluorescencji, których procedury zostały opisane powyżej. Początkowe

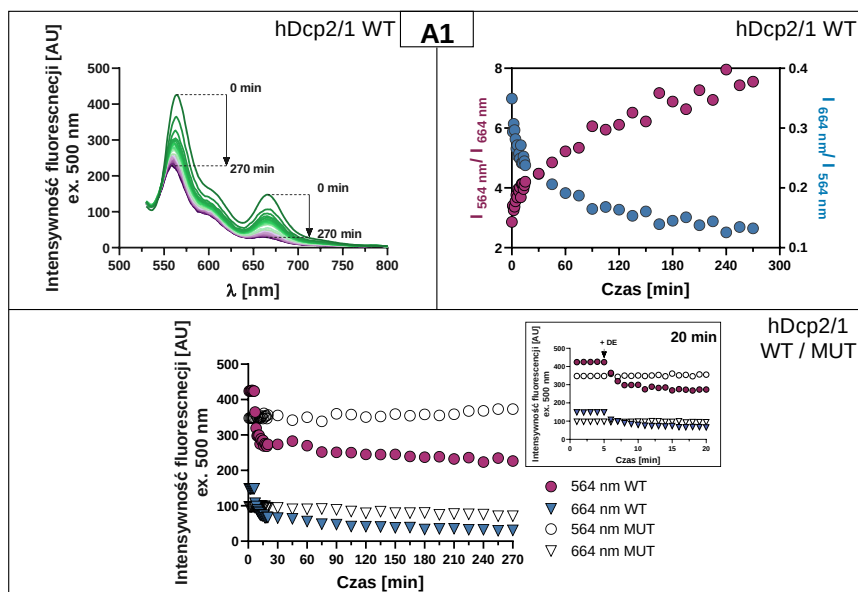
szybkości reakcji określono na podstawie względnego spadku intensywności fluorescencji poprzez dopasowanie równania regresji liniowej do każdego stężenia substratu, w porównaniu do próbki kontrolnej traktowanej samym Xrn1 (bez hDcp2/Dcp1) i wykreślono względem początkowego stężenia RNA. Szybkość reakcji określono w 4 punktach czasowych: 0, 15, 30 i 60 minut (GraphPad Prism). Dopasowanie równania Michaelisa-Menten do tego zestawu danych dostarczyło parametrów kinetycznych badanej reakcji dekapingu:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

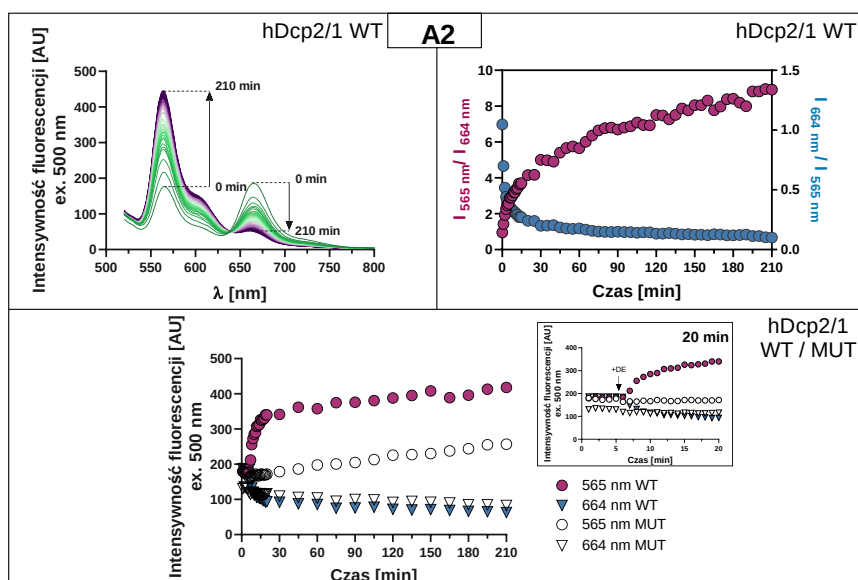
gdzie V_{max} – maksymalna szybkość reakcji (asymptota pozioma), K_M – stężenie substratu przy 50% V_{max} , $[S]$ – stężenie substratu. Przy maksymalnej szybkości, $V_{max} = k_{cat}[E]_0$, gdzie k_{cat} jest liczbą obrotową, tj. maksymalną liczbą cząsteczek na cząsteczkę enzymu w jednostce czasu, a $[E]_0$ jest początkowym stężeniem enzymu.

14. Pomiary na spektrofлуorymetrze

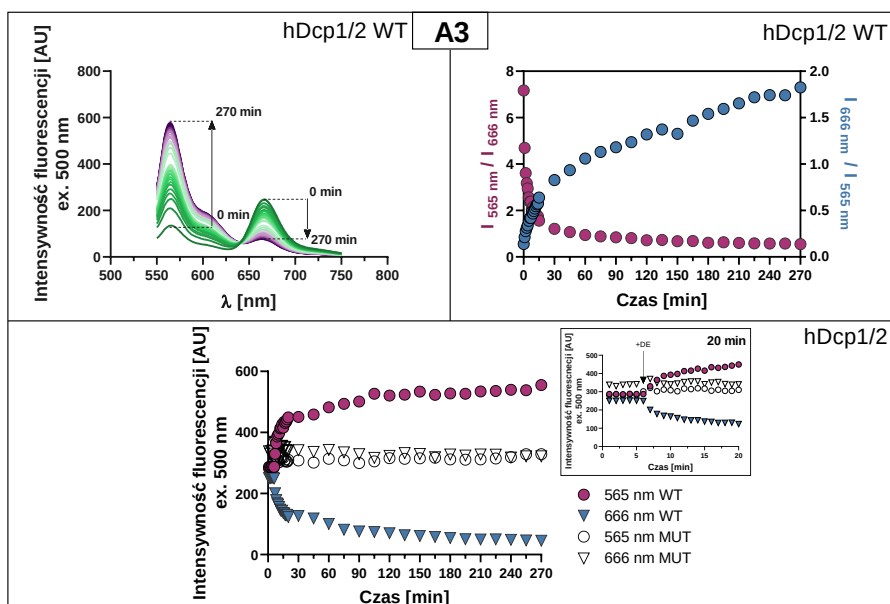
Wszystkie etapy przygotowania próbek oraz pomiary były prowadzone przy możliwie ograniczonym dostępie do światła. Odpowiednią podwójnie znakowaną sondę RNA rozpuszczono w buforze reakcyjnym (4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA), do uzyskania końcowego stężenia wynoszącego 60 lub 120 nM. Roztwór sondy (50 μ l) ogrzewano do temperatury 60°C (5 min) a następnie powoli schładzano do RT (1°C/min). Próbkę inkubowano na lodzie przez 5 min a następnie rozcieńczono buforem reakcyjnym (objętość końcowa 200 μ l) oraz dodano 1 mM (dla hDcp2/Dcp1) oraz 1 mM lub 5 mM $MgCl_2$ (dla mDXO). Tak przygotowaną próbkę przeniesiono do kwarcowej kuwety o wymiarach 3 $\times$ 3 $\times$ 42,5 mm i pojemności 300 μ l. Widmo fluorescencyjne rejestrowano w temperaturze 20°C, przy odpowiednio dobranych do barwników długościach fal oraz szczelinie wynoszącej 10 nm. Przed właściwym pomiarem widmo stabilizowano przez minimum 5 minut. Do kuwety dodano enzym hDcp2/Dcp1 (10 nM) lub mDXO (5 nM, 50 nM lub 120 nM) i rejestrowano zmiany intensywności fluorescencji w czasie przebiegu reakcji, trwającej minimum 3 h. Końcowy wynik stanowi uśrednienie z trzech następujących po sobie pomiarów.



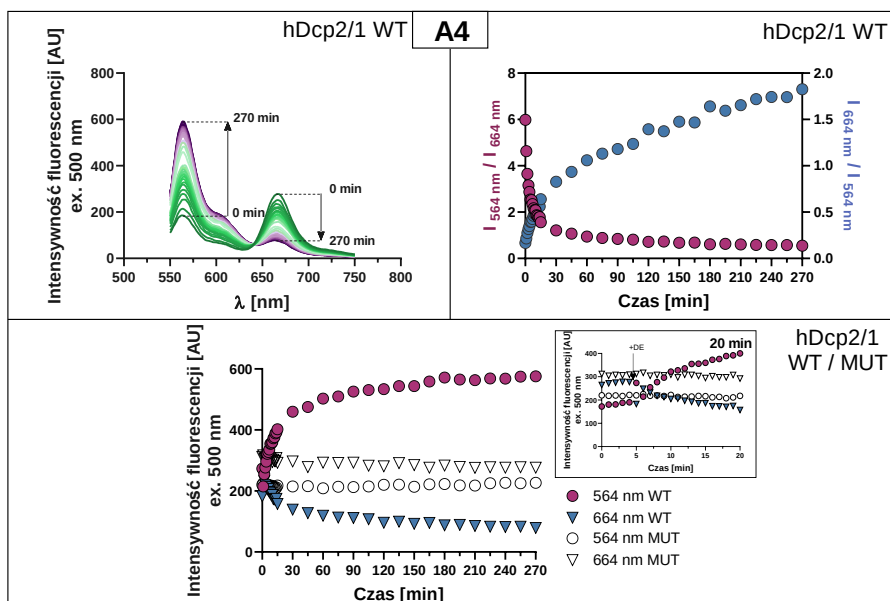
Rysunek U. 1 Zmiany intensywności fluorescencji sondy A1 w wyniku aktywności enzymu hDcp2/Dcp1. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



