

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Przemysław Wanat

Nr albumu: 293858

Projektowanie, synteza i badanie właściwości adeninowych
nukleotydowych sond fluorescencyjnych - narzędzi do monitorowania
reakcji enzymatycznych

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Jacka Jemielitego

i dr hab. Joanny Kowalskiej

w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej

Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, 2020

Badania zrealizowano w ramach projektu Diamentowy Grant (DI2012 008942), finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz stypendiów ETIUDA 6 (UMO-2018/28/T/ST5/00109), Sonata (UMO-2011/01/D/ST5/05869), Sonata Bis (UMO/2012/05/E/ST5/03893) i OPUS (UMO-2016/21/B/ST5/02556) finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Promotorom

prof. Jackowi Jemielitemu – za umożliwienie mi pracy w laboratorium,
przekazaną wiedzę oraz wsparcie w sprawach merytorycznych.

oraz

dr hab. Joannie Kowalskiej – za opiekę merytoryczną, pomoc w planowaniu i
przeprowadzaniu eksperymentów oraz przygotowywaniu tekstów publikacji.

Współpracownikom:

mgr Renacie Kasprzyk – za pomoc w planowaniu i przeprowadzeniu badań
spektroskopowych.

mgr Dominice Strzeleckiej – za pomoc w eksperymentach wykorzystujących
spektrometrię mas.

mgr. Michałowi Kopciałowi – za pomoc w przeprowadzaniu syntez chemicznych
sond i substratów do nich.

dr. Mikołajowi Chromińskiemu – za merytoryczne uwagi oraz za wnikliwe
sprawdzenie tekstu rozprawy

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Chemii Bioorganicznej – za miłą
atmosferę w pracy.

Współautorom publikacji – za pomoc w ich przygotowaniu

Żonie Monice, Tesli i Sigmie – za wsparcie

Spis treści

Wykaz skrótów	- 9 -
Publikacje	- 11 -
Część literaturowa	- 13 -
1. Wstęp	- 13 -
2. Chemia i biologia nukleotydów	- 13 -
2.1. Budowa nukleotydów	- 13 -
2.2. Stany protonacyjne nukleotydów	- 14 -
2.3. Konformacja nukleotydów i nukleozydów	- 15 -
2.4. Polarność nukleotydów oraz jej wpływ na ich transport dokomórkowy. -	16 -
3. Wybrane biologiczne funkcje nukleotydów	- 18 -
3.1. Synteza RNA	- 18 -
3.2. ATP jako biologiczny hydrotrop	- 20 -
3.3. ATP jako cząsteczka sygnałowa.	- 21 -
3.4. ATP jako cząsteczka przenosząca energię	- 22 -
3.5. Podsumowanie rozdziału	- 25 -
4. Dysfunkcje metabolizmu ATP	- 25 -
4.1. Zaburzenia funkcjonowania ATPaz	- 25 -
4.2. Zaburzenia funkcjonowania enzymów fosforylujących i defosforylujących białka (kinaz i fosfataz)	- 27 -
4.3. Podsumowanie rozdziału	- 28 -
5. Metody detekcji ATP	- 28 -
5.1. Detekcja ATP <i>in vitro</i>	- 28 -
5.2. Detekcja ATP wydzielanego przez komórki	- 28 -
5.3. Detekcja ATP wewnątrz komórek	- 30 -
5.4. Podsumowanie rozdziału	- 33 -
6. Analogi ATP – sondy do monitorowania aktywności ATPaz	- 33 -
6.1. Wstęp – znaczenie pozycji znakowania ATP w kontekście oddziaływań z ATPazami	- 33 -
6.2. Analogi ATP znakowane w obrębie reszty rybozy	- 35 -
6.3. Analogi ATP znakowane w obrębie zasady azotowej	- 36 -
6.4. Analogi ATP modyfikowane w obrębie łańcucha oligofosforanowego.. -	38 -
6.5. Podsumowanie rozdziału	- 41 -

7.	Fluorescencja ekscymerowa w badaniach oddziaływań kwasów nukleinowych.....	- 42 -
7.1.	Fluorescencja ekscymerowa – wstęp.....	- 42 -
7.2.	Fluorescencja ekscymerowa w badaniu kwasów nukleinowych.....	- 43 -
7.3.	Podsumowanie rozdziału	- 49 -
8.	Zjawisko FRET i jego zastosowanie w badaniu oddziaływań nukleotydów z cząsteczkami biologicznymi	- 49 -
8.1.	Podstawy teoretyczne zjawiska FRET	- 49 -
8.2.	Zjawisko FRET w badaniu oddziaływań kwasów nukleinowych	- 53 -
8.3.	Analogi ATP wykazujące efekt FRET i ich zastosowanie w badaniach enzymatycznych.....	- 57 -
8.4.	Podsumowanie rozdziału	- 61 -
9.	Reakcje typu „click” w chemii nukleotydów	- 62 -
9.1.	Charakterystyka reakcji „click” i reakcja CuAAC	- 62 -
9.2.	Reakcja CuAAC w chemii nukleotydów.....	- 65 -
9.3.	Podsumowanie rozdziału	- 70 -
10.	Metody chemiczne stosowane w syntezie znakowanych nukleotydów	- 71 -
10.1.	Fosforylacja Yoshikawy.....	- 71 -
10.2.	Reakcja aktywacji fosforanów nukleozydów.....	- 72 -
10.3.	Reakcje aktywowanych nukleotydów z różnymi nukleofilami	- 74 -
10.4.	Synteza i właściwości estrów NHS.....	- 76 -
10.5.	Funkcjonalizacja rybozy w pozycji 2'-O oraz 3'-O	- 77 -
11.	Enzymy hydrolizujące nukleotydy zawierające zasadę adeninową	- 78 -
11.1.	Fosfodiesteraza I pochodząca z jadu grzechotnika diamentowego	- 78 -
	(EC 3.1.4.1).....	
11.2.	FHIT (<i>Fragile Histidine Triad protein</i>)	- 79 -
	Badania własne	- 82 -
12.	Cele pracy	- 82 -
13.	Planowanie, synteza i badanie właściwości sond nukleotydowych	- 86 -
14.	Strategie syntezy nukleotydów zawierających grupy alkinowe w strukturze	- 87 -
14.1.	Wprowadzenie	- 87 -
14.2.	Synteza analogów reszty fosforanowej zawierających funkcję alkinową.....	- 88 -
		

14.3. Nukleotydy zawierające pojedynczą funkcję alkinową w obrębie reszty oligofosforanu	- 90 -
14.4. Synteza analogów nukleotydów zawierających dwie funkcje alkinowe – reakcja CDI z C-fosfonianowym analogiem ATP	- 92 -
14.5. Synteza analogów ATP zawierających dwie funkcje alkinowe – reakcja CDI z oligofosforanem adenozyne	- 93 -
14.6. Synteza nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe w strukturze	- 97 -
14.7. Dalsze modyfikacje analogów nukleotydów zawierających dwa ugrupowania alkinowe	- 99 -
14.8. Synteza innych nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe	- 100 -
14.9. Podsumowanie rozdziału	- 103 -
15. Barwniki zawierające azydek	- 103 -
15.1. Wprowadzenie	- 103 -
15.2. Pochodna pirenu zawierająca grupę etyloazydkową	- 105 -
15.3. Pochodna barwnika cyjanowinylenowego zawierająca grupę azydkową	- 106 -
16. Reakcja CuAAC w procesie otrzymywania sond nukleotydowych	- 106 -
16.1. Wprowadzenie	- 106 -
16.2. Nukleotydy z pojedynczą grupą alkinową w reakcji CuAAC	- 107 -
16.3. Nukleotydy z dwiema grupami alkinowymi w reakcji z dwoma jednakowymi reagentami azydkowymi – synteza sond ekscymerowych	- 110 -
16.4. Różnica reaktywności grup alkinowych pozostających w różnym otoczeniu chemicznym i synteza sond zawierających dwa różne fluorofory	- 115 -
16.5. Wyjaśnienie regioselektywności reakcji CuAAC za pomocą metod obliczeniowych	- 121 -
16.6. Podsumowanie rozdziału	- 123 -
17. Badania spektroskopowe sond nukleotydowych	- 124 -
17.1. Wprowadzenie	- 124 -
17.2. Właściwości fluorescencyjne sond ekscymerowych	- 125 -
17.3. Właściwości fluorescencyjne sond FRET	- 133 -
17.4. Podsumowanie rozdziału	- 141 -
18. Sondy nukleotydowe w badaniach enzymatycznych i komórkowych .	- 143 -
18.1. Wstęp	- 143 -
18.2. Sondy ekscymerowe w badaniach enzymatycznych i komórkowych.	- 143 -
18.3. Sondy FRET w badaniach enzymatycznych i komórkowych	- 150 -

18.4.	Podsumowanie rozdziału	- 158 -
19.	Podsumowanie.....	- 159 -
	Część eksperymentalna	- 163 -
20.	Informacje ogólne.....	- 163 -
20.1.	Odczynniki chemiczne użyte w pracy.....	- 163 -
20.2.	Syntezy z użyciem reaktora mikrofalowego	- 163 -
20.3.	Chromatografia jonowymienna.....	- 163 -
20.4.	Chromatografia HPLC	- 164 -
20.5.	Otrzymywanie substratów w formie soli trietyloamoniowej.....	- 165 -
20.6.	Wyznaczanie ilości związku	- 165 -
20.7.	Spektrometria mas i spektroskopia NMR	- 166 -
20.8.	Badania spektroskopowe i spektrofotometryczne.....	- 167 -
20.9.	Eksperymenty z enzymem PDE-I.....	- 167 -
21.	Syntezy chemiczne	- 168 -
21.1.	Wstęp	- 168 -
21.2.	C-fosfonian etynylowy (1a).....	- 168 -
21.3.	Fosforan propargilu (1c).....	- 169 -
21.4.	<i>P</i> -imidazolidy nukleotydów zawierających grupę <i>N</i> -propargilokarbaminianową w pozycji 2'(3')- <i>O</i> rybozy 3a-e	- 169 -
21.5.	Synteza nukleotydów zawierających grupę alkinową w obrębie oligofosforanu oraz grupę <i>N</i> -propargilokarbaminianową w obrębie rybozy 4a-i	- 172 -
21.6.	Nukleotydy z dwiema grupami alkinowymi będące analogami m ⁷ GTP. 4s ..	- 177 -
21.7.	Ścieżka syntetyczna nukleotydu 4p	- 178 -
21.8.	Ścieżka syntetyczna nukleotydu 4s	- 179 -
21.9.	Synteza barwnika 5c	- 181 -
21.10.	Synteza barwnika cyjanowinylowego 5d	- 182 -
21.11.	Synteza nukleotydów znakowanych w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego 6a-k	- 183 -
21.12.	Synteza sond ekscymerowych 7a-t	- 187 -
21.13.	Synteza sond wykazujących efekt FRET 8a-s	- 191 -
	Bibliografia.....	- 200 -

Wykaz skrótów

A, Ade	Adenina
Ado	Adenozyna
ATP	5'-trifosforan adenozyny
CTP	5'-trifosforan cytydyny
G, Gua	Guanina
GTP	5'-trifosforan guanozyny
Guo	Guanozyna
UTP	5'-trifosforan urydyny
HPLC RP	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych
DcpS	Enzym dekapujący niezależny od RNA
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	Dimetylosulfotlenek
RNA	Kwas rybonukleinowy
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
CuAAC	Cykloadycja alkinowo-azydkowa katalizowana jonami miedzi (I)
2,2'-DTDP	2,2'-ditiodipirydyna
CDI	Karbonylodiimidazol
NMR	Magnetyczny rezonans jądrowy
(HR) MS	(wysokorozdzielcza) spektrometria mas
TBTA	tris(benzylotriazylometylo)amina
THPTA	tris(3-hydroksypropylotriazylometylo)amina
TEA	Trietyloamina
TEAB	Wodorowęglan trietyloaminy
m⁷G	7-metyloguanina
m⁷GTP	5'-trifosforan 7-metyloguanozyny

(d)NTP	dowolny 5'-trifosforan (deoksy)rybonukleotydu
PEP	Feniloetynylopiren
Cv	Barwnik cyjanowinylowy
Py	Piren
Cy3, Cy5	Odpowiednio cyjanina 3 lub 5
5-FAM	5-karboksyfluoresceina
TQ2, TQ3	Barwniki wygaszeniowe z serii Tide Quencher
DEAE Sephadex	polisacharyd zawierający kowalencyjnie przyłączony 2-(N,N-dietyloamino)etanol, służący jako anionit
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy (wersenowy) lub jego sole
mOD	Jednostka gęstości optycznej
mRNA, tRNA, rRNA,	Różne typy RNA – matrycowy, transportujący, rybosomalny
SVPDE, PDE-I	Fosfodiesteraza z jadu węża
FHIT	<i>Fragile histidine triad protein</i> – bis(5'-adenozylotrifosfataza.
QY, Φ	wydajność kwantowa
pH, pD	Ujemny logarytm z wartości stężenia jonów – odpowiednio wodorowych bądź deuterowych
FRET	Bezpromienisty transfer energii Förstera
p	W skrótowcach związków – reszta fosforanu
NMP, NDP	Odpowiednio 5'-monofosforan i 5'-difosforan dowolnego nukleotydu (A, T, G, C, m ⁷ G, itp.)

