

Streszczenie pracy

W swojej pracy doktorskiej opisuję projektowanie, syntezę oraz wykorzystanie nukleotydowych sond fluorescencyjnych do celów monitorowania reakcji enzymatycznych w czasie rzeczywistym.

Nukleotydy pełnią istotną rolę w komórkowym metabolizmie. Są substratami w syntezie kwasów nukleinowych (DNA, RNA), pośredniczą w przekazywaniu energii chemicznej koniecznej dla przebiegu reakcji enzymatycznych, a także działają jako kofaktory enzymów. Z uwagi na szereg ról jakie pełnią w komórce, modyfikacja nukleotydów służyć może otrzymywaniu związków o interesujących właściwościach biologicznych. Analogi takie mogą być użyteczne jako narzędzia do monitorowania aktywności enzymów degradujących nukleotydy, czy też jako inhibitory tych enzymów.

Szczególnie interesującą klasą enzymów degradujących nukleotydy są fosfohydrolazy. Enzymy te hydrolizują oligofosforanowy łańcuch nukleotydu. Ma to szczególne znaczenie zwłaszcza w kontekście kontroli wewnątrzkomórkowej populacji mono-, di- i trifosforanów nukleotydów, co jest niezmiernie istotne dla prawidłowego działania komórkowego metabolizmu. Z kolei dysfunkcje w działaniu tych enzymów powiązane są z różnymi chorobami. Z tego powodu fosfohydrolazy są interesującym celem terapeutycznym.

Do tej pory opracowano różne metody monitorowania aktywności fosfohydrolaz. Niestety metody te są zwykle skomplikowane, kosztowne, a także wymagają czasu. W opisywanym projekcie, moim celem było stworzenie metody, w której narzędzia do monitorowania aktywności enzymów można otrzymać na drodze prostej reakcji, a samą reakcję enzymatyczną można obserwować w czasie rzeczywistym, bez konieczności ingerencji w układ.

W ramach realizacji projektu w pierwszym etapie otrzymano nową klasę nukleotydów – analogi zawierające C-fosfonian jako analog terminalnej reszty fosforanowej w łańcuchu oligofosforanowym. Otrzymane analogi miały ponadto terminalną grupę alkinową przyłączoną do reszty C-fosfonianu. Grupa alkinowa, reaktywna w bardzo wydajnej reakcji CuAAC (cykloaddycja alkinowo-azydkowa katalizowana jonami miedzi). Dzięki temu nukleotydy należące do opisywanej, nowej klasy, mogły zostać poddane reakcjom z różnymi znacznikami fluorescencyjnymi zawierającymi azydek. Pozwoliło to uzyskać bibliotekę nukleotydów znakowanych w pozycji 5' reszty oligofosforanowej. Potencjał metody wykorzystano m.in. w reakcjach z 5'-azydonukleozydami – pozwoliło to uzyskać bibliotekę analogów kapu (końca 5' mRNA) odpornych na fosfohydrolazy. Syntezy otrzymanych koniugatów są dowodem, że opracowana metoda może służyć do szybkiego otrzymywania dużych bibliotek związków, które mogą wykazywać interesujące biologiczne właściwości.

W kolejnym etapie projektu metoda syntetyczna została rozwinięta tak, by możliwe było wprowadzenie dwóch grup alkinowych w obrębie analogu nukleotydowego. Modyfikacja taka umożliwiła reakcję CuAAC nie z jednym, a z dwoma identycznymi znacznikami fluorescencyjnymi. W reakcjach tych wykorzystano barwnik – piren, który wykazuje fluorescencję ekscymerową. W ten sposób otrzymano serię nukleotydów – zawierających różne zasady azotowe, czy różną długość łańcucha oligofosforanowego. Wszystkie sondy ekscymerowe zostały przebadane spektroskopowo, co pozwoliło ustalić, że wykazują fluorescencję ekscymerową. W kolejnym kroku sondy te zostały zbadane w reakcji enzymatycznej z modelową pirofosfatazą – PDE-I. Reakcje te pokazały, że w miarę postępu reakcji enzymatycznej znacząco zmienia się widmo fluorescencyjne badanych sond – zanika pasmo ekscymerowe, pojawia się natomiast pasmo monomerowe. Sondy wykazujące największą różnicę między stanem przed i po reakcji zostały skierowane do badań *in vivo* z komórkami HeLa. W badaniach tych dowiedziono, że nukleotydy są w stanie przejść przez błonę komórkową i ułożyć się w cytozolu. Jest to bardzo interesująca obserwacja, gdyż tak polarne związki jakimi są nukleotydy, na ogół nie mają zdolności spontanicznej penetracji błony komórkowej.

Eksperymenty z sondami ekscymerowymi dowiodły, że dwie grupy alkinowe przyłączone do nukleotydu nie są równocenne w reakcji CuAAC ze znacznikiem zawierającym azydek. Dzięki temu, w odpowiednich warunkach, możliwa jest najpierw jedna reakcja CuAAC – z jednym barwnikiem zawierającym azydek, a następnie druga – już z innym barwnikiem. Odkrycie tej właściwości i zoptymalizowanie warunków reakcji doprowadziło do utworzenia nowej klasy sond nukleotydowych – związków wykazujących efekt FRET. Nowa metoda syntezy nie wymaga stosowania grup ochronnych, ani oczyszczania produktu pośredniego, co pozwala przyspieszyć syntezę i uzyskać wyższe wydajności.

W eksperymentach z niespecyficzną pirofosfatazą PDE-I sondy FRET okazały się znacząco zmieniać swoje widmo emisji fluorescencji. Właściwość ta pozwala wykorzystać je jako narzędzia do monitorowania aktywności enzymatycznej. Wstępne badania *in vivo* z komórkami HeLa pokazały też, że niektóre z sond FRET zdolne są penetrować błonę komórkową i lokować się w cytozolu.

Metody rozwijane w czasie realizowanego projektu doktorskiego pozwoliły na uzyskanie wielu różnych analogów nukleotydów użytecznych w badaniach biologii molekularnej. Otrzymane w ramach projektu analogi mogą zostać poddane reakcji z dowolnym reagentem zawierającym azydek (barwniki, nukleozydy, nanocząstki, DNA, RNA, itp.). Otwiera to drogę do prostej syntezy ogromnych bibliotek związków, które mogą wykazywać interesujące właściwości biologiczne i biofizyczne.