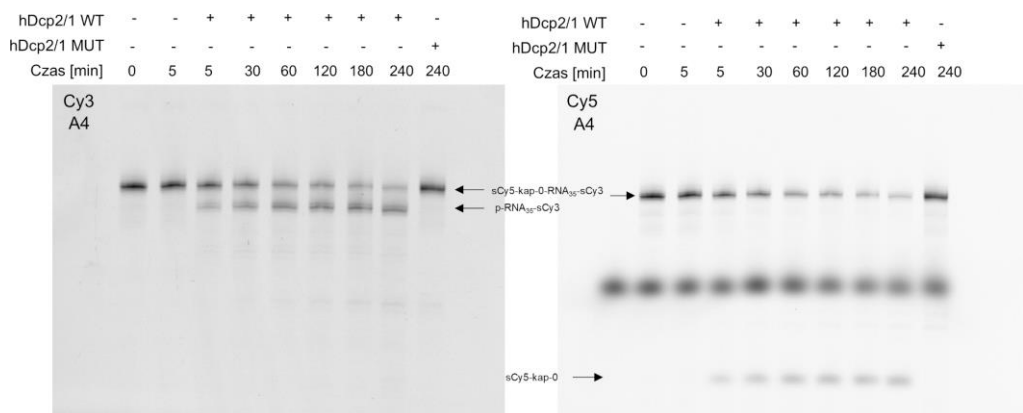
Rysunek U. 2 Zmiany intensywności fluorescencji sondy A2 w wyniku aktywności enzymu hDcp2/Dcp1. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



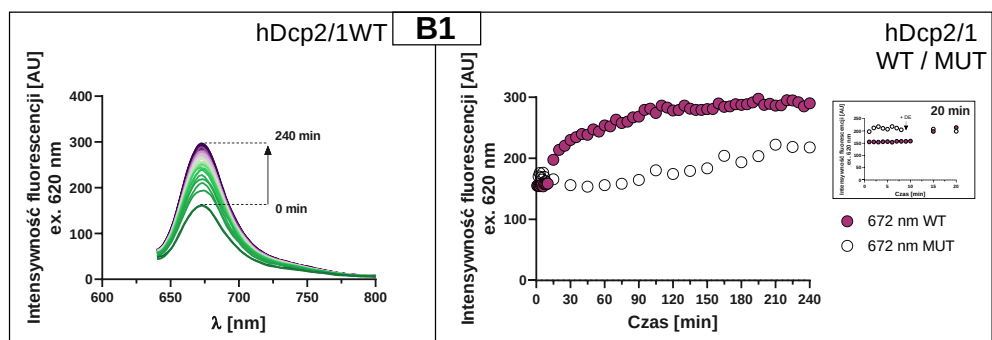
Rysunek U. 3 Zmiany intensywności fluorescencji sondy A3 w wyniku aktywności enzymu hDcp2/Dcp1. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



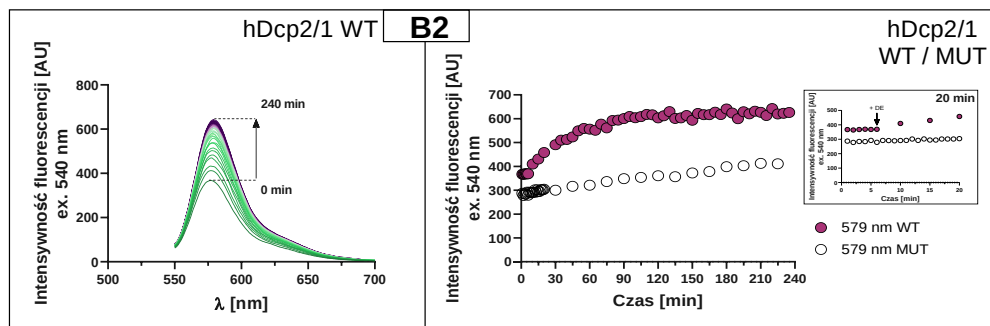
Rysunek U. 4 Zmiany intensywności fluorescencji sondy A4 w wyniku aktywności enzymu hDcp2/Dcp1. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



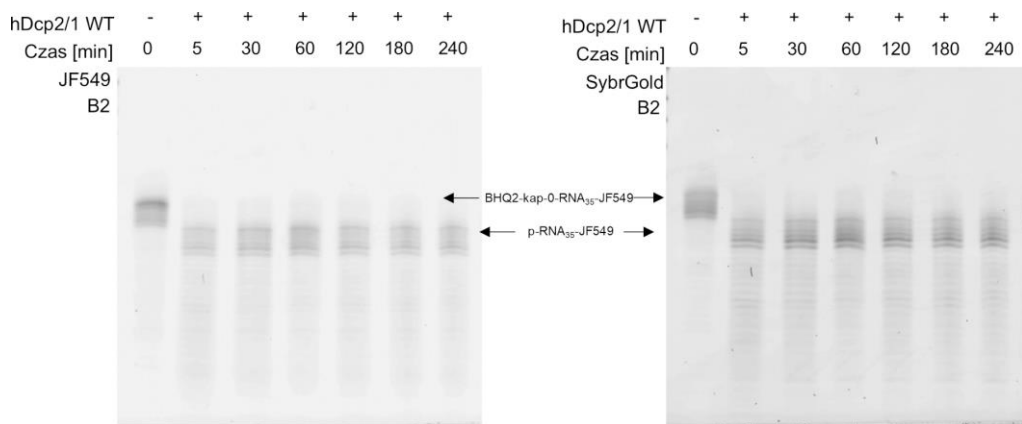
Rysunek U. 5 Wizualizacja dekapingu sondy A4 (hDcp2/Dcp1) za pomocą elektroforezy żelowej (PAGE).



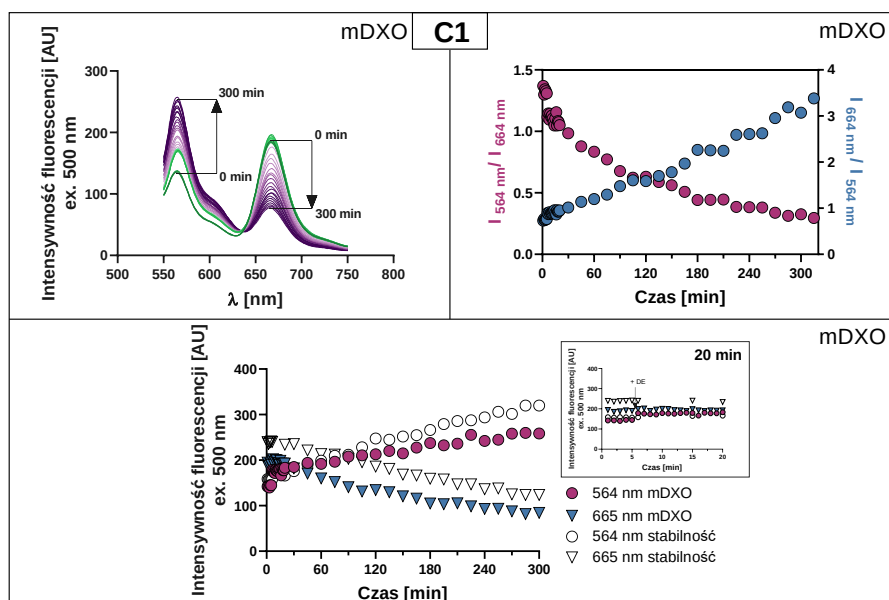
Rysunek U. 6 Zmiany intensywności fluorescencji sondy B1 w wyniku aktywności enzymu hDcp2/Dcp1. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



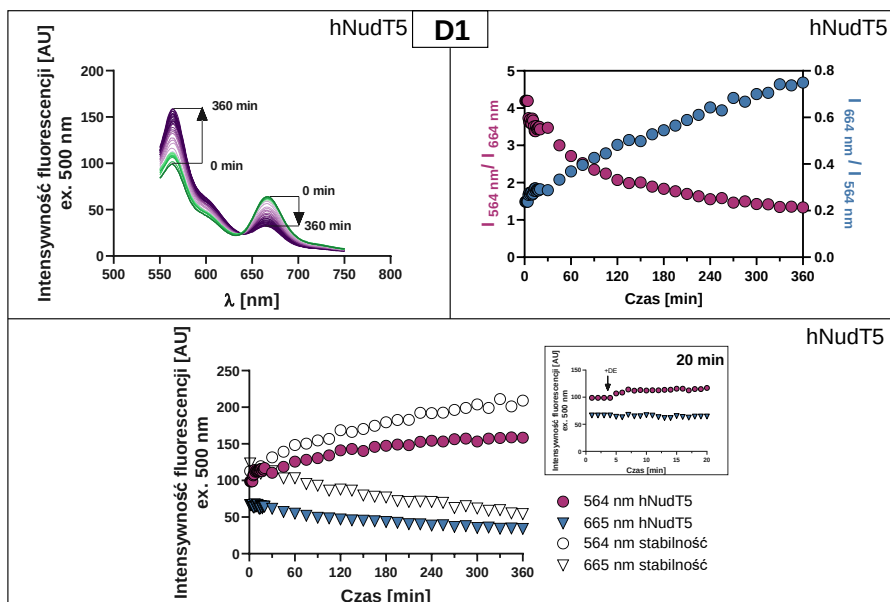
Rysunek U. 7 Zmiany intensywności fluorescencji sondy B2 w wyniku aktywności enzymu hDcp2/Dcp1. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



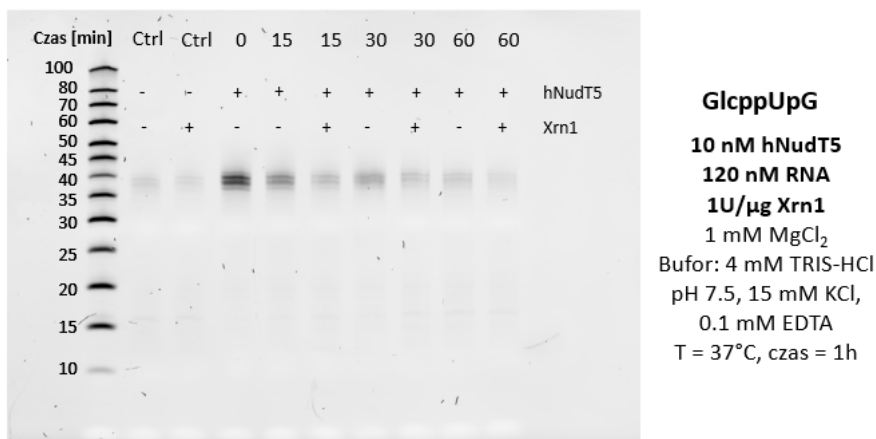
Rysunek U. 8 Wizualizacja dekapingu sondy B2 (hDcp2/Dcp1) za pomocą elektroforezy żelowej (PAGE).