Publikacje

Publikacje, w których skład wchodzi wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie:

ExciTides: NTP-derived probes for monitoring pyrophosphatase activity based on excimer-to-monomer transitions, Przemysław Wanat, Renata Kasprzyk, Michał Kopciał, Paweł J. Sikorski, Dominika Strzelecka, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, *Chemical Communications*, **2018**, 54, 9773-9776

Novel route for preparing 5' cap mimics and capped RNAs: phosphate-modified cap analogues obtained via click chemistry, Sylwia Walczak, Anna Nowicka, Dorota Kubacka, Kaja Fac, Przemysław Wanat, Seweryn Mroczek, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, *Chemical Science*, **2017**, 8, 260-267

Ethynyl, 2-Propynyl, and 3-Butynyl C-Phosphonate Analogues of Nucleoside Di- and Triphosphates: Synthesis and Reactivity in CuAAC, Przemysław Wanat, Sylwia Walczak, Blazej A. Wojtczak, Monika Nowakowska, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, *Organic Letters*, **2015**, 17 (12), 3062-3065

W przygotowaniu:

Doubly labelled nucleotide probes synthesized via one-pot-two-step click chemistry enable monitoring enzymatic activity in live cells, Przemysław Wanat, Renata Kasprzyk, Alicja Kijewska, Marcin Kalek, Paweł Sikorski, Karina Kwapiszewska, Robert Hołyst, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska.

Publikacje, których tematyka wykracza poza zakres niniejszej rozprawy:

Preparation of Synthetically Challenging Nucleotides Using Cyanoethyl P-Imidazolides and Microwaves, Malwina Strenkowska, Przemysław Wanat, Marcin Ziemniak, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska, *Organic Letters*, **2012**, 14, 18, 4782–4785

Searching for the ideal triazole: Investigating the 1, 5-triazole as a charge neutral DNA backbone mimic, Ysobel Baker, Diallo Traoré, Przemysław Wanat, Agnes Tyburn, Afaf El-Sagheer, Tom Brown, *Tetrahedron*, **2020**, 76(7), 130914.

Direct High-Throughput Screening Assay for mRNA Cap Guanine-N7 Methyltransferase Activity, Renata Kasprzyk, Mateusz Fido, Adam Mamot, Przemysław Wanat, Mirosław Smietanski, Michał Kopciał, Victoria Cowling, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, **2020**, *Chemistry-A European Journal*, 26, 49, 11266-11275

Część literaturowa

1. Wstęp

Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest fluorescencyjnym analogom adenozynotrifosforanu (ATP), które mogą służyć badaniu aktywności enzymów degradujących ATP. Część literaturowa tej pracy jest wprowadzeniem w temat biologii i chemii ATP i szerzej kwasów nukleinowych oraz zawiera przegląd technik eksperymentalnych, które obecnie wykorzystywane są w poznawaniu ich roli w metabolizmie.

Na początku części literaturowej omówione zostaną ogólne właściwości nukleotydów i konsekwencje biologiczne z nich wynikające. W kolejnych rozdziałach przedstawione zostaną funkcje, jakie ATP pełni w metabolizmie komórkowym, oraz następstwa sytuacji, w których metabolizm ATP zostaje zaburzony. Następnie omówione zostaną przykłady technik, które umożliwiają poznawanie metabolizmu ATP, w tym techniki wykorzystujące zmodyfikowane analogi ATP. Kolejne dwa rozdziały zostaną poświęcone dyskusji przykładów wykorzystania w badaniach biochemicznych fluorescencji ekscymerowej oraz efektu FRET, zjawisk o które opierają się sondy nukleotydowe będące przedmiotem niniejszej rozprawy. W końcu omówiona zostanie chemia „click”, ze szczególnym uwzględnieniem reakcji CuAAC, która była kluczowa w syntezie sond omawianych w niniejszej pracy, oraz inne reakcje wykorzystywane w syntezie analogów nukleotydów. Końcowy rozdział części literaturowej będzie omówieniem dwóch enzymów wykorzystywanych w badaniu właściwości sond otrzymanych w niniejszej pracy – fosfodiesterazy z jadu węża (PDE-I) oraz białka FHIT (bis(5'-adenozylotrifosfatazy).

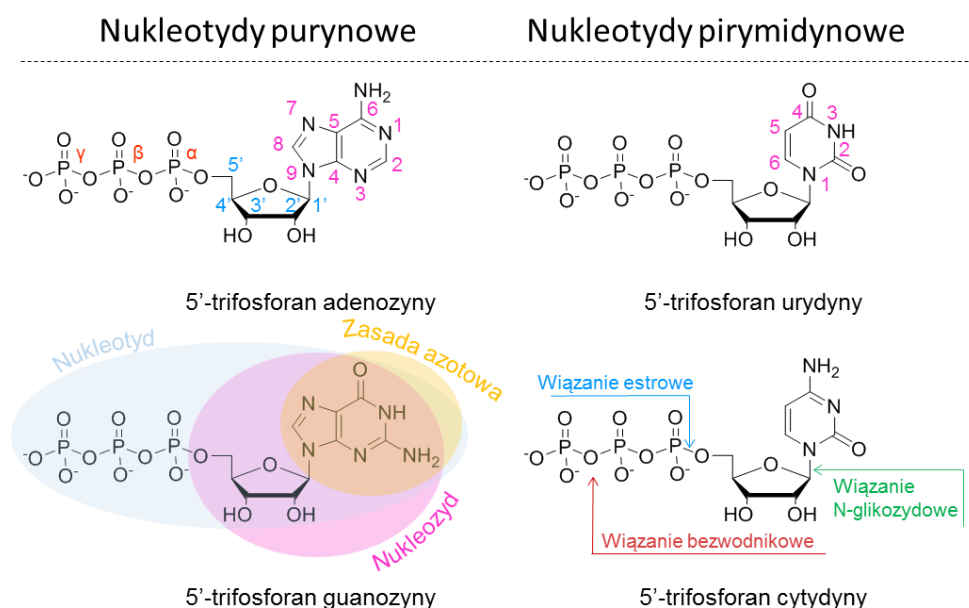
2. Chemia i biologia nukleotydów

2.1. Budowa nukleotydów

Nukleotydy to związki organiczne będące monomerami kwasu rybonukleinowego (RNA). Związki te składają się z zasady azotowej, rybozy oraz przynajmniej jednego ugrupowania fosforanowego przyłączonego wiązaniem estrowym do reszty rybozy. (Rys. 1) W podstawowym kodzie genetycznym występują cztery rodzaje rybonukleotydów – adenozynowy, urydynowy, guanozynowy i cytydynowy. Każdy z tych nukleotydów wykazuje podobną budowę, jedynym elementem różnicującym jest zasada azotowa przyłączona do atomu węgla C1' rybozy.

Zasady azotowe występujące w rybonukleotydach i rybonukleozydach to adenina, guanina, uracyl oraz cytozyna. Dwie pierwsze należą do grupy puryn, natomiast pozostałe są pirymidynami. Atom azotu N1 (w przypadku pirymidyn) lub N9 (w przypadku puryn) zasady azotowej połączony jest z atomem węgla w pozycji C1' rybozy poprzez wiązanie β -N-glikozydowe.

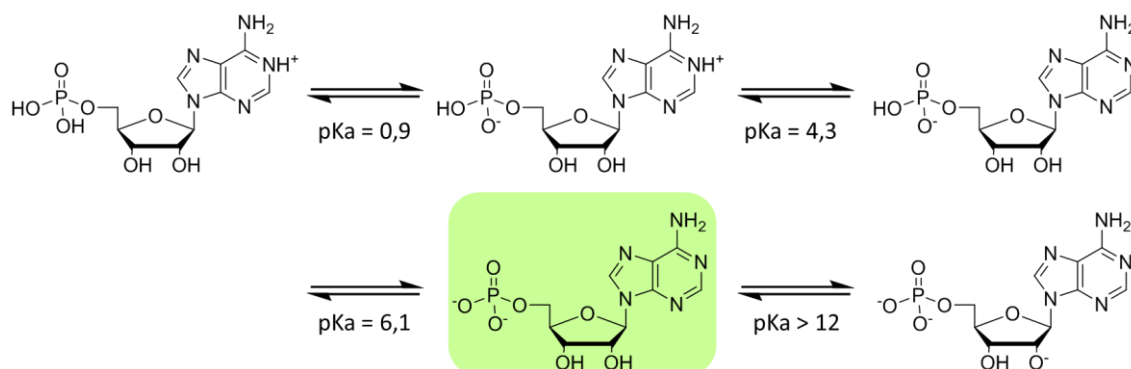
Nukleotydy najczęściej występujące w komórce zawierają ugrupowanie fosforanowe przyłączone do atomu tlenu w pozycji 5' wiązaniem estrowym. Ze względu na zdolność fosforanów do tworzenia wiązań bezwodnikowych możliwa jest wielokrotna fosforylacja nukleotydu, prowadząca do di-, bądź trifosforanów nukleozydów. Kolejne reszty fosforanowe nazywa się greckimi literami, przy czym α oznacza się grupę fosforanową połączoną z rybozą.



Rys. 1 Nomenklatura oraz numeracja atomów w rybonukleotydach

2.2. Stany protonacyjne nukleotydów

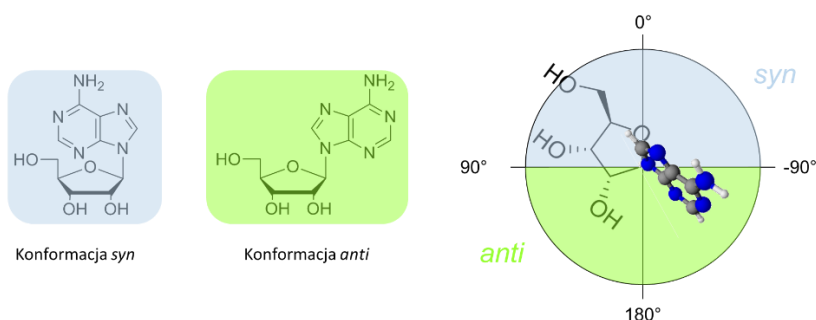
Nukleotydy są cząsteczkami mogącymi pełnić rolę kwasów Brønsteda. W przypadku 5'-monofosforanu adenozyne najbardziej kwasową grupą funkcyjną nukleotydu jest reszta fosforanowa, w której pK_a pierwszego protonu wynosi 0,9. W dalszej kolejności deprotonowana jest reszta adeniny (proton w pozycji N1, pK_a 4,3, obecny właściwie jedynie w niskim pH), a następnie drugi proton z reszty fosforanowej $pK_a = 6,1$. Protony znajdujące się w grupach hydroksylowych w pozycji 2' oraz 3' wykazują pK_a powyżej 12, jednak wartość ta jest powyżej wartości przeciętnego komórkowego pH (zakres 7,1 – 7,3),¹ co powoduje, że w warunkach fizjologicznych ta pozycja nukleotydu nie jest zdeprotonowana.^{2, 3} (Rys. 2)



Rys. 2 Kolejne wartości pK_a oraz ścieżka jonizacji adenosynomonofosoranu. Na zielono zaznaczono jon, który występuje w pH fizjologicznym.

2.3. Konformacja nukleotydów i nukleozydów

Nukleotydy i nukleozydy jako stosunkowo złożone związki chemiczne mają liczne wiązania pojedyncze, wokół których może zachodzić rotacja, co skutkuje różnymi konformacjami. Przykładowo wiązanie N-glikozydowe w nukleozydzie może przyjmować dwie skrajne konformacje tworząc dwa rotamery: *syn* oraz *anti*.⁴ Rotamer *syn* występuje wtedy, gdy kąt torsyjny χ między atomami C4-N9-C1'-O4' (dla nukleozydów purynowych) lub między atomami C2-N1-C1'-O4' (dla nukleozydów pirymidynowych) mieści się w zakresie $+90^\circ \geq \chi \geq -90^\circ$. Rotamer *anti* natomiast występuje, gdy wartość podanego kąta torsyjnego mieści się w granicach $-90^\circ \geq \chi \geq +90^\circ$.⁵ (Rys. 3) W przypadku deoksyrybonukleozydu adeninowego preferowaną konformacją jest konformacja *syn*, jednak bariera rotacji jest bardzo niska (około 1 kcal/mol),⁶ co skutkuje występowaniem obu rotamerów w podobnej ilości w roztworze.



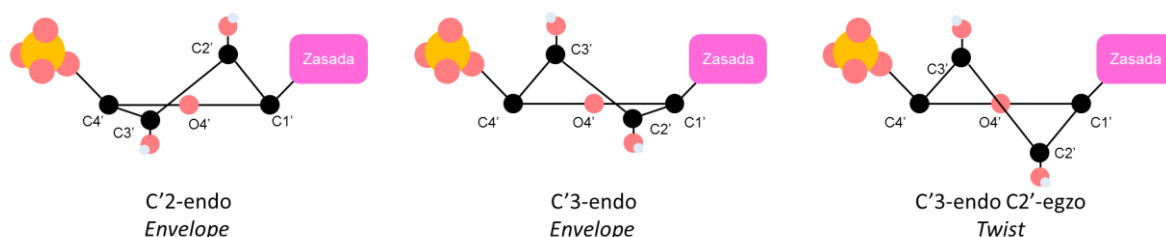
Rys. 3 Nukleozyd adenosynowy w formie *syn* oraz w formie *anti*. Obok przedstawiono graficznie kąty torsyjne między atomami C4-N9-C1'-O4', dla których nukleozyd adeninowy przyjmuje odpowiednią konformację (tutaj *anti*)

W przypadku mononukleotydów, zarówno purynowych jak i pirymidynowych, właściwie wyłączną konformacją jest konformacja *anti*.⁷ Podobnie jest w przypadku kwasów nukleinowych (B-DNA, A-DNA, A-RNA), w których rotamery występują właściwie wyłącznie w formie *anti*,⁸ chociaż znane są przykłady miejsc aktywnych

specyficznych struktur RNA i DNA (Z-DNA, aptamery, ryboprzłączniki, rybozymy), w których rotamery *syn* mogą stanowić do 5% wszystkich nukleotydów.⁵

Z względów energetycznych również pierścień rybozy nukleotydu nie ma formy płaskiego pięciokąta, ale występuje w formie różnych niepłaskich konformerów. Dwa główne konformery to *envelope* oraz *twist*. W pierwszym przypadku cztery atomy pierścienia leżą w jednej płaszczyźnie, poza którą wychodzi piąty atom, w przypadku *twist* dwa atomy leżą poza płaszczyznę wyznaczoną przez trzy pozostałe atomy pierścienia.