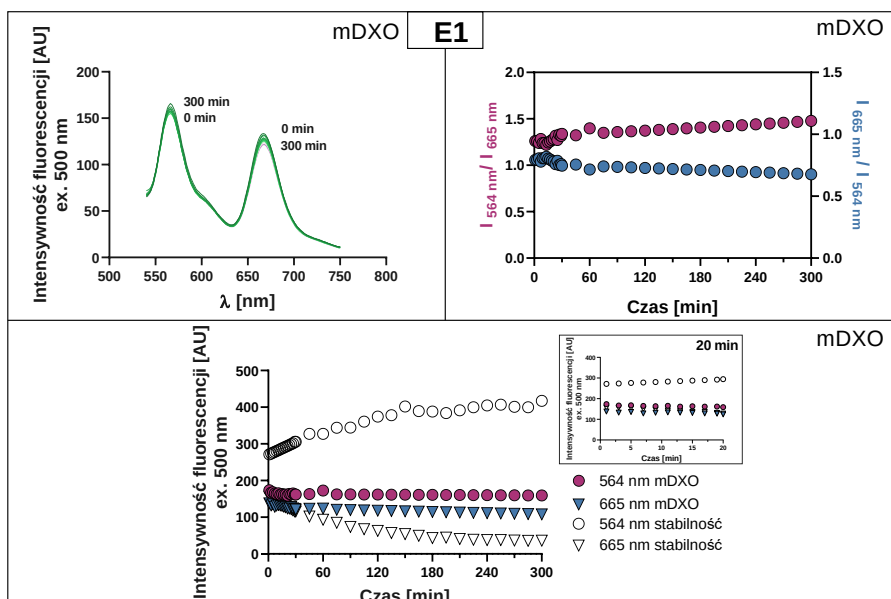
Rysunek U. 9 Zmiany intensywności fluorescencji sondy C1 w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 1,2-krotnie wyższe od stężenia DE (50 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



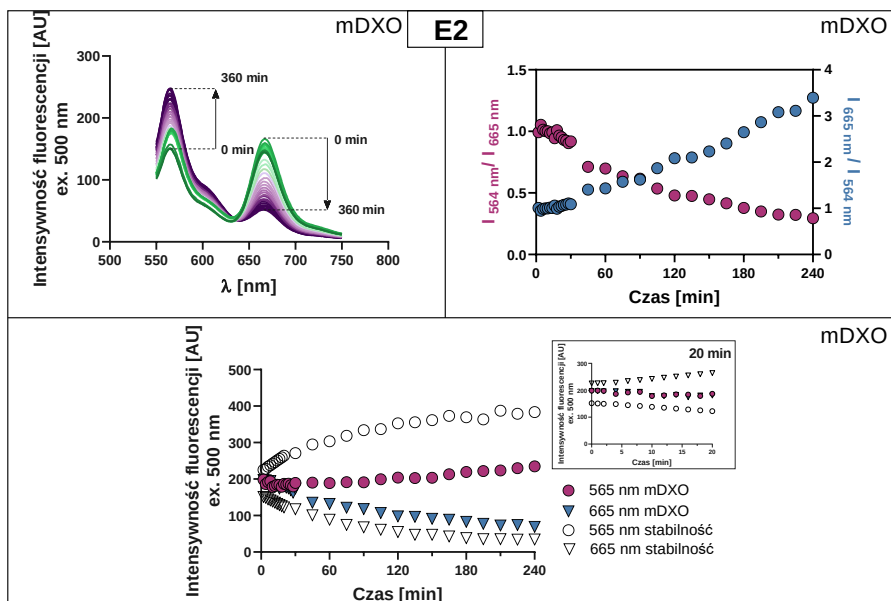
Rysunek U. 12 Zmiany intensywności fluorescencji sondy D1 w wyniku aktywności enzymu hNudT5. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 1,2-krotnie wyższe od stężenia DE (50 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



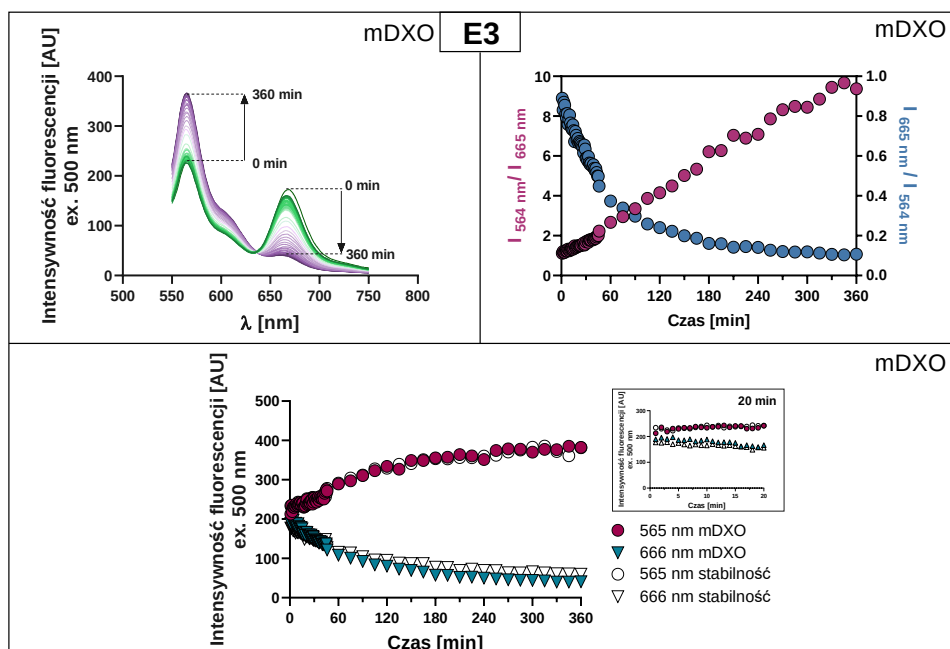
Rysunek U. 13 Analiza elektroforetyczna (15% PAGE) degradacji RNA zakończonego kapem GlcppUpG przez enzym hNUDT5.



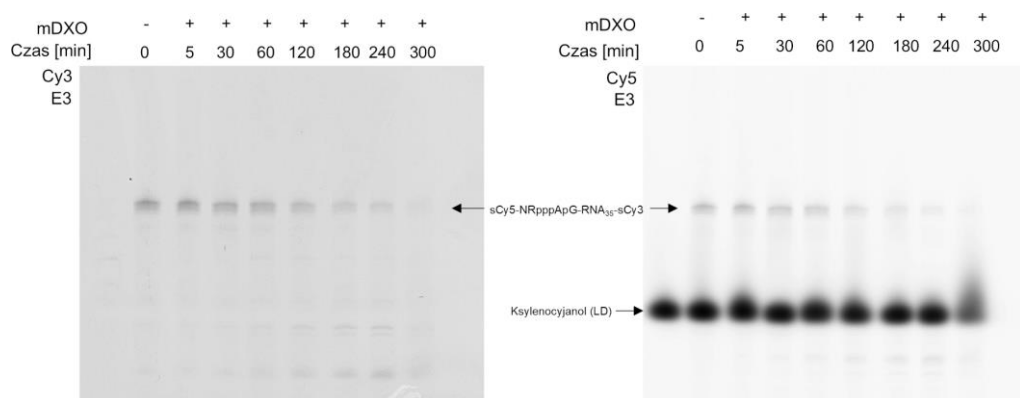
Rysunek U. 14 Zmiany intensywności fluorescencji sondy E1 w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 1,2-krotnie wyższe od stężenia DE (50 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



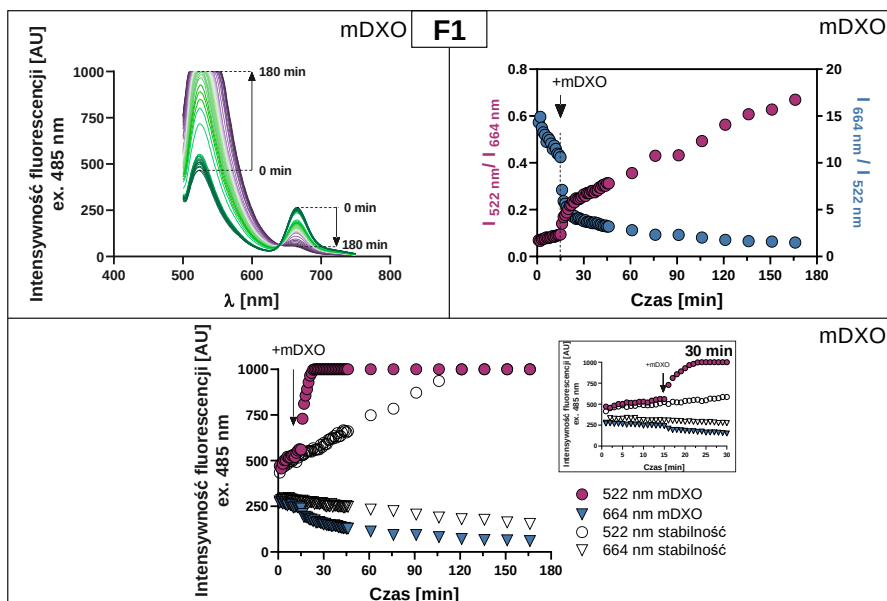
Rysunek U. 15 Zmiany intensywności fluorescencji sondy E2 w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 1,2-krotnie wyższe od stężenia DE (50 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



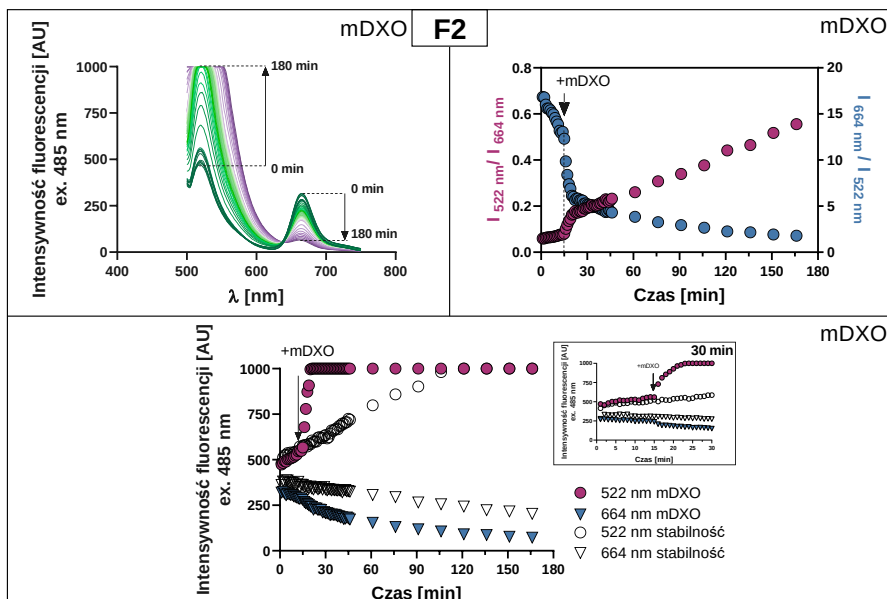
Rysunek U. 16 Zmiany intensywności fluorescencji sondy E3 w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 120 nM i było 12-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



Rysunek U. 17 Wizualizacja dekapiingu sondy E3 (mDXO) za pomocą elektroforezy żelowej (PAGE).



Rysunek U. 18 Zmiany intensywności fluorescencji sondy F1 w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.



Rysunek U. 19 Zmiany intensywności fluorescencji sondy F2 w wyniku aktywności enzymu mDXO. Stężenie sondy RNA wynosiło 60 nM i było 6-krotnie wyższe od stężenia DE (10 nM). Pomiar był prowadzony w buforze 4 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ w temperaturze 20°C.

Bibliografia

1. Stryer, L., Tymoczko, J. & Berg, J. Biochemia. (2007).
2. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 1**, 17–29 (2006).
3. Mattick, J. S. Challenging the dogma: The hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays* **25**, 930–939 (2003).
4. Kühn, U. *et al.* Poly(A) tail length is controlled by the nuclear Poly(A)-binding protein regulating the interaction between Poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 22803–22814 (2009).
5. Rauhut, R. & Klug, G. mRNA degradation in bacteria. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00404.x.
6. Ben-Ari, Y. *et al.* The life of an mRNA in space and time. *J Cell Sci* **123**, 1761–1774 (2010).
7. Hirose, Y. & Manley, J. L. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**, 1415–1429 (2000).
8. Martinez-Rucobo, F. W. *et al.* Molecular Basis of Transcription-Coupled Pre-mRNA Capping. *Mol Cell* **58**, 1079–1089 (2015).
9. Bentley, D. L. Rules of engagement: Co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 251–256 (2005).
10. Ramanathan, A., Robb, G. B. & Chan, S. H. mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* **44**, 7511–7526 (2016).
11. De Conti, L., Baralle, M. & Buratti, E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 49–60 (2013).
12. Colgan, D. F. & Manley, J. L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* **11**, 2755–2766 (1997).
13. Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–2 (2011).
14. Furuichi, Y. & Shatkin, A. J. Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv Virus Res* **55**, 135–184 (2000).
15. Shuman, S. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nature Reviews* **3**, 619–625 (2002).
16. Chu, C. *et al.* Structure of the guanylyltransferase domain of human mRNA capping enzyme. *PNAS* **108**, 10104–10108 (2011).

17. Smietanski, M. *et al.* Structural analysis of human 2'-O-ribose methyltransferases involved in mRNA cap structure formation. *Nat Commun* **5**, (2014).
18. Werner, M. *et al.* 2'-O-ribose methylation of cap2 in human: Function and evolution in a horizontally mobile family. *Nucleic Acids Res* **39**, 4756–4768 (2011).
19. Mer Wei, C., Gershowitz, A. & Bernard Moss, B. 5'-Terminal and Internal Methylated Nucleotide Sequences in HeLa Cell mRNA. *Biochemistry* **15**, 397–401 (1976).
20. Wei, C.-M., Gershowitz, A. & Moss, B. N⁶, O^{2'}-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to the 5'-terminal of animal cell and virus mRNAs. *Nature* **257**, 251–253 (1975).
21. Huang, W. *et al.* N⁶-methyladenosine methyltransferases: functions, regulation, and clinical potential. *J Hematol Oncol* **14**, (2021).
22. Warminski, M., Sikorski, P. J., Kowalska, J. & Jemielity, J. Applications of Phosphate Modification and Labeling to Study (m)RNA Caps. *Top Curr Chem* **375**, (2017).
23. Daffis, S. *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **468**, 452–456 (2010).
24. Dubois, J., Terrier, O. & Rosa-Calatrava, M. Influenza viruses and mRNA splicing: Doing more with less. *mBio* **5**, (2014).
25. Nykä, A., Haley, B. & Zamore, P. D. ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell* **107**, 309–321 (2001).
26. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Letters to nature* **404**, 293–296 (2000).
27. Chapman, E. J. & Carrington, J. C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* **8**, 884–896 (2007).
28. Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188–200 (2001).
29. Orban, T. I. & Izaurralde, E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* **11**, 459–469 (2005).
30. Chendrimada, T. P. *et al.* MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**, 823–828 (2007).
31. Kiriakidou, M. *et al.* An mRNA m⁷G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation. *Cell* **129**, 1141–1151 (2007).
32. Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A. & Zhu, J. K. Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO Journal* **26**, 1691–1701 (2007).

33. Mlotshwa, S., Pruss, G. J. & Vance, V. Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci* **13**, 375–382 (2008).
34. Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A. & Jin, H. A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* **21**, 3123–3134 (2007).
35. Siperko, L. M., Thomas, R. R. & Meyer, ; H. Translocation of Repetitive RNA Sequences with the Germ Plasm in Xenopus Oocytes. *Proc. Soc. Photo.-Opt. Instrum. Eng* **11**, 21 (1988).
36. Pang, J. C. S., Kwok, W. K., Chen, Z. & Ng, H. K. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathol* **117**, 599–611 (2009).
37. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal* **23**, 4051–4060 (2004).
38. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Letters to nature* **425**, 415–419 (2003).
39. Kim, V. N. & Nam, J. W. Genomics of microRNA. *Trends in Genetics* **22**, 165–173 (2006).
40. Jinek, M. & Doudna, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**, 405–412 (2009).
41. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambrost, V. The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to &II-14. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
42. Mello, C. C. & Conte, D. Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**, 338–342 (2004).
43. Martienssen, R., Lippman, Z., May, B., Ronemus, M. & Vaughn, M. Transposons, Tandem Repeats, and the Silencing of Imprinted Genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 371–379 (2004).
44. Golden, D. E., Gerbasi, V. R. & Sontheimer, E. J. An Inside Job for siRNAs. *Mol Cell* **31**, 309–312 (2008).
45. Fakhr, E., Zare, F. & Teimoori-Toolabi, L. Precise and efficient siRNA design: A key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther* **23**, 73–82 (2016).
46. Tang, G. siRNA and miRNA: An insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* **30**, 106–114 (2005).
47. Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y. & Leung, S. W. S. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* **4**, e252 (2015).
48. Alshaer, W. *et al.* siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol* **905**, (2021).
49. Vaucheret, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes Dev* **20**, 759–771 (2006).