W przypadku konformacji *envelope* najczęściej występujące (najkorzystniejsze energetycznie) deformacje pierścienia to wychylenia atomów C2' lub C3' spoza płaszczyzny. Pozycję atomu wychylonego ponad płaszczyznę pierścienia w stronę zasady azotowej nazywa się pozycją *endo*, w przypadku przeciwnym jest to pozycja *egzo*. W konformacji *twist* płaszczyzna jest wyznaczona przez trzy sąsiadujące atomy: C4'–O4'–C1'. Pozostałe dwa wychylone są w przeciwne strony poza tę płaszczyznę. (Rys. 4)



Rys. 4 Schematyczne przedstawienie wybranych konformacji nukleotydu.

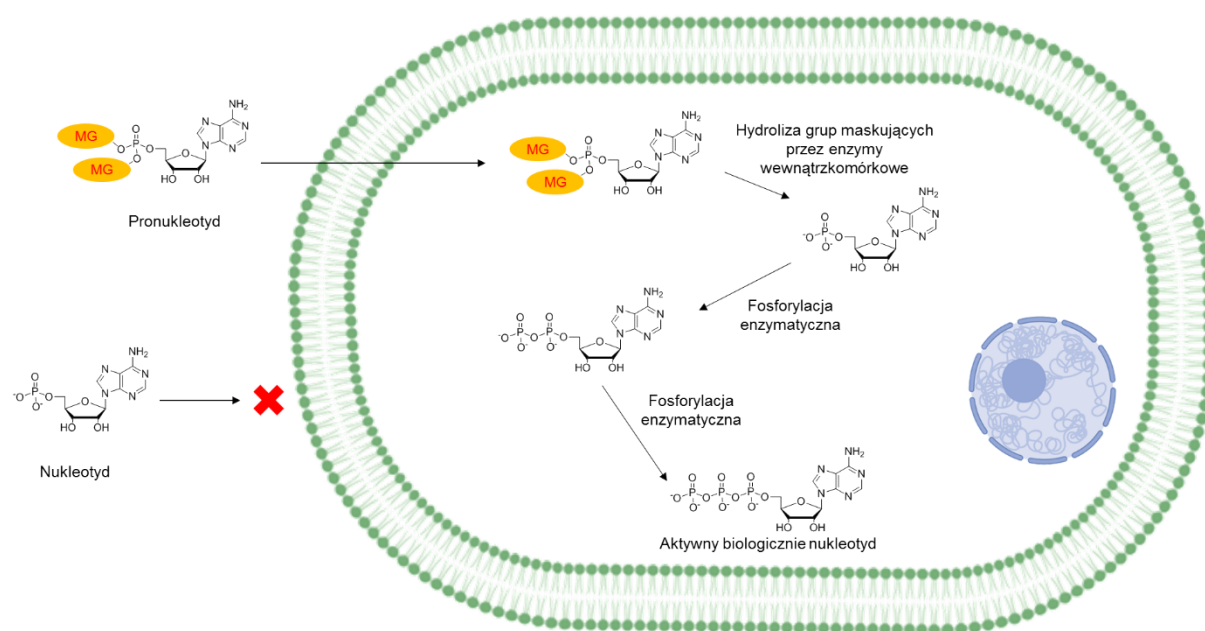
W przypadku nukleotydów tworzących kwasy nukleinowe widoczna jest preferencja określonej konformacji rybozy w zależności od rodzaju kwasu nukleinowego. Przykładowo dla deoksyrybonukleotydów w helisie B-DNA występują wyłącznie konformacje rybozy C2'-*endo*, natomiast w helisie typu A-DNA wyłącznie konformacje rybozy C3'-*endo*. Z kolei rybonukleotydy w łańcuchach RNA przyjmują właściwie wyłącznie konformację C3'-*endo*.⁸

2.4. Polarność nukleotydów oraz jej wpływ na ich transport dkomórkowy

Nukleotydy, jako cząsteczki zawierające przynajmniej jedno ugrupowanie fosforanowe, są związkami bardzo polarnymi. Manifestuje się to szczególnie mocno w fizjologicznym pH (a właściwie w każdym pH > 1, por. rozdz. 2.2). Niesie to ze sobą bardzo poważne konsekwencje w odniesieniu do stosowania nukleotydów jako leków. Niosą one ładunek ujemny, co utrudnia im penetrowanie błony komórkowej i wnikanie do wnętrza komórki, jeśli nie bierze się pod uwagę transportu aktywnego, endocytozy, czy wpływu białek wirusowych.⁹

Nukleozydy w przeciwieństwie do nukleotydów nie mają takich ograniczeń i proleki w formie nukleozydów mogą penetrować błonę komórkową. Jednakże ich zastosowanie jest ograniczone, gdyż eukariotyczne kinazy są enzymami wysoko wyspecjalizowanymi, często niezdolnymi do rozpoznania i fosforylacji innego nukleozydu niż naturalny.^{10, 11} Wynika z tego, że nienaturalny nukleozyd może nie zostać włączony do metabolizmu komórkowego i przez to jego zastosowanie nie odniesie żadnego skutku terapeutycznego, a nawet może wykazywać działanie cytotoksyczne, szkodliwe dla komórek gospodarza.¹²

Z tego powodu dużo korzystniejszym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie nukleotydu zamiast nukleozydu jako związku terapeutycznego. Niestety ze względu na wyżej wspomnianą wysoką polarność tej cząsteczki wprowadzenie jej do komórki jest utrudnione. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie tzw. pronukleotydów, związków, których ładunki elektryczne są zamaskowane. Przez to ich polarność jest znacząco obniżona i dużo łatwiej penetrują one błonę komórkową. Przykładem zastosowania takiego podejścia jest tworzenie estrów fosforanowych lub amidofosforanów z przyłączonymi niepolarnymi cząsteczkami organicznymi.^{13 14} Tak zmodyfikowane nukleotydy penetrują błonę komórkową, a w cytozolu grupy maskujące zostają zhydrolizowane przez obecne w komórce nukleozydazy, co uwalnia nukleotyd na miejscu przeznaczenia i umożliwia jego działanie terapeutyczne. (Rys. 5)



Rys. 5. Idea działania pronukleotydów. Nukleotyd zawierający zjonizowaną resztę fosforanową nie jest w stanie przedostać się przez błonę komórki. Jest to możliwe dopiero, gdy ujemne ładunki reszty fosforanowej zostaną zamaskowane z użyciem grup maskujących (MG). Grupy te powinny zostać usunięte przez enzymy wewnątrzkomórkowe, dopiero po pokonaniu przez pronukleotyd błony komórkowej.

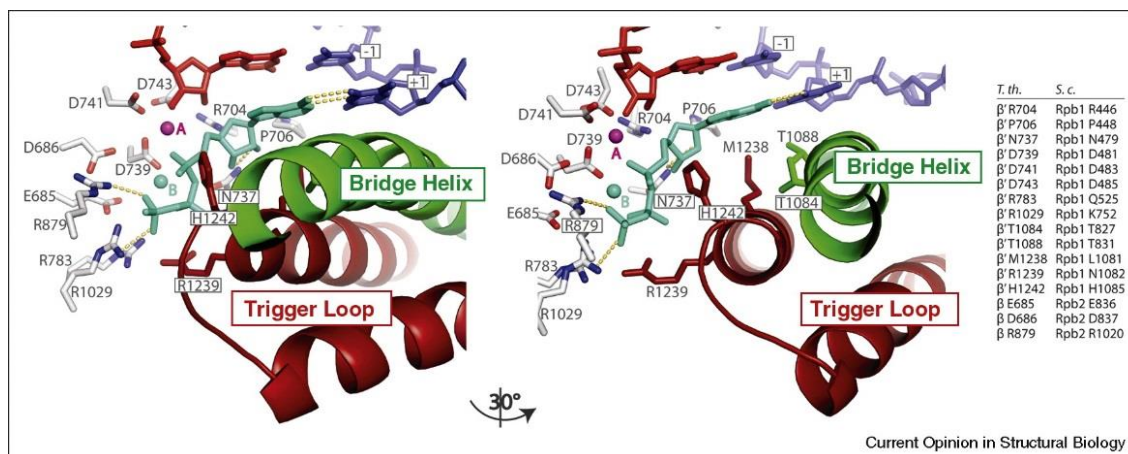
3. Wybrane biologiczne funkcje nukleotydów

3.1. Synteza RNA

Rybonukleotydy przede wszystkim są blokami budulcowymi wykorzystywanymi przez komórkę w syntezie RNA. Z punktu widzenia działania komórki jest to proces kluczowy dla metabolizmu, jako że cząsteczki RNA pełnią rolę przekaźnika informacji genetycznej pomiędzy DNA, które nigdy nie opuszcza jądra komórkowego, a maszyną translacyjną, która umiejscowiona jest w cytozolu. Z uwagi na wielkość porów jądrowych (~10 nm) rybonukleotydy dość swobodnie migrują między cytoplazmą i jądrem utrzymując średnie stężenie około 3 200 μ M (ATP; rzeczywisty zakres w ssaczej komórce może wynosić od 2 do nawet 8 mM), 470 μ M (GTP), 370 μ M (UTP), 90 μ M (CTP).^{15, 16} W ten sposób zawsze są dostępne dla polimerazy jako substraty w syntezie cząsteczek RNA.

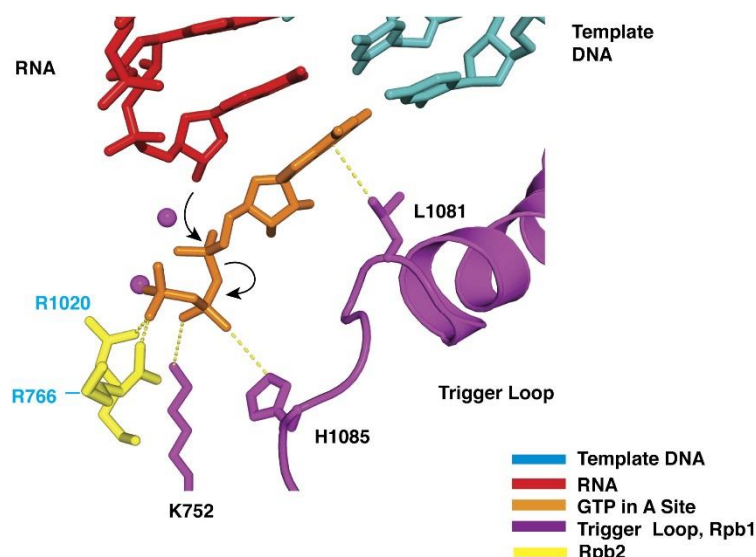
Proces transkrypcji eukariotycznych mRNA rozpoczyna się w momencie rozpoznania przez białko TBP (TATA-binding protein) specyficznej sekwencji TATA. Po utworzeniu kompleksu białko-DNA, struktura ta jest rozpoznawana przez szereg kolejnych czynników transkrypcyjnych, które ostatecznie doprowadzają do przyłączenia RNA polimerazy II (polimeraza syntetyzująca głównie mRNA) i rozpoczęcia transkrypcji. Polimeraza przesuwa się po nici DNA w kierunku 5'→3' nici kodującej. Już na samym początku transkrypcji na końcu 5' mRNA umieszczana jest charakterystyczna struktura kapu składająca się z 7-metyloguanozyny, połączonej z pierwszym transkrybowanym nukleotydem mostkiem 5'-5'-trifosforanowym.¹⁷ Synteza mRNA jest kontynuowana aż polimeraza dotrze do sekwencji poliadenylacji. Wtedy to tempo syntezy nowej nici RNA się zmniejsza, a polimeraza zostaje wyparta z nici DNA.

Jedną z najistotniejszych właściwości polimerazy RNA jest rozpoznawanie rybonukleotydów. Białko musi rozróżniać je od deoksyrybonukleotydów, a także rozpoznać, który nukleotyd należy wybrać, by nowo syntetyzowana nić była komplementarna do nici matrycowej. Eukariotyczne polimerazy RNA potrafią rozróżnić rybonukleotydy od deoksyrybonukleotydów, gdyż zawierają w miejscu wiązania nukleotydu aminokwas asparaginę. Rozróżnienie następuje poprzez stworzenie wiązania wodorowego pomiędzy łańcuchem bocznym asparaginy a atomem tlenu 2'-O rybonukleotydu (Rys. 6). Potwierdzeniem istotności tego oddziaływania jest fakt, że zamiana asparaginy na inny aminokwas skutkuje znaczącym pogorszeniem zdolności rozróżniania nukleotydów.^{18, 19} Ponadto stężenie dNTP w komórce jest około 10-krotnie niższe niż NTP,²⁰ co dodatkowo podwyższa selektywność polimerazy RNA.