50. Manavella, P. A., Koenig, D. & Weigel, D. Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2461–2466 (2012).
51. Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L. & Poethig, R. S. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* **18**, 2368–2379 (2004).
52. Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M. & Carrington, J. C. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**, 207–221 (2005).
53. Jacobs, T. B., Lawler, N. J., Lafayette, P. R., Vodkin, L. O. & Parrott, W. A. Simple gene silencing using the trans-acting siRNA pathway. *Plant Biotechnol J* **14**, 117–127 (2016).
54. Hollick, J. B. Sensing the epigenome. *Trends Plant Sci* **13**, 398–404 (2008).
55. Jen, C.-H., Michalopoulos, I., Westhead, D. R. & Meyer, P. Natural antisense transcripts with coding capacity in Arabidopsis may have a regulatory role that is not linked to double-stranded RNA degradation. *Genome Biol* **6**, (2005).
56. Pikaard, C. S., Haag, J. R., Ream, T. & Wierzbicki, A. T. Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci* **13**, 390–397 (2008).
57. Katiyar-Agarwal, S. *et al.* A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *PNAS* **103**, 18002–18007 (2006).
58. Saito, K. *et al.* Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome. *Genes Dev* **20**, 2214–2222 (2006).
59. Aravin, A. A. *et al.* The small RNA profile during Drosophila melanogaster development. *Dev Cell* **5**, 337–350 (2003).
60. Vagin, V. V *et al.* A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science* (1979) **313**, 320–324 (2009).
61. Ma, J. & Lindquist, S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science* (1979) **298**, 1785–1788 (2002).
62. Aravin, A. *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**, 203–207 (2006).
63. O'Donnell, K. A. & Boeke, J. D. Mighty Piwis Defend the Germline against Genome Intruders. *Cell* **129**, 37–44 (2007).
64. Brennecke, J. *et al.* Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila. *Cell* **128**, 1089–1103 (2007).
65. Gunawardane, L. S. *et al.* A Slicer-Mediated Mechanism for Repeat-Associated siRNA 5' End Formation in Drosophila. *New Series* **315**, 1587–1590 (2007).

66. Chuma, S. & Nakano, T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**, (2013).
67. Ponting, C. P., Oliver, P. L. & Reik, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* **136**, 629–641 (2009).
68. Liu, N. *et al.* Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA* **19**, 1848–1856 (2013).
69. Rymarquis, L. A., Kastenmayer, J. P., Hüttenhofer, A. G. & Green, P. J. Diamonds in the rough: mRNA-like non-coding RNAs. *Trends Plant Sci* **13**, 329–334 (2008).
70. Qin, T., Li, J. & Zhang, K.-Q. Structure, Regulation, and Function of Linear and Circular Long Non-Coding RNAs. *Front Genet* **11**, 1–15 (2020).
71. Wu, P. *et al.* Emerging role of tumor-related functional peptides encoded by lncRNA and circRNA. *Mol Cancer* **19**, (2020).
72. Dinger, M. E., Gascoigne, D. K. & Mattick, J. S. The evolution of RNAs with multiple functions. *Biochimie* **93**, 2013–2018 (2011).
73. Dinger, M. E., Pang, K. C., Mercer, T. R. & Mattick, J. S. Differentiating Protein-Coding and Noncoding RNA: Challenges and Ambiguities. *PLoS Comput Biol* **4**, 1–5 (2008).
74. Mattick, J. S. *et al.* nature reviews molecular cell biology Consensus statement Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 34 (2023).
75. Hacisuleyman, E., Shukla, C. J., Weiner, C. L. & Rinn, J. L. Function and evolution of local repeats in the Firre locus. *Nat Commun* **7**, (2016).
76. Brown, C. J. *et al.* The Human X/ST Gene: Analysis of a 17 kb Inactive X-Specific RNA That Contains Conserved Repeats and Is Highly Localized within the Nucleus. *Cell* **71**, 527–642 (1992).
77. Giuseppe, B., Tonlorenzi, R., Simmler, M. C. & Dandolo, L. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Letters to nature* **351**, 325–329 (1991).
78. Brown, S. Xist and the mapping of the X chromosome inactivation centre. *BioEssays* **13**, 607–612 (1991).
79. Lodaid, A. & Heardid, E. Xist RNA in action: Past, present, and future. *PLoS Genet* 1–17 (2019) doi:10.1371/journal.pgen.1008333.
80. Wutz, A. & Gribnau, J. X inactivation Xplained. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 387–393 (2007).
81. Ng, K., Pullirsch, D., Leeb, M. & Wutz, A. Xist and the order of silencing. *EMBO Rep* **8**, 34–39 (2007).

82. Balaton, B. P. & Brown, C. J. Escape Artists of the X Chromosome. *Trends in Genetics* **32**, 348–359 (2016).
83. Gabory, A., Ripoche, M. A., Yoshimizu, T. & Dandolo, L. The H19 gene: Regulation and function of a non-coding RNA. *Cytogenet Genome Res* **113**, 188–193 (2006).
84. Bartoiomei, M., Zemei, S. & Tilghman, S. Parentel imprinting of the mouse H19 gene. *Letters to nature* **351**, 153–155 (1991).
85. Gabory, A., Jammes, H. & Dandolo, L. The H19 locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *BioEssays* **32**, 473–480 (2010).
86. Matouk, I. J. *et al.* The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PLoS One* **2**, (2007).
87. Wang, J., Sun, J. & Yang, F. The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer (Review). *Oncol Lett* **19**, 7–16 (2020).
88. Cai, X. & Cullen, B. R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* **13**, 313–316 (2007).
89. Kazimierczyk, M., Kasprowicz, M. K., Kasprzyk, M. E. & Wrzesinski, J. Molecular Sciences Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function. *Int J Mol Sci* **21**, 1027 (2020).
90. Kiss, T. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci* **117**, 5949–5951 (2004).
91. Matera, A. G., Terns, R. M. & Terns, M. P. Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 209–220 (2007).
92. Valadkhan, S. & Gunawardane, L. S. Role of small nuclear RNAs in eukaryotic gene expression. *Essays Biochem* **54**, 79–90 (2013).
93. Wolin, S. L. & Cedervall, T. THE LA PROTEIN. *Annu. Rev. Biochem.* **17**, 375–403 (2002).
94. Egloff, S., O'Reilly, D. & Murphy, S. Expression of human snRNA genes from beginning to end. *Biochem Soc Trans* **36**, 590–594 (2008).
95. Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. & Mattaj, I. W. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**, 187–198 (2000).
96. 1-s2.0-S0955067402003320-main.
97. Lamond, A. I. & Spector, D. L. Nuclear speckles: A model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 605–612 (2003).
98. Mccullough, A. J., Berget, S. M. & McLean, M. An Intronic Splicing Enhancer Binds U1 snRNPs To Enhance Splicing and Select 5 Splice Sites. **20**, 9225–9235 (2000).
99. Briese, M., Esmaeili, B. & Sattelle, D. B. Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *BioEssays* **27**, 946–957 (2005).

100. Watkins, N. J. *et al.* Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell* **16**, 789–798 (2004).
101. Kufel, J. & Grzechnik, P. Small Nucleolar RNAs Tell a Different Tale. *Trends in Genetics* **35**, 104–117 (2019).
102. Weinstein, L. B. & Steitz, J. A. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 379–384 (1999).
103. Tama Á s Kiss. <https://www.embopress.org>.
104. Balakin, A. G. & Smith, L. The RNA World of the Nucleolus: Two Major Families of Small RNAs Defined by Different Box Elements with Related Functions. *Cell* **86**, 823–834 (1996).
105. Philippe, G., Bortolin, M. & Kiss, T. Site-Specific Pseudouridine Formation in Preribosomal RNA Is Guided by Small Nucleolar RNAs. *Cell* **89**, 799–809 (1997).
106. Decatur, W. A. & Fournier, M. J. RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 695–698 (2003).
107. Grosjean, H. *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing*.
108. Kawaji, H. & Hayashizaki, Y. Exploration of Small RNAs. *PLoS Genet* **4**, 3–8 (2008).
109. Dsouza, V. L. *et al.* Small nucleolar RNA and its potential role in breast cancer – A comprehensive review. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1875**, (2021).
110. Maftaj, W., Tollervey, D. & Seraphin, B. processing lAIN Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA. *European Molecular Biology* 47–53 (2018).
111. De Ishikawa, H. /. MINIREVIEW EVOLUTION OF RIBOSOMAL RNA. *Biochem Phy.siol* **58**, 1–7 (1977).
112. Noller, H. F. Structure of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem* **53**, 119 (1984).
113. Lambert, M., Benmoussa, A. & Provost, P. Small Non-Coding RNAs Derived from Eukaryotic Ribosomal RNA. *Noncoding RNA* **5**, 1–19 (2019).
114. Szymanski, M., Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A. & Barciszewski, J. A new frontier for molecular medicine: Noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1756**, 65–75 (2005).
115. Tuorto, F. & Parlato, R. rRNA and tRNA Bridges to Neuronal Homeostasis in Health and Disease. *J Mol Biol* **431**, 1763–1779 (2019).
116. Honda, K. *et al.* Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 20978–20986 (2005).
117. Parlato, R. & Liss, B. How Parkinson’s disease meets nucleolar stress. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1842**, 791–797 (2014).

118. Akiyama, Y. & Ivanov, P. tRNA-derived RNAs: Biogenesis and roles in translational control. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **14**, (2023).
119. Lyons, S. M., Fay, M. M. & Ivanov, P. The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. *FEBS Lett* **582**, 2828–2844 (2018).
120. Schimmel, P. RNA Processing and Modifications: The emerging complexity of the tRNA world: Mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 45–58 (2018).
121. Anderson, P. & Ivanov, P. tRNA fragments in human health and disease. *FEBS Lett* **588**, 4297–4304 (2014).
122. Ding, Y., Gao, B. & Huang, J. Clinical Medicine Mitochondrial Cardiomyopathy: The Roles of mt-tRNA Mutations. *J Clin Med* **11**, 1–17 (2022).
123. Keiler, K. C. & Ramadoss, N. S. Bifunctional transfer-messenger RNA. *Biochimie* **93**, 1993–1997 (2011).
124. Burks, J., Zwieb, C., Müller, F., Wower, I. & Wower, J. Comparative 3-D modeling of tmRNA. *BMC Mol Biol* **6**, (2005).
125. Williams, K. P., Martindale, K. A. & Bartel, D. P. Resuming translation on tmRNA: a unique mode of determining a reading frame. *EMBO J* **18**, 5423–5433 (1999).
126. Mehta, P., Richards, J. & Karzai, A. W. tmRNA determinants required for facilitating nonstop mRNA decay. *RNA* **12**, 2187–2198 (2006).
127. Moore, S. D. & Sauer, R. T. The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu Rev Biochem* **76**, 101–124 (2007).
128. Janssen, B. D. & Hayes, C. S. The tmRNA ribosome-rescue system. *Adv Protein Chem Struct Biol* **86**, 151–191 (2012).
129. Houseley, J. & Tollervey, D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell* **136**, 763–776 (2009).
130. Collart, M. A. & Panasenko, O. O. The Ccr4-Not complex. *Gene* **492**, 42–53 (2012).
131. Yi, H. *et al.* PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Mol Cell* **70**, 1081-1088.e5 (2018).
132. Schäfer, I. B. *et al.* Molecular Basis for poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylation. *Cell* **177**, 1619-1631.e21 (2019).
133. Lobel, J. H. & Gross, J. D. Pdc2/Pat1 increases the range of decay factors and RNA bound by the Lsm1-7 complex. *RNA* **26**, 1380–1388 (2020).
134. Mugridge, J. S., Ziemniak, M., Jemielity, J. & Gross, J. D. Structural basis of mRNA cap recognition by Dcp1-Dcp2. *Nat Struct Mol Biol.* **23**, 987–994 (2016).
135. Jinek, M., Coyle, S. M. & Doudna, J. A. Coupled 5' Nucleotide Recognition and Processivity in Xrn1-Mediated mRNA Decay. *Mol Cell* **41**, 600–608 (2011).

136. Stevens, A. 5'-Exoribonuclease 1: Xrn 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 251–259 (2001).
137. Stevens, A. Purification and Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* Exoribonuclease Which Yields 5'-Mononucleotides by a 5' + 3' Mode of Hydrolysis. *J Biol Chem* 3080–3085 (1979).
138. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D. & Izaurralde, E. P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. *Mol Cell Biol* **27**, 3970–3981 (2007).
139. Nagarajan, V. K., Jones, C. I., Newbury, S. F. & Green, P. J. XRN 5'→3' exoribonucleases: Structure, mechanisms and functions. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1829**, 590–603 (2013).
140. Chang, J. H. *et al.* Structural and biochemical studies of the 5'→3' exoribonuclease Xrn1 HHS Public Access Author manuscript. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 270–276 (2011).
141. Wasmuth, E. V. & Lima, C. D. Structure and Activities of the Eukaryotic RNA Exosome. *Enzymes (Essen)* **31**, 53–75 (2012).
142. Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. & Tollervey, D. The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3→5 Exoribonucleases. *Cell* **91**, 457–466 (1997).
143. Kilchert, C., Wittmann, S. & Vasiljeva, L. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 227–239 (2016).
144. Wypijewska, A. *et al.* 7-Methylguanosine Diphosphate (m⁷ GDP) Is Not Hydrolyzed but Strongly Bound by Decapping Scavenger (DcpS) Enzymes and Potently Inhibits Their Activity. **51**, 15 (2012).
145. Milac, A. L., Bojarska, E. & Wypijewska del Nogal, A. Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1839**, 452–462 (2014).
146. Liu, H., Rodgers, N., Xinfu Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme dcps is a member of the hit family of pyrophosphatases 1. *EMBO J* **21**, 4699–4708 (2002).
147. Fuchs, A.-L., Wurm, J. P., Neub, A. & Sprangers, R. Molecular basis of the selective processing of short mRNA substrates by the DcpS mRNA decapping enzyme. **117**, (2009).
148. Dijk, E. *et al.* van-dijk-et-al-2002-human-dcp2-a-catalytically-active-mrna-decapping-enzyme-located-in-specific-cytoplasmic-structures-1. *EMBO J* **21**, 6915–6924 (2002).
149. Lykke-Andersen, J. Identification of a Human Decapping Complex Associated with hUpf Proteins in Nonsense-Mediated Decay. *Mol Cell Biol* **22**, 8114–8121 (2002).
150. Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A. & Kiledjian, M. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme.

151. McLennan, A. G. The Nudix hydrolase superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 123–143 (2006).
152. Song, M.-G., Bail, S. & Kiledjian, M. Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *RNA* **19**, 390–399 (2013).
153. Gunawardana, D., Cheng, H.-C. & Gayler, K. R. Identification of functional domains in *Arabidopsis thaliana* mRNA decapping enzyme (AtDcp2). *Nucleic Acids Res* **36**, 203–216 (2008).
154. Xu, W., Dunn, C. A., O’Handley, S. F., Smith, D. L. & Bessman, M. J. Three new Nudix hydrolases from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 22794–22798 (2006).
155. Grzela, R. *et al.* Hydrolytic activity of human Nudt16 enzyme on dinucleotide cap analogs and short capped oligonucleotides. *RNA* **24**, 633–642 (2018).
156. Olejnik, K., Murcha, M. W., Whelan, J., Kraszevska, E. & Kraszevska, E. Cloning and characterization of AtNUDT13, a novel mitochondrial *Arabidopsis thaliana* Nudix hydrolase specific for long-chain diadenosine polyphosphates. *The Authors Journal compilation* **274**, 4877–4885 (2007).
157. Canales, J. *et al.* Mn²⁺-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol pyrophosphatase: A novel metallophosphoesterase family preferentially expressed in rodent immune cells. *Biochemical Journal* **413**, 103–113 (2008).
158. Zhou, W. *et al.* Structural insights into dpCoA-RNA decapping by NudC. *RNA Biol* **18**, 244–253 (2021).
159. Zhang, D. *et al.* Structural basis of prokaryotic NAD-RNA decapping by NudC. *Cell Research* vol. 26 1062–1066 Preprint at <https://doi.org/10.1038/cr.2016.98> (2016).
160. Zhai, L.-T. & Xiang, S. mRNA quality control at the 5’ end *. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2014 **15**, 438–443.
161. Jiao, X., 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. *Mol Cell* **50**, 104–115 (2013).
162. Doamekpor, S. K. *et al.* DXO/Rai1 enzymes remove 5’-end FAD and dephospho-CoA caps on RNAs. *Nucleic Acids Res* **48**, 6136–6148 (2020).
163. Li, Y. & Kiledjian, M. Regulation of mRNA decapping. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 253–265 (2010).
164. Arribas-Layton, M., Wu, D., Lykke-Andersen, J. & Song, H. Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1829**, 580–589 (2013).
165. Kervestin, S. & Jacobson, A. NMD: A multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 700–712 (2012).

166. Wei-Lin Popp, M. & Maquat, L. E. Organizing principles of Mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu Rev Genet* **47**, 139–165 (2013).
167. Karousis, E. D., Nasif, S. & Mühlemann, O. Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **7**, 661–682 (2016).
168. Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–840 (2010).
169. Presnyak, V. *et al.* Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* **160**, 1111–1124 (2015).
170. Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B. & Lykke-Andersen, J. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell* **20**, 905–915 (2005).
171. Song, M. G. & Kiledjian, M. 3' terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping. *RNA* **13**, 2356–2365 (2007).
172. Geisler, S., Lojek, L., Khalil, A. M., Baker, K. E. & Collier, J. Decapping of Long Noncoding RNAs Regulates Inducible Genes. *Mol Cell* **45**, 279–291 (2012).
173. Piccirillo, C., Khanna, R. & Kiledjian, M. Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2. *RNA* **9**, 1138–1147 (2003).
174. Mauer, J. *et al.* Reversible methylation of m⁶A in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* **541**, (2017).
175. Sikorski, P. J. *et al.* The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells. *Nucleic Acids Res* **48**, 1607–1626 (2020).
176. Aglietti, R. A., Floor, S. N., McClendon, C. L., Jacobson, M. P. & Gross, J. D. Active site conformational dynamics are coupled to catalysis in the mRNA decapping enzyme Dcp2. *Structure* **21**, 1571–1580 (2013).
177. Vidya, E. & Duchaine, T. F. Eukaryotic mRNA Decapping Activation. doi:10.3389/fgene.2022.832547.
178. Peculis, B. A., Reynolds, K. & Cleland, M. Metal determines efficiency and substrate specificity of the nuclear NUDIX decapping proteins X29 and H29K (Nudt16). *Journal of Biological Chemistry* **282**, 24792–24805 (2007).
179. Zyteck, M. *et al.* Towards novel efficient and stable nuclear import signals: Synthesis and properties of trimethylguanosine cap analogs modified within the 5',5'-triphosphate bridge. *Org Biomol Chem* **12**, 9184–9199 (2014).
180. Lu, G. *et al.* hNUDT16: A universal decapping enzyme for small nucleolar RNA and cytoplasmic mRNA. *Protein Cell* **2**, 64–73 (2011).