Rys. 6 Rozróżnianie przez polimerazę RNA dNTP od NTP. Kluczowe w tym procesie jest oddziaływanie z asparaginą (N737). Na przedstawionym rysunku ukazany jest model bakteryjnej polimerazy (*T. thermophilus*), ale aminokwas ten jest ściśle konserwowany i występuje w tej pozycji także w eukariotycznych polimerazach. Zaczerpnięto z pracy Sydow 2009¹⁸ Powielone za zgodą wydawcy (nr licencji 4914130372316)

Rozróżnienie pomiędzy czterema zasadami nukleotydów odbywa się w odniesieniu do matrycowej nici DNA. Polimeraza zawierająca nukleotyd w miejscu aktywnym jest układem metastabilnym. Jeśli nie zostaną utworzone wiązania wodorowe z komplementarnym nukleotydem z nici DNA, kompleks polimeraza – nukleotyd rozpadnie się. Jeśli natomiast polimeraza ma w swoim miejscu aktywnym właściwy nukleotyd, kompleks ten zostaje ustabilizowany. Jednym z oddziaływań stabilizujących jest oddziaływanie histydyny z β-fosforanem nukleotydu. Oddziaływanie to obniża gęstość elektronową wiązania między resztami fosforanowymi α i β, czyniąc ugrupowanie fosforanowe α podatnym na atak nukleofilowy zgodnie z mechanizmem S_N2 przez atom tlenu 3'-O ostatniego nukleotydu nowo syntetyzowanej nici RNA.¹⁹ (Rys. 7)



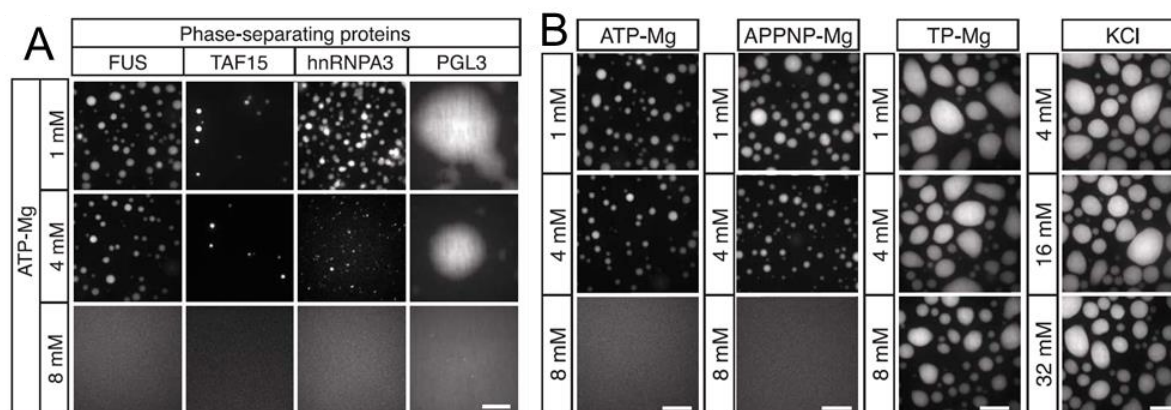
Rys. 7 model wiązania nukleotydu w miejscu aktywnym polimerazy RNA. Oddziaływanie z zasadowymi aminokwasami (histydyna H1085, lizyna K752, arginina R1020, R766) zwiększa podatność grupy fosforanowej α na atak nukleofilowy atomu tlenu 3'O łańcucha RNA. Zaczerpnięto z pracy Wang 2006¹⁹ Powielone za zgodą wydawcy (nr licencji 4914820018600).

3.2. ATP jako biologiczny hydrotrop

W poprzednim rozdziale wspomniano, że stężenie ATP jest najwyższe ze wszystkich nukleotydów (2–8 mM, około sześć razy wyższe niż pozostałych nukleotydów). ATP pełni rolę nie tylko substratu w syntezie RNA, ale także naturalnego hydrotropu (cząsteczki zwiększającej rozpuszczalność słabo rozpuszczalnych związków organicznych²¹), który zwiększa rozpuszczalność białek w środowisku cytozolu. W toku ewolucji rozwiązanie to mogło okazać się konieczne, aby powstające coraz większe makrocząsteczki biologiczne mogły być pomieszczone na małej przestrzeni komórki. ATP jako podstawowy składnik RNA szeroko rozpowszechniony w komórkach bardzo dobrze nadawał się do tej roli ze względu na swoją amfifilową budowę; zasada azotowa pełni rolę części hydrofobowej, natomiast grupa trifosforanowa – części hydrofilowej.

Właściwość ta jest bardzo istotna ze względu na skłonność niektórych białek do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów. Peptydy takie jak Aβ42 mogą agregować tworząc amyloid beta, który jest powiązany z chorobą Alzheimera.²² Innym przykładem jest białko FUS, które bierze udział w procesach naprawy DNA, czy syntezy RNA. W przypadku mutacji może tworzyć agregaty, prowadzące do choroby Huntingtona.²³

W eksperymencie *in vitro* imitującym fizjologiczne stężenia białka FUS oraz soli dowiedziono, że im wyższe stężenie ATP w kompleksie z Mg²⁺ zastosowano, tym lepsza była rozpuszczalność białka w układzie.²⁴ Taki sam efekt zaobserwowano także dla innych białek, co ukazano w tabeli dla różnych stężeń ATP-Mg. (Rys. 8A) Co ciekawe, podobny efekt można uzyskać także zwiększając siłę jonową roztworu poprzez dodanie różnych soli nieorganicznych. Porównanie przedstawione poniżej (Rys. 8B) ukazuje jednak, że niemożliwe jest uzyskanie takiego efektu przy zastosowaniu porównywalnego stężenia soli. Autorzy dowiedli też, że hydrotropowe właściwości ATP są niezależne od jego funkcji przenośnika energii (por. 3.4), bowiem analog ATP zawierający niehydrolizowalne ugrupowanie β,γ-imidodifosforanowe (APPNP-Mg) również zapobiegał powstawaniu białkowych agregatów.



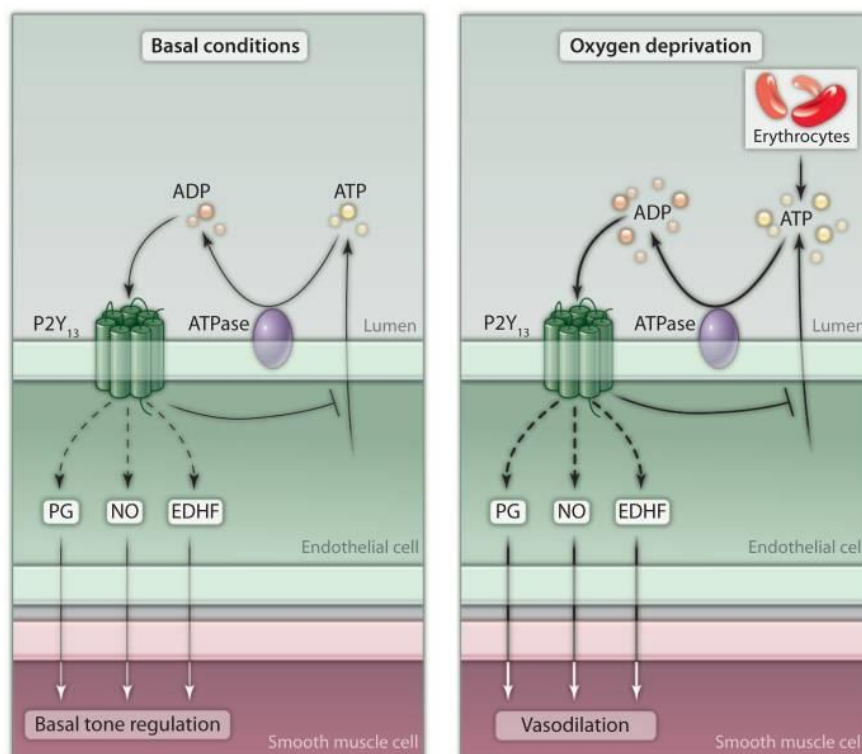
Rys. 8 Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego umożliwiającego wizualizację agregujących białek. A) Przy jednakowym stężeniu białek, coraz wyższe stężenie ATP-Mg umożliwia rozdzielenie faz i zapobiega tworzeniu agregatów. B) Podobnego wpływu na rozpuszczalność białka FUS w tych

3.3. ATP jako cząsteczka sygnałowa.

Komórki wykorzystują ATP jako cząsteczkę sygnałową, która wydzielana na zewnątrz oddziałuje z receptorami P2X oraz P2Y.²⁵ Możliwe jest oddziaływanie ATP wydzielonego przez komórkę, zarówno z jej własnymi receptorami (sygnalizacja autokrynną) jak i z receptorami innych komórek (sygnalizacja parakrynną).

Chociaż komórki nieustannie wydzielają ATP do otoczenia, sytuacje stresowe stymulują zwiększoną jego sekrecję. Do takich stymulatorów można zaliczyć zmieniające się ciśnienie osmotyczne,²⁶ atak patogenu,²⁷ czy nawet stymulację mechaniczną.²⁸ Wydzielony ATP łączy się z receptorami P2, bądź po hydrolizie enzymatycznej do adenozyne, z receptorami P1 komórek. Wpływa to m.in. na stężenie jonów wapnia w komórkach. W organizmach wielokomórkowych skutkuje to różnorodnymi konsekwencjami w zależności od rodzaju tkanki. Przykładowo w przypadku komórek śródbłonna otaczających naczynia krwionośne stale wydzielane ATP jest hydrolizowane przez zewnątrzkomórkowe ATPazy do ADP, które z kolei oddziałuje z receptorem P2Y₁₃. Receptor ten stymuluje powstawanie tlenku azotu (NO), prostaglandyn oraz innych związków sygnałowych, które wydzielane na niskim poziomie służą utrzymaniu mięśni tętnic w stałym napięciu. (Rys. 9) Jednocześnie hamuje on wydzielanie ATP przez komórki śródbłonna (mechanizm autokrynnny).²⁹ W warunkach obniżonej dostępności tlenu eryocyty wydzielają ATP, zwiększając jego stężenie w przestrzeni międzykomórkowej (mechanizm parakrynnny). Wynikające z tego zwiększone stężenie ADP stymuluje komórki śródbłonna do zwiększonej produkcji wyżej wspomnianych związków sygnałowych, co powoduje rozkurcz mięśni gładkich tętnicy i zwiększenie objętości krwi w tkance.³⁰

Podobnie jak w przypadku wykorzystania ATP jako cząsteczki hydrotropowej (rozdział 3.2), zastanawiające może być wykorzystanie tego dość wartościowego dla komórki związku w roli cząsteczki sygnałowej wydzielanej poza komórkę. Hipoteza odpowiadająca na ten problem może być taka, że obecność wolnej cząsteczki ATP w środowisku została w toku ewolucji uznana za sygnał niebezpieczeństwa, gdyż nukleotyd mógł się tam pojawić w wyniku zniszczenia innych komórek.³¹ Przemawia za tym fakt, że niektóre spośród dzisiejszych prostych organizmów (np. *T. thermophila*) wykazują ujemną chemotaksję wobec ATP obecnego w otoczeniu.³²



Rys. 9 Mechanizm działania ATP w regulacji zwiększania światła tętnicy w warunkach fizjologicznych oraz w warunkach niedostatecznej ilości tlenu w tkance.
PG – prostaglandyny, NO – tlenek azotu, EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzacyjny
Ilustracja zaczerpnięta z pracy Corriden i Insel ³¹

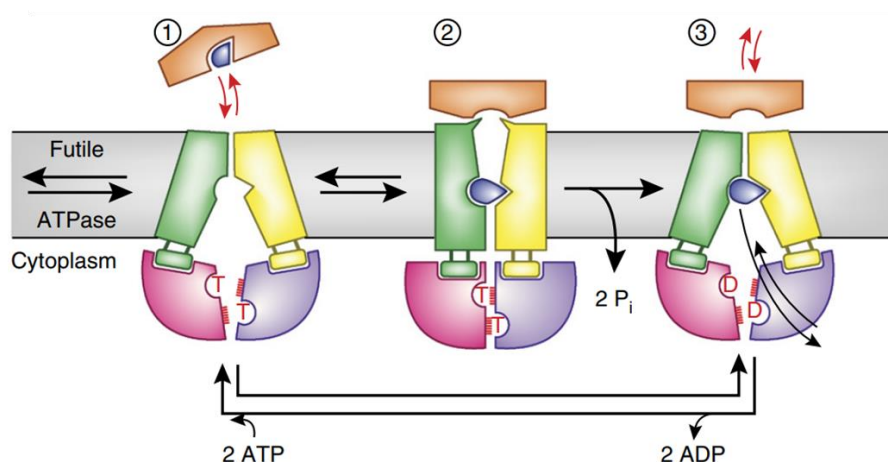
3.4. ATP jako cząsteczka przenosząca energię

Pośród wszystkich trifosforanów nukleozydów to właśnie ATP jest cząsteczką będącą źródłem energii w największej liczbie reakcji metabolicznych. W przypadku całego przeciętnego organizmu ludzkiego łączna masa ATP wynosi około 100 g. Związek ten jest błyskawicznie zużywany – średni czas półtrwania ATP w komórce wynosi około jednej minuty. To powoduje, że podstawowe procesy metaboliczne (nie wliczając w to okresów zwiększonego wysiłku, itp.) takiego organizmu jak człowiek, mogą w ciągu doby zużyć masę ATP odpowiadającą masie tego organizmu.³³

Kluczowym fragmentem cząsteczki ATP dla funkcji przenoszenia energii jest wiązanie β,γ -pirofosforanowe. Jego hydroliza pozwala uzyskać około 7,3 kcal/mol energii,³⁴ która może być wykorzystana do przeprowadzenia reakcji enzymatycznej.

Przykładem bardzo dużej rodziny białek, które wykorzystują ATP jako źródło energii są transportery ABC (*ATP-binding cassette*). Jest to ewolucyjnie konserwowana grupa transporterów,³⁵ pozwalająca na pobieranie przez komórkę substancji z otoczenia, albo wydzielania różnych związków z cytoplazmy do otoczenia. Ich działanie może mieć związek z takimi zjawiskami jak zachowanie homeostazy osmotycznej, podziały komórkowe czy nawet nabywanie oporności przez bakterie.³⁶ Białka te składają się z dwóch domen – domeny wiążącej nukleotyd (NBD, *nucleotide binding domain*), skierowanej do cytoplazmy, oraz domeny transbłonowej

(TMD, *transmembrane domain*). Przykładowy mechanizm działania transporterów ABC można wytłumaczyć na przykładzie transportera maltozy w *E. coli*.³⁷ Jego działanie rozpoczyna się w momencie przyłączenia maltozy związanej z białkiem nośnikowym do zewnętrznej części domeny transbłonowej. (Rys. 10, pkt 1) Powoduje to zmianę konformacji domen NBD, co pozwala na otwarcie kanału między domenami TMD. Mimo relatywnie słabego powinowactwa maltozy do kieszeni wewnątrz kanału, może zostać ona tam związana, z uwagi na wysokie lokalne stężenie. (Rys. 10, pkt. 2) Następnie dochodzi do hydrolizy ATP związanego z NBD, co powoduje zmianę konformacji całego transportera i jego otwarcie w kierunku cytoplazmy. (Rys. 10, pkt. 3) Proces ten kończy uwolnienie transportowanej cząsteczki do wnętrza komórki i wymiana ADP na ATP.