181. Trésaugues, L. *et al.* Structural Basis for the Specificity of Human NUDT16 and Its Regulation by Inosine Monophosphate. *PLoS One* 1–20 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0131507.
182. Dhungel, P., Cantu, F. M., Molina, J. A. & Yang, Z. pathogens Vaccinia Virus as a Master of Host Shutoff Induction: Targeting Processes of the Central Dogma and Beyond. doi:10.3390/pathogens9050400.
183. Cantu, F. *et al.* Poxvirus-encoded decapping enzymes promote selective translation of viral mRNAs. *PLoS Pathog* **16**, (2020).
184. Liu, S. W., Katsafanas, G. C., Liu, R., 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* **17**, 320–331 (2015).
185. Upton, C., Slack, S., Hunter, A. L., Ehlers, A. & Roper, R. L. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *J Virol* **77**, 7590–7600 (2003).
186. Parrish, S. & Moss, B. Characterization of a Second Vaccinia Virus mRNA-Decapping Enzyme Conserved in Poxviruses. *J Virol* **81**, 12973–12978 (2007).
187. Bednarczyk, M. *et al.* Fluorescence-Based Activity Screening Assay Reveals Small Molecule Inhibitors of Vaccinia Virus mRNA Decapping Enzyme D9. *ACS Chem Biol* **17**, 1460–1471 (2022).
188. 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* **30**, 721-732.e4 (2022).
189. Celesnik, H., Deana, A. & Belasco, J. G. Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. *Mol. Cell* **27**, 79–90 (2007).
190. Callaghan, A. J. *et al.* Structure of Escherichia coli RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* **437**, 1187–1191 (2005).
191. Gao, A. *et al.* Structural and kinetic insights into stimulation of RppH-dependent RNA degradation by the metabolic enzyme DapF. *Nucleic Acids Res* **46**, 6841–6856 (2018).
192. Vasilyev, N. & Serganov, A. Structures of RNA complexes with the Escherichia coli RNA pyrophosphohydrolase RppH Unveil the basis for specific 5'-End-dependent mRNA decay. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 9487–9499 (2015).
193. Foley, P. L., Hsieh, P. K., Luciano, D. J. & Belasco, J. G. Specificity and evolutionary conservation of the Escherichia coli RNA pyrophosphohydrolase RppH. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 9478–9486 (2015).
194. Luciano, D. J., Vasilyev, N., Richards, J., Serganov, A. & Belasco, J. G. A Novel RNA Phosphorylation State Enables 5' End-Dependent Degradation in Escherichia coli. *Mol Cell* **67**, 44-54.e6 (2017).

195. Chen, Y. G., Kowtoniuk, W. E., Agarwal, I., Shen, Y. & Liu, D. R. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat Chem Biol* **5**, 879–881 (2009).
196. Cahová, H., Winz, M. L., Höfer, K., Nübel, G. & Jäschke, A. NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs. *Nature* **519**, 374–377 (2015).
197. Vicente Gomes-Filho, J. *et al.* Identification of NAD-RNAs and ADPR-RNA 1 decapping in the archaeal model organisms Running Title: NAD-RNAs and ADPR-RNA decapping in Archaea. *bioRxiv* (2022) doi:10.1101/2022.11.02.514978.
198. Walters, R. W. *et al.* Identification of NAD⁺ capped mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 480–485 (2017).
199. Wang, Y. *et al.* NAD⁺-capped RNAs are widespread in the Arabidopsis transcriptome and can probably be translated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 12094–12102 (2019).
200. Höfer, K. *et al.* Structure and function of the bacterial decapping enzyme NudC. *Nat Chem Biol* **12**, 730–734 (2016).
201. Xiang, S. *et al.* Structure and function of the 59R39 exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Letters* **458**, 784–789 (2009).
202. Chang, J. H. *et al.* Dxo1 is a new type of eukaryotic enzyme with both decapping and 5'-3' exoribonuclease activity. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1011–1019 (2012).
203. Kiledjian, M. Eukaryotic RNA 5'-End NAD⁺ Capping and DeNADding. *Trends in Cell Biology* vol. 28 454–464 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.005> (2018).
204. Mugridge, J. S. & Gross, J. D. Judge, Jury, and Executioner: DXO Functions as a Decapping Enzyme and Exoribonuclease in Pre-mRNA Quality Control. *Mol Cell* **50**, 2–4 (2013).
205. Jiao, X. *et al.* 5' End Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cap in Human Cells Promotes RNA Decay through DXO-Mediated deNADding. *Cell* **168**, 1015-1027.e10 (2017).
206. Singh, J. *et al.* DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem Biol* **3**, 711–722 (2008).
207. Jiao, X., Wang, Z. & Kiledjian, M. Identification of an mRNA-Decapping Regulator Implicated in X-Linked Mental Retardation. *Mol. Cell* **24**, 713–722 (2006).
208. Ng, C. K. L. *et al.* Loss of the scavenger mRNA decapping enzyme DCPS causes syndromic intellectual disability with neuromuscular defects. *Hum Mol Genet* **24**, 3163–3171 (2014).
209. Singh, S., Singh, P. K., Bhadauriya, P. & Ganesh, S. Lafora disease E3 ubiquitin ligase malin is recruited to the processing bodies and regulates the microRNA-mediated gene silencing process via the decapping enzyme Dcp1a. *RNA Biol* **9**, 1440–1449 (2012).
210. Wu, C. *et al.* Overexpression of mRNA-decapping enzyme 1a affects survival rate in colorectal carcinoma. *Oncol Lett* **16**, 1095–1100 (2018).

211. Tang, Y., Xie, C., Zhang, Y., Qin, Y. & Zhang, W. Overexpression of mRNA-decapping enzyme 1a predicts disease-specific survival in malignant melanoma. *Melanoma Res* **28**, 30–36 (2018).
212. Anad, C. *et al.* Epigenetic loss of the RNA decapping enzyme NUDT16 mediates C-MYC activation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. (2017) doi:10.1038/leu.2017.99.
213. Beaucage, S. L. & Caruthers, M. H. DEOXYNUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDITES-A NEW CLASS OF KEY INTERMEDIATES FOR DEOXYPOLYNUCLEOTIDE SYNTHESIS. *Tetrahedron Lett* **22**, 1859–1862 (1981).
214. Letsinger, R. L., Finnan, J. L., Heavner, G. A. & Lunsford, W. B. Phosphite Coupling Procedure for Generating Internucleotide Links. *J Am Chem Soc* **97**, 3278–3279 (1975).
215. SomozaÁlvaro, S. Protecting groups for RNA synthesis: An increasing need for selective preparative methods. *Chem Soc Rev* **37**, 2668–2675 (2008).
216. Flemmich, L., Bereiter, R. & Micura, R. Chemical Synthesis of Modified RNA. *Angewandte Chemie - International Edition* **63**, (2024).
217. Shiba, Y. *et al.* Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate. *Nucleic Acids Res* **35**, 3287–3296 (2007).
218. Depaix, A. *et al.* Preparation of RNAs with non-canonical 5' ends using novel di- and trinucleotide reagents for co-transcriptional capping. *Front Mol Biosci* **9**, (2022).
219. Krupp, G. RNA synthesis: strategies for the use of bacteriophage RNA polymerases* (RNAPs; DNA; phages T3, T7, SP6; portable promoter; terminator oligo). *Gene* **12**, 75–89 (1988).
220. Beckert, B. & Masquida, B. Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. *Methods in Molecular Biology* **703**, 29–41 (2011).
221. Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(39-O-methyl)GpppG and 7-methyl(39-deoxy)GpppG. *Method* **7**, 1486–1495 (2001).
222. Kuhn, A. N. *et al.* Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Ther* **17**, 961–971 (2010).
223. Strenkowska, M. *et al.* Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Res* **44**, 9578–9590 (2016).
224. Jemielity, J. *et al.* Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties. *RNA* **9**, 1108–1122 (2003).

225. Henderson, J. M. *et al.* Cap 1 Messenger RNA Synthesis with Co-transcriptional CleanCap® Analog by In Vitro Transcription. *Curr Protoc* **1**, (2021).
226. Zhao, B. S. & He, C. Pseudouridine in a new era of RNA modifications. *Cell Res* **25**, 153–154 (2015).
227. Charette, M. & Gray, M. W. Pseudouridine in RNA: What, where, how, and why. *IUBMB Life* **49**, 341–351 (2000).
228. Andries, O. *et al.* N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *Journal of Controlled Release* **217**, 337–344 (2015).
229. Zhu, B. *et al.* Synthesis of 2-Fluoro RNA by Syn5 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **43**, 94 (2015).
230. Keith, J. M., Venkatesan, S., Gershowitz, A. & Moss, B. Purification and Characterization of the Messenger Ribonucleic Acid Capping Enzyme GTP:RNA Guanylyltransferase from Wheat Germ. *Biochemistry* **21**, 327–333 (1982).
231. Vos, J. C., Sarker, M. & Stunnenberg, H. G. Vaccinia virus capping enzyme is a transcription initiation factor. *EMBO J* **10**, 2553–2558 (1991).
232. Luo, Y., Mao, X., Deng, L., Cong, P. & Shuman, S. The D1 and D12 Subunits Are Both Essential for the Transcription Termination Factor Activity of Vaccinia Virus Capping Enzyme. *J Virol* **69**, 3852–3856 (1995).
233. Ohno, H. *et al.* Versatile strategy using vaccinia virus-capping enzyme to synthesize functional 5 cap-modified mRNAs. *Nucleic Acids Res* **51**, (2023).
234. Chan, S. H. *et al.* Biochemical characterization of mRNA capping enzyme from Faustovirus. *RNA* **29**, 1803–1817 (2023).
235. Van Dülmen, M., Muthmann, N. & Rentmeister, A. Chemo-Enzymatic Modification of the 5' ' Cap Maintains Translation and Increases Immunogenic Properties of mRNA. *Angewandte* **60**, 13280–13286 (2021).
236. Romaniuk, E., McLaughlin, L. W., Neilson, T. & Romaniuk, P. J. The Effect of Acceptor Oligoribonucleotide Sequence on the T4 RNA Ligase Reaction. *Eur J Biochem* **125**, 639–643 (1982).
237. Martin, G. & Keller, W. Tailing and 39-end labeling of RNA with yeast poly(A) polymerase and various nucleotides. *RNA* **4**, 226–230 (1998).
238. Yehudai-Resheff, S. & Schuster, G. Characterization of the E.coli poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence. *Nucleic Acids Res* **28**, 1139–1144 (2000).
239. Warminski, M., Mamot, A., Depaix, A., Kowalska, J. & Jemielity, J. Chemical Modifications of mRNA Ends for Therapeutic Applications. *Acc Chem Res* **2023**, 2814–2826 (2024).