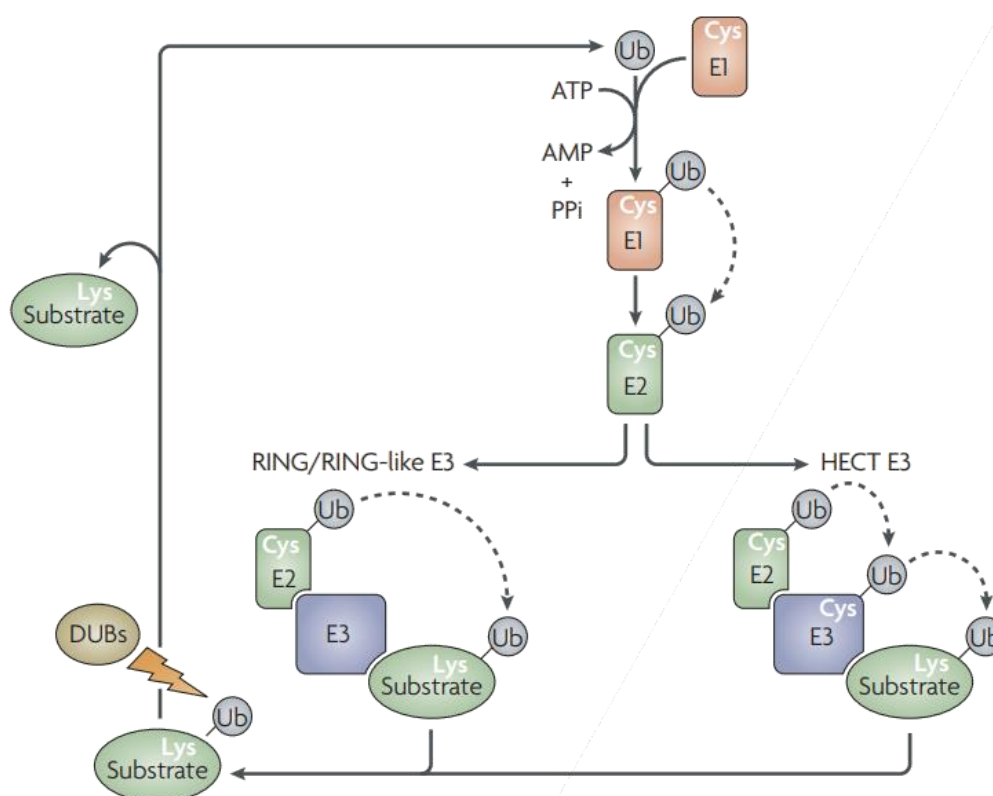
Rys. 10 Schematyczne ukazanie działania transportera maltozowego w *E. coli*. Ilustrację zaczerpnięto z pracy Locher.³⁷ Powielone za zgodą wydawcy (nr licencji 4914820921057).

Do białek wykorzystujących ATP do swojego działania zalicza się także mięśniowe białko – miozynę.³⁸ W jej przypadku hydroliza przyłączonego ATP zmienia ustawienie miozyny wobec aktyny, co umożliwia ruch mięśnia.

Innym białkiem niezbędnym do prawidłowego działania komórki jest aminoacylowa syntetaza tRNA. Wykorzystuje ona ATP do aktywowania cząsteczki aminokwasu poprzez utworzenie jego adenylanu. W następnym kroku do enzymu przyłącza się odpowiednie tRNA, które atomem tlenu 3'-OH dokonuje ataku na zaktywowaną grupę karboksylową aminokwasu tworząc addukt tRNA-aminokwas (tRNA-AA). Powstały tRNA-AA jest uwalniany do cytoplazmy, gdzie może zostać wykorzystany przez rybosom w syntezie białka.³⁹

Procesem przebiegającym z wykorzystaniem ATP, jest także ubiquitynacja. Jest to proces niezbędny, aby niepotrzebne białka mogły zostać skierowane do degradacji, w celu odzyskania składających się na nie aminokwasów.⁴⁰ Zanim do tego dojdzie, do łańcuchów lizyny białka kierowanego do degradacji musi zostać przyłączona ubiquityna. Jest to kilkustopniowy proces, który rozpoczyna reakcja katalizowana przez enzym E1 (Rys. 11). Wiąże on ubiquitynę oraz cząsteczkę ATP, prowadząc do

utworzenia aktywnego adenylanu ubikwityny (będącego mieszanym bezwodnikiem między C-kończową grupą karboksylową i grupą α -fosforanową), który następnie reaguje z łańcuchem bocznym cysteiny białka E1, tworząc kowalencyjny addukt ubikwityna-E1.⁴¹ Addukt ten jest substratem w dalszych reakcjach, prowadzących do ubikwitynacji docelowego białka.⁴²



Rys. 11 Schematyczne podsumowanie procesu ubikwitynacji białka.
Ilustracja zaczerpnięta z pracy Ravid i Hochstrasser.⁴² Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914821059705).

Przytoczone tutaj przykłady są ilustracją tego, że ATP jest „nośnikiem energii” w kluczowych z punktu widzenia organizmu procesach – pobieraniu substancji z otoczenia, regulacji degradacji białek, tworzenia substratów do procesu translacji, czy w końcu w ujęciu makroskopowym – ruchu mięśnia. Podane przykłady ukazują też realną rolę ATP w umożliwianiu tych reakcji chemicznych; nie jest tak, że sama hydroliza cząsteczki doprowadza do uwolnienia energii, która jest następnie „przechwytywana” przez enzym, który akurat potrzebuje jej do przeprowadzenia reakcji. „Wysokoenergetyczne” wiązania pirofosforanowe oznaczają tak naprawdę wiązania, które relatywnie łatwo mogą zostać zhydrolizowane, zwłaszcza przy udziale enzymu. Hydroliza ta doprowadza najczęściej do fosforylacji (bądź adenylacji) jakiegoś substratu, co drastycznie zmienia jego polarność, a także właściwości chemiczne. Przyłączona reszta fosforanowa może pełnić rolę grupy opuszczającej, która aktywuje

niereaktywny w inny sposób substrat. Aktywacja ta czyni go podatnym na atak nukleofilowy, który w innym przypadku nie byłby możliwy.

W przypadku hydrolizy ATP może dochodzić też do fosforylacji jednej z domen białkowych. Zwykle wiąże się to z drastyczną zmianą polarności tej domeny i w rezultacie zmianą konformacji całego białka, co może być czynnikiem katalizującym reakcję chemiczną. Podobny wpływ może wywrzeć zmiana związanego z białkiem ATP na ADP/AMP – cząsteczki te różnią się kształtem, co również może skutkować zmianą konformacji białka, co będzie miało wpływ na jego funkcję katalityczną.

3.5. Podsumowanie rozdziału

ATP pełni w komórce wiele istotnych funkcji. Umożliwia przeprowadzenie reakcji enzymatycznych, będąc nośnikiem energii oraz donorem grupy fosforanowej. Pełni rolę cząsteczki sygnałowej, a także jest substratem wyjściowym w syntezie pochodnych cząsteczek sygnałowych (adenozyna, ADP, cykliczny adenozynomonofosforan⁴³). ATP jest także substratem w syntezie RNA, które jest kluczowe w procesie realizacji informacji genetycznej; pełni ono rolę matrycy w syntezie białek (mRNA), nośnika aminokwasów (tRNA) oraz samej maszyneryi translacyjnej (rRNA wchodzący w skład rybosomu; reakcja tworzenia wiązania peptydowego jest katalizowana właśnie przez rybonukleinową część rybosomu⁴⁴). W końcu ATP jest naturalnym hydrotropem, którego obecność zapobiega agregacji białek w bardzo zatłoczonym środowisku wnętrza komórki.

Przytoczone przykłady ukazują wszechstronność tej cząsteczki i liczbę zadań, do których jest ona wykorzystywana w metabolizmie komórkowym. Z tego względu, zaburzenia metabolizmu ATP mogą powodować bardzo poważne choroby. W następnym rozdziale omówione zostaną wybrane dysfunkcje metabolizmu ATP i ich konsekwencje.

4. Dysfunkcje metabolizmu ATP

4.1. Zaburzenia funkcjonowania ATPaz

ATPazy to klasa enzymów, w skład której wchodzi białka błonowe biorące udział w degradacji, bądź tworzeniu ATP, przy jednoczesnym przemieszczeniu protonów przez błonę biologiczną. Jedną z podgrup należących do tych enzymów jest podgrupa V-ATPaz (wakuolarnie ATPazy). Enzymy te są silnie konserwowane ewolucyjnie i powszechnie występują w błonach komórkowych różnych organelli wielu organizmów.⁴⁵ W skali komórkowej są one enzymami utrzymującymi stałe pH w odpowiednich przedziałach subkomórkowych np. w lizosomie, gdzie pH między 6,5 a 4,5⁴⁶ jest optymalne dla funkcjonowania hydrolaz niezbędnych w trawieniu

węglowodanów, tłuszczu, czy białek. W skali tkanek V-ATPazy pełnią istotną funkcję przy regulacji homeostazy pH organizmu, biorą udział w regulacji resorpcji wapnia w kościach (obniżając pH promują rozpuszczanie hydroksyapatytu⁴⁷), czy odpowiadają za utrzymanie obniżonego pH w kanalikach nerkowych.⁴⁸

Zaburzenia działania V-ATPaz mogą nieść poważne konsekwencje dla całego organizmu. Przykładowo ich szczególnie wysoką aktywność odnotowano w komórkach nowotworowych, które wykazywały największą skłonność do tworzenia przerzutów. Cytosol komórki nowotworowej ma niższe pH w stosunku do cytozolu zdrowych komórek. Dzieje się tak ze względu na środowisko beztlenowe i duży udział glikolizy w pozyskiwaniu energii, co prowadzi do produkcji kwasowych metabolitów.⁴⁹ Aby przeżyć, komórka nowotworowa zużywa większe ilości ATP, wydalając większość protonów do otoczenia, do czego wykorzystuje V-ATPazy.⁵⁰ Z kolei zakwaszenie środowiska zewnątrzkomórkowego umożliwia działanie katepsyn (proteazy normalnie aktywne w lizosomach), które degradują macierz międzykomórkową i stwarzają pole do inwazji nowotworu.

ATPazy nie są jedynie białkami błonowymi. W komórkach występuje superklasa enzymów oznaczona jako AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities), które pełnią rozmaite funkcje w cytoplazmie wykorzystując ATP jako źródło energii.

W poprzednim rozdziale (por. 3.2) wspomniano, że ATP w dużych stężeniach w komórce działa jako biologiczny hydrotrop zapobiegający agregacji białek. W tym zakresie ATP służy także jako źródło energii dla enzymów rozbijających agregaty białkowe w komórkach. Przykładowo drożdżowe białko Hsp104 z klasy AAA+ jest w białkiem szoku cieplnego.⁵¹ Podniesienie temperatury może sprzyjać denaturacji białek, co prowadzi do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów w komórce.⁵² Hsp104 jest w stanie dzielić agregaty na mniejsze części, a następnie doprowadzać do ich degradacji, co zapobiega ich wytrącaniu się w cytozolu. Białko Hsp104 w obecności ATP łączy się homoheksamery. W tej postaci może ono oddziaływać z białkowymi agregatami, rozbijając je i czyniąc na powrót rozpuszczalnymi. W literaturze postulowane są dwa mechanizmy działania białka Hsp104. Pierwszy to mechanizm „łomu”, który zakłada rozszczepianie agregatów na mniejsze poprzez przeciwstawne działanie dwóch domen białka. Drugi to mechanizm „koła zębatkowego”, które obracając się przeciąga pojedyncze peptydy agregatu przez kanał centralny Hsp104 i prowadzi do ich rozplecenia. W ten sposób umożliwia dojście do nich białkom wyspecjalizowanym w rozbijaniu mniejszych agregatów. Zaburzenia w działaniu białek szoku cieplnego (Hsp104, ale także innych, wspierających proces niszczenia złożeń białkowych) skutkują zwiększeniem ilości agregatów białkowych, które mogą być potencjalnie niebezpieczne dla komórki.⁵³

4.2. Zaburzenia funkcjonowania enzymów fosforylujących i defosforylujących białka (kinaz i fosfataz)

W rozdziale 3.4 przedstawiono udział cząsteczki ATP jako donora grupy fosforanowej w reakcjach (de)fosforylacji białek. Jest to reakcja powszechna w metabolizmie komórkowym, a zaburzenia enzymów ją katalizujących (kinaz oraz fosfataz) mogą skutkować poważnymi dysfunkcjami procesów życiowych organizmu.

Jedną z postulowanych przyczyn Choroby Alzheimera jest nagromadzenie agregatów białka tau (*tubulin-associated unit*).⁵⁴ Białko to występujące w komórkach nerwowych zaangażowane jest w polimeryzację tubulin i łączenie ich z organellami komórkowymi. Białko tau może być fosforylowane przez kinazy, co obniża jego zdolność do polimeryzacji tubulin i jest naturalnym sposobem regulacji jego aktywności.⁵⁵ Ponadto modyfikacja ta zmniejsza jego podatność na hydrolizę.⁵⁶ W zdrowym mózgu tau występuje w formie najwyżej dwufosforylowanego białka.⁵⁷ W mózgach ludzi chorych na chorobę Alzheimera zaobserwowano, że ilość reszt fosforanowych może sięgać nawet 7-8 na białko.⁵⁸ Hiperfosforylacja jest spowodowana nadaktywnością kilku kinaz (MAPK, Cdk5, GSK3) przy jednoczesnym zahamowaniu aktywności fosfataz PP2A, które w normalnych warunkach powinny usuwać nadmierne grupy fosforanowe. Z biegiem czasu nadmiernie fosforylowane białko tau gromadzi się, a następnie tworzy agregaty, które tracą rozpuszczalność i wytrącają się w cytoplazmie neuronów. Doprowadza to do niszczenia neuronów i w konsekwencji utratę funkcji całego mózgu.⁵⁹

Czynnikiem białkowym, który pełni istotną rolę w łączeniu cytoszkieletu komórki z macierzą zewnątrzkomórkową są integryny. Białka te pełnią również rolę sygnalizacyjną – mogą promować wzrost, podział lub migrację komórek, zarówno normalnych, jak i nowotworowych.⁶⁰ Sygnał przekazywany jest przez białka powiązane z integrynami – są to różnego rodzaju kinazy, między innymi niereceptorowe kinazy tyrozynowe (PTK) takie jak kinaza FAK (*focal adhesion kinase*)⁶¹ czy kinazy z rodziny Src.⁶² Rekrutacja FAK do cytoplazmatycznej części β -integriny następuje za pośrednictwem białek – taliny i paksiliny. Jednocześnie kinaza FAK ulega autofosforylacji, co umożliwia jej oddziaływanie z kolejną kinazą – Src.⁶³ Kompleks FAK-Src odpowiada za utrzymanie kształtu komórki oraz za jej zdolność przylegania do przestrzeni międzykomórkowej.⁶⁴ Jego nadaktywność zaobserwowano w inwadopodiach – strukturach komórkowych powiązanych ze zdolnością komórek do inwazji i tworzenia przerzutów.^{65, 66} Obecność kinazy FAK jest niezbędna dla właściwego funkcjonowania komórki. Delecja genu odpowiadającego za jej ekspresję powodowała śmierć komórek naskórka w eksperymentach zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Mimo to dowiedziono, że inhibicja obecnej w tych komórkach kinazy FAK zapobiega rozwojowi chemicznie indukowanego nowotworu.⁶⁷ Z kolei nadaktywność kinazy FAK sprzyja powstawaniu nowotworów. Białko to potrafi powstrzymać proces apoptozy indukowany przez białko p53,⁶⁸ a ponadto wzmacnia działanie kinazy PI3K, która odpowiada za skierowanie komórki na drogę wzrostu (ścieżka sygnałowa Akt/PKB).⁶⁹

Z tego powodu kinaza FAK stanowi interesujący cel terapeutyczny, którego zablokowanie może być jedną z metod walki z nowotworami.

4.3. Podsumowanie rozdziału

ATP jako centralna cząsteczka metabolizmu bierze udział w wielu reakcjach enzymatycznych w komórce jako źródło energii. Zaburzenia w szlakach metabolicznych wykorzystujących ATP mogą powodować poważne konsekwencje dla komórki. Enzymy katalizujące reakcje przeniesienia grupy fosforanowej z ATP na białko często mogą okazywać się celami terapeutycznymi w wielu schorzeniach. Żeby jednak móc to potwierdzić potrzebne są metody i narzędzia pozwalające na stwierdzenie, który element szlaku jest dysfunkcyjny. Do tej pory opracowano szereg metod badania aktywności enzymów wykorzystujących ATP oraz wizualizacji samego ATP. Zostaną one przedstawione w kolejnym rozdziale.

5. Metody detekcji ATP

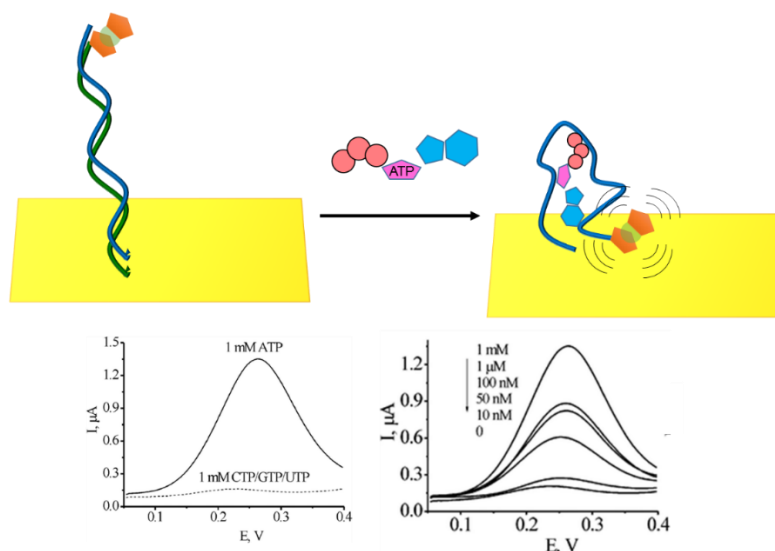
5.1. Detekcja ATP *in vitro*

Detekcja i oznaczanie ilości ATP w systemach pozakomórkowych nie nastręcza zwykle wiele trudności. Można do tego celu wykorzystać wysokosprawną chromatografię ciekową (HPLC),⁷⁰ spektrometrię mas,⁷¹ czy też metody elektrochemiczne, bądź optyczne.^{72, 73} Metody zakładające badanie stężenia uwolnionego ATP pozostawiają dość dużą swobodę działania, gdyż nie zakładają pozostawienia przy życiu komórki, w której stężenie nukleotydu jest oznaczane. W przypadku przeżyciowego oznaczania ATP, czy to wewnątrz, czy też na zewnątrz komórki potrzebne są delikatniejsze metody, takie jak na przykład metody fluorescencyjne.

5.2. Detekcja ATP wydzielanego przez komórki

W przypadku oznaczania stężenia ATP, które komórka wysyła do otoczenia (por. rozdział 3.3) zastosowanie znaleźć mogą metody elektrochemiczne. Podejście to zostało zastosowane w pracy Hazamy *et al.*,⁷⁴ w której badano odpowiedź komórek trzustki szczura na podanie glukozy. Jako sensor posłużyły komórki z linii PC12, zawierające na swej powierzchni receptor P2X₂. Po umieszczeniu tych komórek w pobliżu komórek trzustki, badano odpowiedź prądową za pomocą techniki *patch-clamp*.⁷⁵ W technice tej badane są zmiany prądu, które są wywoływane przez

dołączenie liganda do receptora błonowego komórki, pomiędzy komórką, a jej otoczeniem. W przypadku badań Hazamy było to dołączenie ATP do receptora P2X₂. W ten sposób uzyskano sondę, która była w stanie elektrochemicznie zmierzyć lokalne stężenie ATP na podstawie zmian w natężeniu przepływającego w układzie prądu. Mniej skomplikowany układ wykorzystujący elektrochemię w badaniu stężenia ATP zastosowano w pracy Zuo *et al.*⁷⁶ Naukowcy opracowali układ aptameru rozpoznającego ATP, który zawiera cząsteczkę ferrocenu na końcu 5', a przyłączony jest do powierzchni złotej elektrody za pomocą grupy tiolowej obecnej na końcu 3'. Przed pojawieniem się ATP w środowisku aptamer tworzy dwuniciową helisę DNA, której koniec z ugrupowaniem ferrocenowym oddalony jest od powierzchni złota. Pojawienie się cząsteczki ATP w środowisku stabilizuje III-rzędową strukturę DNA i zbliża resztę ferrocenu do powierzchni złota, co indukuje mierzalny impuls elektrochemiczny. (Rys. 12) Zastosowanie układu zawierającego aptamer jest korzystne ze względu na jego wysoką czułość wobec ATP, przy jednoczesnym braku odpowiedzi indukowanej przez inne trifosforany (UTP, CTP, GTP).



Rys. 12 Schemat działania elektrody zawierającej aptamer wiążący ATP.

Wykazuje ona selektywność wobec ATP, a przy tym prąd generowany w układzie jest proporcjonalny do stężenia ATP. Rysunek na podstawie publikacji Zuo *et al.*⁷⁶ Copyright (2007) American Chemical Society.

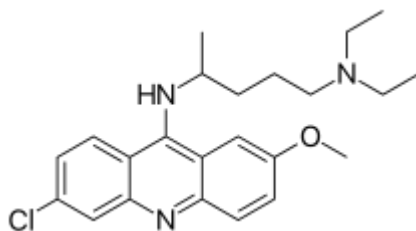
Podobny sensor wykorzystujący zmianę konformacji został wykorzystany przez Vancraenenbroeck i Webba.⁷⁷ W tym przypadku za strukturę rozpoznającą ATP posłużyło naturalnie dostosowane do tego białko – RpMatB należące do rodziny syntetaz A. Detekcję umożliwiały dwa ugrupowania tetrametylorodaminowe, które po związaniu cząsteczki ATP przez białko zwiększały intensywność emisji fluorescencji około 3,7 raza. Przy tym tak zaprojektowany sensor był selektywny wobec ATP. Stała dysocjacji K_d dla ATP wynosiła $6,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$, dla ATPyS była już o rząd wielkości wyższa ($16,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$), natomiast dla dATP, ADP czy AppNHp stałe K_d były wyższe o dwa rzędy wielkości (odpowiednio 440 ± 53 , 428 ± 50 , $253 \pm 11 \mu\text{M}$).

5.3. Detekcja ATP wewnątrz komórek

Największym wyzwaniem jest wizualizacja ATP w żywych komórkach. Idealna metoda powinna dawać wyraźną odpowiedź, rozróżniać ATP od innych nukleotydów, być przy tym szybka i nieinwazyjna. Jedną z metod które zdają się spełniać te wymagania jest technika ^{31}P NMR, jednak długie czasy akwizycji, mogą nie w pełni odpowiadać tempu reakcji enzymatycznych w komórce.

Bardziej powszechne podejście zakłada zastosowanie sond fluorescencyjnych. Przekształcenia $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ można śledzić w sposób pośredni, badając stężenie wolnych jonów magnezu w środowisku komórkowym. ATP w komórce występuje jako kompleks z jonami magnezu, z kolei ADP ma znacząco niższe powinowactwo do jonów magnezu. Za pomocą małowcząsteczkowego fluorofora – Magnesium Green,⁷⁸ możliwa jest detekcja wolnych jonów magnezu, które pojawiły się w trakcie reakcji, co pośrednio odpowiada zmianom stężenia ATP w cytozolu. Metodę tę można wykorzystać również do badania wyizolowanych organelli komórkowych. Przykładowo w pracy Chinopoulos *et al.*⁷⁹ wykorzystano ją do pomiaru aktywności enzymu translokazy nukleotydów adeninowych w mitochondriach. Zastosowanie tego barwnika nie jest jednak wolne od wad. Przede wszystkim jest czuły jedynie na zwiększające się stężenie jonów magnezu, a nie na ATP jako takie. Po drugie, nie jest on całkiem selektywny i może dawać odpowiedź również w przypadku wykrycia jonów wapniowych. Mimo to ma on przewagę nad innymi fluoroforami wykrywającymi jony magnezowe, gdyż do wzbudzenia jego kompleksu z jonami magnezu używa się światła z zakresu widzialnego. Nie jest ono szkodliwe dla żywych komórek, w przeciwieństwie do światła UV, które jest wymagane do wzbudzenia innych, podobnie działających fluoroforów.

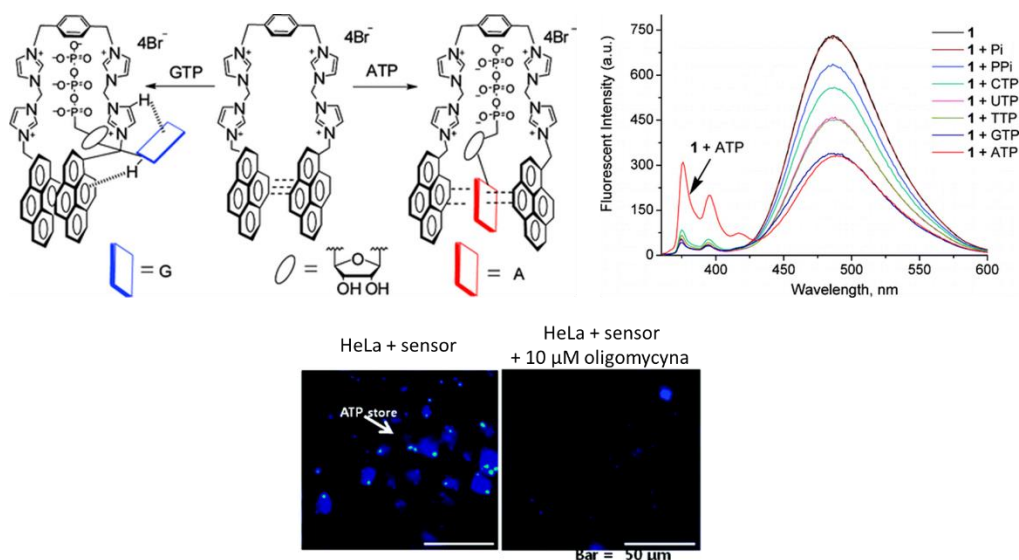
Małowcząsteczkowe sensory mogą być wykorzystane nie tylko do pośredniego oznaczania ATP, ale mogą także dawać odpowiedź w obecności samej cząsteczki ATP. Przykładem takiego związku jest kwinakryna,⁸⁰ (Rys. 13) która wykazuje silne powinowactwo do ATP, a przy tym jest barwnikiem fluorescencyjnym.



Rys. 13 Struktura kwinakryny – barwnika mającego powinowactwo do ATP.