240. Ivancová, I., Leone, D. L. & Hocek, M. Reactive modifications of DNA nucleobases for labelling, bioconjugations, and cross-linking. *Curr Opin Chem Biol* **52**, 136–144 (2019).
241. Mattay, J., Dittmar, M. & Rentmeister, A. Chemoenzymatic strategies for RNA modification and labeling. *Curr Opin Chem Biol* **63**, 46–56 (2021).
242. Schulz, D. & Rentmeister, A. Current approaches for RNA labeling in vitro and in cells based on click reactions. *ChemBioChem* **15**, 2342–2347 (2014).
243. Mamot, A. *et al.* Ethylenediamine derivatives efficiently react with oxidized RNA 3' ends providing access to mono and dually labelled RNA probes for enzymatic assays and in vivo translation. *Nucleic Acids Res* **50**, (2022).
244. Tomoike, F. & Abe, H. RNA imaging by chemical probes. *Adv Drug Deliv Rev* **147**, 44–58 (2019).
245. Chen, K. & Chen, X. Design and Development of Molecular Imaging Probes. *Curr. Top. Med. Chem.* **10**, 1227–1236 (2010).
246. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
247. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase Downloaded from. *Science* (1979) **249**, 505–510 (1990).
248. Jayasena, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin Chem* **45**, 1628–1650 (1999).
249. Zhuo, Z. *et al.* Molecular Sciences Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 1–19 (2017).
250. Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 181–202 (2017).
251. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nature review* **9**, 537–550 (2010).
252. Cheng, C., Chen, Y. H., Lennox, K. A., Behlke, M. A. & Davidson, B. L. In vivo SELEX for identification of brain-penetrating aptamers. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e67 (2013).
253. Que-Gewirth, N. S. & Sullenger, B. A. Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. *Gene Ther* **14**, 283–291 (2007).
254. Drolet, D. W. *et al.* Pharmacokinetics and Safety of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Aptamer (NX1838) Following Injection into the Vitreous Humor of Rhesus Monkeys. *Pharm Res* **17**, 1503–1510 (2000).

255. Farrar, C. T., William, C. M., Hudry, E., Hashimoto, T. & Hyman, B. T. RNA Aptamer Probes as Optical Imaging Agents for the Detection of Amyloid Plaques. *PLoS One* **9**, (2014).
256. Zeng, Z. *et al.* Specific and Sensitive Tumor Imaging Using Biostable Oligonucleotide Aptamer Probes. *Theranostics* **4**, (2014).
257. Christie, R. M. Fluorescent dyes. *Handbook of Textile and Industrial Dyeing: Principles, Processes and Types of Dyes* **1**, 562–587 (2011).
258. Lavis, L. D. & Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem Biol* **3**, 142–155 (2008).
259. Lakowicz, J. R. *Principles-of-Fluorescence-Spectroscopy-2006*.
260. Deal, J., Pleshinger, D. J., Johnson, S. C., Leavesley, S. J. & Rich, T. C. Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: A biological perspective of the history of FRET. *Cell Signal* **75**, (2020).
261. Arshad Hussain, S. & Hussain et Al, S. A. *An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*. <https://www.researchgate.net/publication/45867167> (2009).
262. Chen, T. *et al.* Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev* **143**, 177–205 (2019).
263. Tenner, B., Mehta, S. & Zhang, J. Optical sensors to gain mechanistic insights into signaling assemblies. *Current Opinion in Structural Biology* vol. 41 203–210 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.021> (2016).
264. Ponsioen, B. *et al.* Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* **5**, 1176–1180 (2004).
265. Reed, J. R. & Backes, W. L. Formation of P450 • P450 complexes and their effect on P450 function. *Pharmacol Ther* **133**, 299–310 (2012).
266. Taraska, J. W. Mapping membrane protein structure with fluorescence. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 507–513 (2012).
267. Dereli-Korkut, Z. *et al.* Real-time detection of cellular death receptor-4 activation by fluorescence resonance energy transfer. *Biotechnol Bioeng* **110**, 1396–1404 (2013).
268. Clegg, R. M. The history of FRET: From conception through the labors of birth.
269. Hans Kautsky, B. QUENCHING OF LUMINESCENCE BY OXYGEN QUENCHING OF LUMINESCENCE BY OXYGEN.
270. Mlynarska-Cieslak, A. *et al.* Nicotinamide-Containing Di- and Trinucleotides as Chemical Tools for Studies of NAD-Capped RNAs. *Org Lett* **20**, 7650–7655 (2018).
271. Yoshikawa, M., Kato, T. & Takenishi, T. A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides. *T&A Letters* 5065–5068 (1967).

272. Murakayama, T. & Hashimoto, M. Phosphorylation of alcohols and phosphates by oxidation-reduction condensation. *Bulletyn of the chemical society of Japan* **44**, 196–199 (1970).
273. Kadokura, M., Wada, T., Urashima, C. & Sekine, M. Efficient Synthesis of T-Methyl-Capped Guanosine 5'-Triphosphate as a 5'-Terminal Unique Structure of U6 RNA via a New Triphosphate Bond Formation Involving Activation of Methyl Phosphorimidazolidate Using ZnCl₂ as a Catalyst in DMF under Anhydrous Conditions. *Tetrahedron Lett* **38**, 8359–8362 (1997).
274. Hö, K., Abele, F., Schlotthauer, J. & Jä, A. Synthesis of 5'-NAD-Capped RNA. *Bioconjugate Chem* **27**, 36 (2016).
275. Nübel, G., Sorgenfrei, F. A. & Jäschke, A. Boronate affinity electrophoresis for the purification and analysis of cofactor-modified RNAs. *Methods* **117**, 14–20 (2017).
276. IGLOI, G. & KOSSEL, H. Use of Boronate-Containing Gels for Electrophoretic Analysis of Both Ends of RNA Molecules. *Methods Enzymol* **155**, 433–448.
277. Song, W., Strack, R. L., Svensen, N. & Jaffrey, S. R. Plug-and-Play Fluorophores Extend the Spectral Properties of Spinach. *J. Am. Chem. Soc* **136**, 2024 (2014).
278. Paige, J. S., Wu, K. Y. & Jaffrey, S. R. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* (1979) **333**, 642–646 (2011).
279. Haidekker, M. A. *et al.* Dyes with Segmental Mobility: Molecular Rotors. 267–308 (2010) doi:10.1007/978-3-642-04702-2_8.
280. Li, Y., Song, M. & Kiledjian, M. Differential utilization of decapping enzymes in mammalian mRNA decay pathways. *RNA* **17**, 419–428 (2011).
281. Taylor, M. J. & Peculis, B. A. Evolutionary conservation supports ancient origin for Nudt16, a nuclear-localized, RNA-binding, RNA-decapping enzyme. *Nucleic Acids Res* **36**, 6021–6034 (2008).
282. Jiao, X., 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. *Mol Cell* **50**, 104–115 (2013).
283. Frédéric Picard-Jean *et al.* 2'-O-methylation of the mRNA cap protects RNAs from decapping and degradation by DXO. *PLoS One* 1–14 (2018) doi:10.1371/journal.pone.0193804.
284. Iversen, P. W. *et al.* HTS Assay Validation. *The Assay guidance manual* (2012).
285. Charenton, C. *et al.* Structure of the active form of Dcp1-Dcp2 decapping enzyme bound to m⁷ GDP and its Edc3 activator. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 982–986 (2016).
286. Floor, S. N., Jones, B. N., Hernandez, G. A. & Gross, J. D. A split active site couples cap recognition by Dcp2 to activation. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1096–1101 (2010).

287. Leija-Martínez, N. *et al.* The separation between the 5'-3' ends in long RNA molecules is short and nearly constant. *Nucleic Acids Res* **42**, 13963–13968 (2014).
288. Tomoo, K. *et al.* Structural basis for mRNA Cap-Binding regulation of eukaryotic initiation factor 4E by 4E-binding protein, studied by spectroscopic, X-ray crystal structural, and molecular dynamics simulation methods. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1753**, 191–208 (2005).
289. Chen, N., Walsh, M. A., Liu, Y., Parker, R. & Song, H. Crystal structures of human DcpS in ligand-free and m7GDP-bound forms suggest a dynamic mechanism for scavenger mRNA decapping. *J Mol Biol* **347**, 707–718 (2005).
290. Warminski, M. *et al.* Amino-Functionalized 5' Cap Analogs as Tools for Site-Specific Sequence-Independent Labeling of mRNA. *Bioconjug Chem* **28**, 1978–1992 (2017).
291. Warminski, M., Warminska, Z., Kowalska, J. & Jemielity, J. mRNA Cap Modification through Carbamate Chemistry: Synthesis of Amino- and Carboxy-Functionalised Cap Analogues Suitable for Labelling and Bioconjugation. *European J Org Chem* **2015**, 6153–6159 (2015).
292. Mamot, A., Sikorski, P. J., Warminski, M., Kowalska, J. & Jemielity, J. Azido-Functionalized 5' Cap Analogues for the Preparation of Translationally Active mRNAs Suitable for Fluorescent Labeling in Living Cells. *Angewandte Chemie* **129**, 15834–15838 (2017).
293. Fan, F. *et al.* Fluorescent Properties of Cyanine Dyes As a Matter of the Environment. *J Fluoresc* **34**, 925–933 (2024).
294. Ik, F. *et al.* Identification and in vitro characterization of UDP-GlcNAc-RNA cap-modifying and decapping enzymes. *Nucleic Acids Res* **52**, 5438–5450 (2024).