Właściwość ta została wykorzystana w badaniu potwierdzającym, że hipoksja wpływa na uwalnianie ATP przez komórki żyły pępowinowej, co wpływa na rozszerzanie tętnic i wyższe zaopatrzenie płodu w tlen.⁸¹ (por. rozdz. 3.3) Podobną rolę w wykrywaniu ATP może spełniać inny sensor, opracowany przez Xu *et al.*⁸² Opiera on swoje działanie na oddziaływaniu dwóch ugrupowań pirenowych, które

tworzą dimer wykazujący fluorescencję ekscymerową (ekscymer, por. rozdz. 7.1). Połączone są one rusztowaniem zawierającym cztery reszty imidazolu, z których każda niesie dodatni ładunek. W obecności ATP sensor ten oddziałuje elektrostatycznie z ujemnie naładowanym ugrupowaniem trifosforanowym, a następnie zasada adeninowa tworzy kompleks kanapkowy z resztami pirenowymi, co doprowadza do zmniejszenia intensywności fluorescencji ekscymerowej. Budowa sensora maksymalizuje jego selektywność wobec ATP, co zostało wykazane w eksperymencie powinowactwa sensora do innych nukleotydów (Rys. 14).



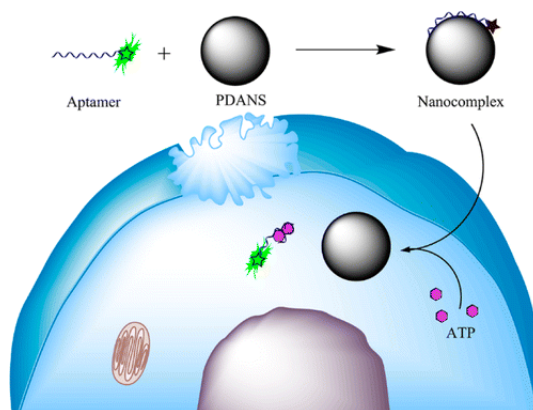
Rys. 14 Schemat działania sensora ekscymerowego. Na wykresie pokazano jak różnią się widma fluorescencji reszt pirenowych w zależności od obecności fosforanu, pirofosforanu, lub innych nukleotydów w otoczeniu. Tylko ATP daje wyraźne podwyższenie sygnału fluorescencji monomerowej (~379 oraz 397 nm) w porównaniu z innymi nukleotydami. Poniżej – eksperyment przeprowadzony na komórkach HeLa. Rysunki i zdjęcia zaczerpnięte z pracy Xu *et al.*⁸² Copyright (2009) American Chemical Society.

Sonda ta okazała się zdolna do penetracji błony komórkowej komórek HeLa i wiązania się z ATP obecnym w cytozolu. Kontrola przeprowadzona za pomocą komórek potraktowanych oligomycyną (związek zmniejszający stężenie wewnątrzkomórkowego ATP) wykazała, że odpowiedź w eksperymencie dawał wyłącznie sensor związany z wewnątrzkomórkowym ATP. (Rys. 14)

Innym typem sensora, który może działać w analogiczny sposób do zaprezentowanego powyżej jest fluorescencyjny sensor oparty o aptamer rozpoznający ATP. Pewnym ograniczeniem aptamerów jest nagromadzenie ładunków ujemnych (ujemnie naładowane reszty fosforanowe kwasu nukleinowego) i wynikające stąd trudności z pokonywaniem bariery błony komórkowej. Możliwym obejściem tego problemu jest zastosowanie przenośnika, który potrafi dostać się do wnętrza komórki, przenosząc jednocześnie aptamer. Przykład takiej procedury przedstawili Wang *et al.*⁷³ W pracy tej zaproponowano użycie aptameru z fluoroforem znajdującym się na jego końcu. W roli cząsteczki transportującej wystąpił tlenek grafenu, który jednocześnie pełnił rolę wygaszacza fluorescencji. W momencie przeniesienia całego adduktu do wnętrza komórki, aptamer łączył się z wewnątrzkomórkowym ATP, co

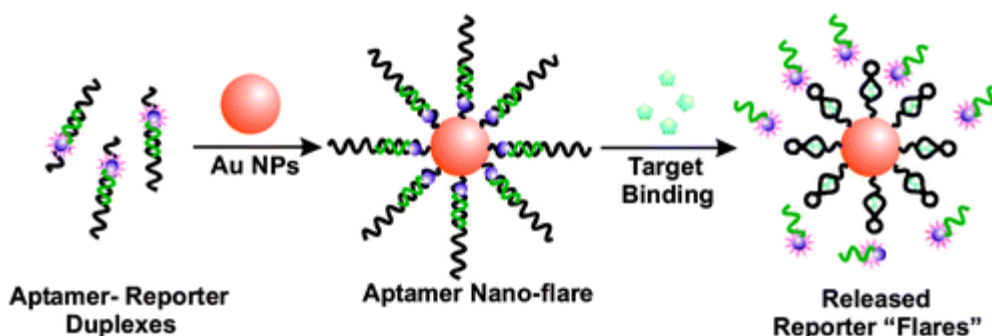
zmieniało jego konformację, odłączało go od tlenku grafenu, a to z kolei skutkowało przywróceniem fluorescencji fluorofora.

Innym przykładem nośnika aptamerów były nanocząstki. W tym przypadku, nanocząstki nie dość, że pełnią rolę transportera i wygaszacza fluorescencji, to jeszcze zabezpieczają aptamer przed działaniem wewnątrzkomórkowych nukleaz, które zdolne są go zdegradować. Podejście takie zastosowano w pracy Qiang *et al.*⁸³ Znakowany fluorescencyjnie aptamer został przyłączony do nanocząstek pokrytych polidopaminą przy pomocy względnie trwałych, ale niekowalencyjnych połączeń typu π - π *stacking* między zasadami azotowymi aptameru, a aromatycznymi grupami polidopaminy. Taki układ mógł zostać wprowadzony do komórki. W przypadku obecności ATP w środowisku, aptamer zmieniał swoją konformację, co powodowało odłączenie się go od nanocząstki i reaktywację fluorofora, który dawał sygnał analityczny. (Rys. 15)



Rys. 15 Poglądowy schemat działania nanocząstek polidopaminowych z przyłączonym znakowanym aptamerem rozpoznającym ATP. Rysunek zaczerpnięty z pracy Qiang *et al.*⁸³ Copyright (2015) American Chemical Society.

Innym przykładem zastosowania aptamerów w wykrywaniu wewnątrzkomórkowego ATP jest nanoflara. Projekt nanoflar wykrywających ATP został zastosowany w pracy Zheng *et al.*⁸⁴ W tym przypadku aptamery rozpoznające ATP, zawierające grupę tiolową na końcu 3', zostały zhybrydowane z krótszymi, komplementarnymi fragmentami kwasu nukleinowego, zawierającymi znacznik fluorescencyjny. Następnie powstały addukt został przytwierdzony do nanocząstki złota poprzez utworzenie wiązania Au-S. Powstały addukt nie wykazywał fluorescencji, ponieważ nanocząstki złota działają jako wygaszacze fluorescencji. Po wprowadzeniu nanoflary do wnętrza komórki, ATP obecne w cytozolu wiązało się do aptameru, który z kolei uwalniał krótszy fragment kwasu nukleinowego zakończony fluoroforem. Fluorofor oddalony od nanocząstki złota odzyskiwał fluorescencję, która mogła zostać zarejestrowana. (Rys. 16)



Rys. 16 Schemat działania nanoflar – przyłączone do nanocząstki złota duplekisy aptamer-flara nie wykazują fluorescencji. Dopiero związanie ATP przez aptamer powoduje uwolnienie flary i odzyskanie fluorescencji. Rysunek zaczerpnięty z pracy Zheng *et al.*⁸⁴ Copyright (2009) American Chemical Society.

5.4. Podsumowanie rozdziału

ATP jako jeden z centralnych metabolitów komórkowych pełni istotną rolę w utrzymaniu komórki w homeostazie. Z kolei dysfunkcje choćby jednego z licznych enzymów, które zużywają ATP mogą prowadzić do poważnych chorób. Z tego względu, metody detekcji ATP zarówno w środowisku pozakomórkowym, jak i wewnątrzkomórkowym są istotne jako narzędzia pomagające zrozumieć zjawiska i mechanizmy kierujące metabolizmem ATP. Przedstawione w tym rozdziale metody służyły wykryciu samego nukleotydu, nie zaś bezpośredniemu monitorowaniu enzymów hydrolizujących ATP. W tym drugim celu zostały opracowane bardziej selektywne metody, bardzo często zakładające użycie syntetycznie wyznakowanych analogów ATP, które imitując naturalny nukleotyd, mogą dostarczyć informacji o działaniu enzymu. Takim metodom zostanie poświęcony kolejny rozdział.

6. Analogi ATP – sondy do monitorowania aktywności ATPaz

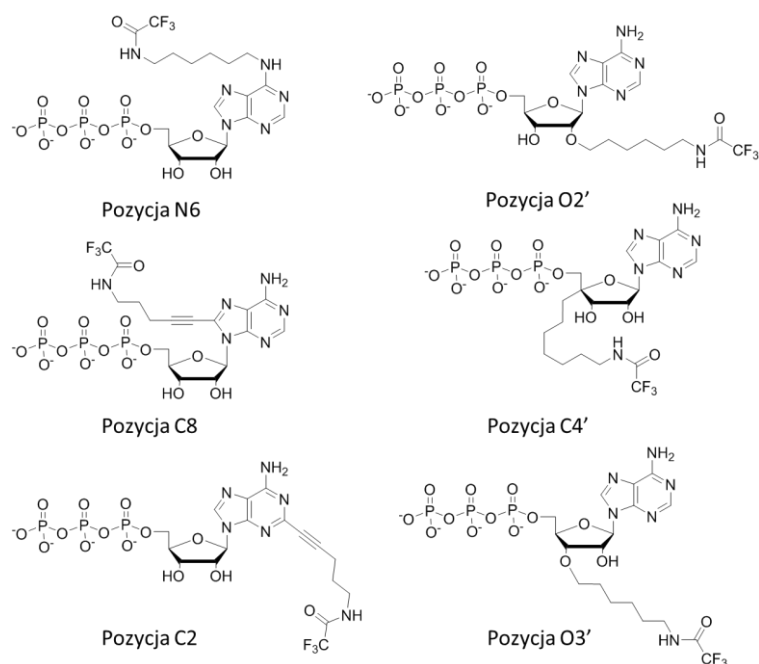
6.1. Wstęp – znaczenie pozycji znakowania ATP w kontekście oddziaływań z ATPazami

Analogi ATP będące sondami molekularnymi mają strukturę maksymalnie zbliżoną do ATP, co pozwala im oddziaływać z enzymami degradującymi ATP. Z reguły w trakcie reakcji enzymatycznej analog ATP jest degradowany, a wykazywana przez niego wybrana cecha fizyczna (najczęściej jest to fluorescencja) zmienia się w sposób mierzalny, co umożliwi monitorowanie reakcji enzymatycznej w czasie rzeczywistym.

Żeby jednak analogi ATP mogły pełnić funkcję sond fluorescencyjnych, do cząsteczki ATP należy przyłączyć znacznik fluorescencyjny. Należy to zrobić w taki sposób, aby jak najmniej wpływał on na wiązanie z ATPazą. Źle wybrane miejsce

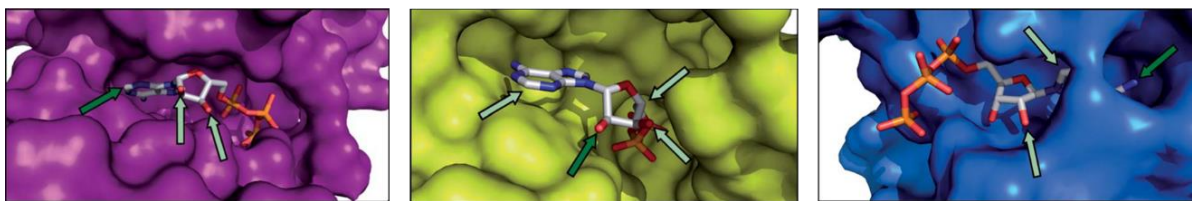
modyfikacji może sprawić, że enzym w ogóle nie będzie rozpoznawał analogu jako substratu, a tym samym eksperyment będzie niemożliwy do przeprowadzenia.

Wpływ miejsca podstawienia nukleotydu na zdolność jego rozpoznawania przez enzym został ukazany w pracy Hacker *et al.*⁸⁵ Badacze otrzymali sześć różnych analogów ATP zmodyfikowanych przez wprowadzenie alkilowego linkera w różnych pozycjach rybozy oraz zasady azotowej. Zmodyfikowane pozycje zostały ukazane na Rys. 17.



Rys. 17 Analogi ATP zastosowane w badaniu tolerancji enzymów wobec różnych pozycji modyfikacji ATP. Za Hacker *et al.*⁸⁵

Badacze sprawdzili czy otrzymane sześć analogów ATP może pełnić funkcję substratów dla trzech ATPaz – kinazy FAK, kinezy E5 oraz białka UBA1. Każde z tych białek do swojej funkcji – odpowiednio fosforylacji białka, poruszania się po mikrotubuli oraz ubikwitynacji – potrzebuje cząsteczki ATP. Wyniki badań biochemicznych wykazały, że kinaza akceptuje tylko analogi zmodyfikowane w pozycji 2'-O, 3'-O oraz C2, kinezy E5 – akceptuje tylko analogi modyfikowane w pozycji 2'-O, 3'-O, 4'C oraz C2, natomiast białko UBA1 – akceptuje analogi modyfikowane w pozycji 2'-O, N6 oraz C8. Autorzy przeprowadzili dodatkowo komputerowe symulacje dokowania ATP do kieszeni wiążących wymienionych białek, co wyjaśniło w jaki sposób preferencje substratowe wynikają z budowy kieszeni wiążącej i sposobu dołączenia cząsteczki ATP. Wyniki tych symulacji zostały przedstawione poniżej (Rys. 18).



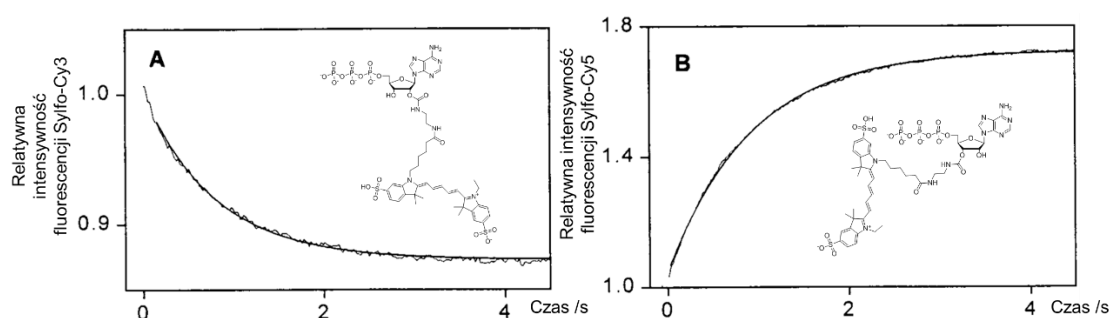
Rys. 18 Sposób wiązania cząsteczki ATP do trzech różnych białek – fioletowy: kinaza FAK, zielony: kinezyzna Eg5, niebieski – białko UBA1. Jasnozielone strzałki – miejsca modyfikacji akceptowane przez enzymy, ciemnozielone strzałki – miejsce modyfikacji akceptowane najlepiej. W przypadku kinezyzny Eg5 ukazano model wiązania z cząsteczką ADP, nie ATP, nie ma to jednak wpływu na preferencje względem miejsca modyfikacji w obrębie adenozyyny. Ilustracje zaczerpnięte z pracy Hacker *et al.*⁸⁵

6.2. Analogi ATP znakowane w obrębie reszty rybozy

Jednym z najwcześniej zastosowanych analogów ATP znakowanych fluorescencyjnie był analog zawierający fluorofory mantranilowy lub antranilowy.⁸⁶ Fluorofory te są względnie niewielkie, co minimalizuje wpływ na wiązanie analogu ATP do białka, mają wysoką wydajność fluorescencji, która dodatkowo wzrasta po związaniu z białkiem zmodyfikowanego nimi substratu. Znajdują one zastosowania do tej pory, np. w pracy Szulc *et al.*⁸⁷ W pracy tej zbadano jak dendrymery – makromolekuły stosowane w przenoszeniu leków⁸⁸ oddziałują z nukleotydami, które z kolei mogą pełnić rolę leków po dostarczeniu ich do komórki wymagającej terapii. Analog mant-ATP (2'-/3'-O-(N-metyloantranilowy)-ATP) był użyty jako cząsteczka modelowa, symulująca wiązanie z ATP. Dzięki takiemu podejściu stosując miareczkowanie fluorymetryczne badacze byli w stanie ustalić stałą wiązania dendrymeru z nukleotydem, a ponadto ile cząsteczek ATP przypada na jedną makromolekulę dendrymerową. Innym przykładem zastosowania mant-ATP w badaniach, jest praca Ho *et al.*⁸⁹ Analogi ATP zostały tam wykorzystane do badań uwalniania ATP przez neurony dopaminergiczne. Fluorofor ten ma jednak wady. Jego długość fali wzbudzenia mieści się w zakresie UV (355 nm), co może być szkodliwe dla żywych komórek. Ponadto fluorofor mantranilowy przyłączony jest do nukleotydu wiązaniem estrowym, które już w pH = 7 może migrować z atomu tlenu 2' na atom tlenu 3' i odwrotnie, co może wpływać na wiązanie z niektórymi enzymami.⁸⁵

Jednym z rozwiązań wskazanych wyżej problemów jest zastosowanie innego znacznika fluorescencyjnego. W pracy Oiwa *et al.*⁹⁰ zastosowano analogi ATP znakowane sulfocyjaniną 5 oraz sulfocyjaniną 3 w badaniu procesu skurczu mięśni. Fluorofory były przyłączone do pozycji 2'-O/3'-O rybozy za pomocą wiązania karbaminianowego. Ma ono tę przewagę nad estrowym, że izomeryzacja 2' ↔ 3' przebiega wolniej, jednocześnie wiązanie to jest mniej podatne na hydrolizę. W pracy Oiwa udowodniono, że 2'-O/3'-O podstawiony ATP jest substratem w fosforylacji miozyny, jednak jego stała wiązania jest mniejsza, niż w przypadku naturalnego ATP. Wolniejsza izomeryzacja wiązania karbaminianowego nie pozostaje bez znaczenia – co prawda obydwa izomery mają podobną stałą wiązania do fragmentu 1 miozyny, jednak w reakcji odszczepienia reszty fosforanu izomer podstawiony w pozycji 2'-O jest wykorzystywany przez enzym niemal czterokrotnie szybciej. Oprócz kwestii

wpływu izomeryzacji na stałą wiązania z badanym enzymem, należy rozważyć także wpływ zastosowanego izomeru na fluorescencję przyłączonego znacznika. W pracy Oiwa widać to szczególnie mocno na przykładzie ATP znakowanego sulfocyjaniną 3. Okazuje się, że izomer podstawiony w pozycji 2'-O w miarę wiązania z miozyną obniża intensywność swojej fluorescencji, natomiast izomer podstawiony w pozycji 3'-O – podwyższa. (Rys. 19) Ponadto autorzy wskazują, że nawet bazowa intensywność fluorescencji związku 3'-O podstawionego w roztworze wynosi 89% intensywności analogu 2'-O podstawionego, z czego płynie wniosek, że chociaż możliwe jest użycie w badaniach mieszaniny związków 2'/3'-O podstawionych, to bardziej jednoznaczne wyniki dałoby zastosowanie pojedynczych izomerów.

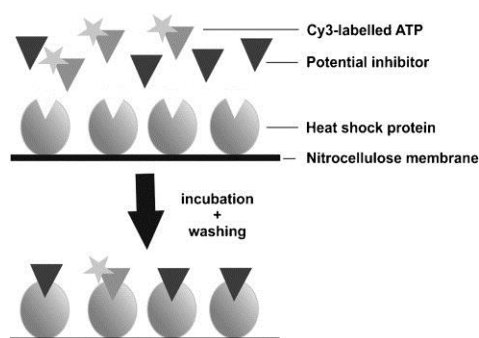


Rys. 19 Różnica zmian intensywności fluorescencji analogu ATP-SulfCy3. W przypadku analogu ATP podstawionego w pozycji 2'-O widać spadek fluorescencji w miarę wiązania z fragmentem miozyny, natomiast analog ATP podstawiony w pozycji 3'-O zwiększa swoją fluorescencję. Wykresy zaczerpnięte z pracy Oiwa *et al.*⁹⁰

6.3. Analogi ATP znakowane w obrębie zasady azotowej

Jedną z metod uniknięcia problemów wynikających z izomeryzacji jest wybranie innej pozycji znakowania cząsteczki ATP. W obrębie reszty adeniny jest to możliwe w pozycji N6, C8, C2 lub poprzez modyfikację budowy pierścienia aromatycznego. W pracy Schax *et al.*⁹¹ autorzy wykorzystali analog ATP znakowany sulfocyjaniną 3 w pozycji N6 adeniny do poszukiwania inhibitorów białka szoku cieplnego Hsp90. W tym celu zbudowali oni specjalny układ z nitrocelulozy, na którym przyłączone było oczyszczone badane białko. Po inkubacji z mieszaniną fluorescencyjnego analogu ATP oraz odpowiedniego inhibitora, układ był przemywany. (Rys. 20) Porównując względne intensywności fluorescencji, autorzy byli w stanie stwierdzić powinowactwo testowanych inhibitorów do badanego białka. Zastosowanie mikroukładu okazało się korzystne, ze względu na minimalizację zużycia odczynników, w tym potencjalnych inhibitorów, a przy tym zapewniło wysoką czułość metody, pozwalającą wyliczyć wartości IC_{50} inhibitorów już powyżej wartości 0,5 nM.

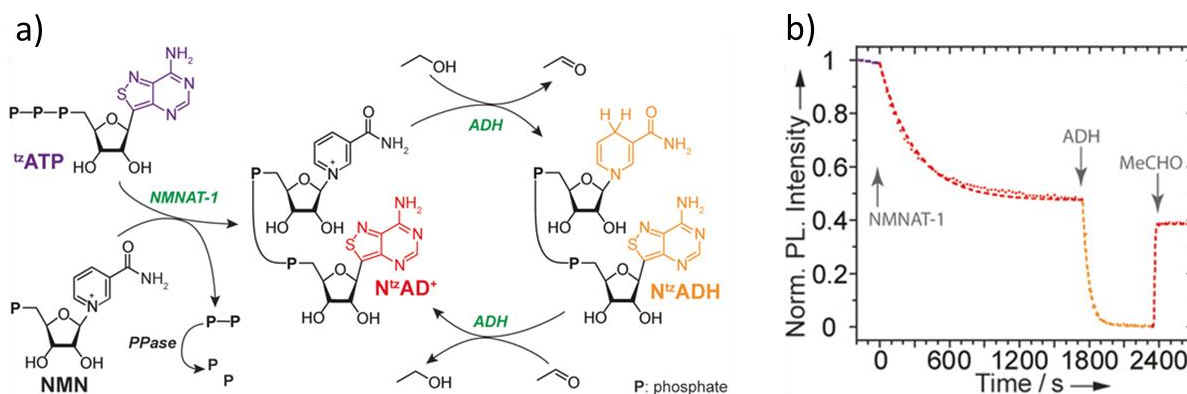
Przedstawiona metoda obliczania IC_{50} inhibitorów białka jest interesująca, ale już w samej pracy autorzy wykazują, że ATP naturalny ma wyższe powinowactwo do Hsp90 w stosunku do znakowanego analogu. Nawet najlepiej dobrane miejsce modyfikacji może wpływać na wiązanie substratu z enzymem, co skutkuje obniżeniem powinowactwa.



Rys. 20 Schemat kompetycyjnego poszukiwania inhibitorów Hsp90. Białko, będąc inkubowane mieszaniną potencjalnego inhibitora oraz sondy ATP, wiąże te związki proporcjonalnie do ich powinowactwa. Następnie odczyt fluorescencji pozwala na oszacowanie wartości IC_{50} danego inhibitora. Rysunek zaczerpnięty z publikacji Schax *et al.*⁹¹
Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914830647359).

Ciekawą próbą ominięcia tego problemu jest wkomponowanie fluorofora w zasadę azotową tak, by struktura nukleotydu praktycznie nie została zmieniona, zachowując przy tym jego zdolności do tworzenia wiązań wodorowych. Podejście takie zostało zaprezentowane w pracy Halle *et al.*⁹² Badacze otrzymali analog ATP zawierający zmodyfikowaną resztą izotiazolową w obrębie pięciocząłowego pierścienia adeniny (t ATP). (Rys. 21) Wykazywał on emisję fluorescencji przy 410 nm, przy wzbudzeniu falą o długości 330 nm. Analog t ATP został wykorzystany jako sonda fluorescencyjna w reakcji syntezy, a następnie redukcji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD^+). Autorzy eksperymentu sprawdzili, czy są w stanie monitorować poszczególne etapy reakcji wyłącznie za pomocą zmieniającej się intensywności widma fluorescencji analogu.

t ATP został poddany reakcji enzymatycznej nikotynoamidową adenylotransferazą 1 (NMNAT-1) w obecności mononukleotydu nikotynoamidowego (Rys. 21). Doprowadziło to do utworzenia analogu NAD^+ , a przy tym do znacznego spadku emisji fluorescencji (co wskazuje na zdolność zasady nikotynoamidowej do wygaszania fluorescencji). Po zakończeniu reakcji enzymatycznej adenylacji, co stwierdzono poprzez brak dalszych zmian fluorescencji, do układu został dodany etanol oraz dehydrogenaza alkoholowa. Spowodowało to całkowite wygaszenie fluorescencji t ATP. Dodanie aldehydu octowego przesunęło równowagę reakcji w stronę NAD^+ i pozwoliło na częściową regenerację fluorescencji t ATP (~80% stanu sprzed reakcji redox).



Rys. 21 a) schemat eksperymentu enzymatycznej syntezy NAD⁺, a następnie wykorzystanie go w procesie redukcji etanolu katalizowanej dehydrogenazą alkoholową. b) zmiana fluorescencji w czasie eksperymentu. Zaczerpnięto z pracy Halle *et al.*⁹²
Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914830773997).

6.4. Analogi ATP modyfikowane w obrębie łańcucha oligofosforanowego

Modyfikacje w obrębie łańcucha oligofosforanowego w gruncie rzeczy sprowadzają się do ostatniej reszty fosforanowej w łańcuchu – w przypadku ATP jest to grupa fosforanowa γ . Najczęściej wstępującym rodzajem modyfikacji jest modyfikacja fosfo(tio)estrowa lub modyfikacja amidofosforanowa. Jedną z najstarszych, a przy tym najmniej zmieniających strukturę ATP metod wyznakowania reszty γ -fosforanu jest zastąpienie jej resztą tiofosforanu,⁹³ bądź izotopowo znakowaną resztą fosforanową z atomem fosforu ³²P.⁹⁴ Są to jednak modyfikacje, które zlokalizować można jedynie używając odpowiednich metod – spektrometrii mas, NMR lub technik izotopowych. Dużo wygodniejsze i bardziej czułe są metody wykorzystujące fluorescencję. Podobnie jak w przypadku innych pozycji znakowania ATP, wymaga to wprowadzenia linkera i relatywnie dużej cząsteczki fluoroforu, co może wpływać na wiązanie z białkiem. W pracy Lee *et al.*⁹⁵ pochyłono się nad pierwszym problemem, czyli wprowadzeniem reszty fosforanowej z linkerem w γ pozycji łańcucha fosforanowego i akceptacją takiej modyfikacji przez kinazy. Do eksperymentu zostały wybrane analogi ATP z linkerami zawierającymi reaktywne grupy funkcyjne, które mogą być po reakcji enzymatycznej wykorzystane do znakowania fluorescencyjnego – amidofosforan oraz fosfoester z różnej długości łańcuchami węglowymi zakończonymi funkcją alkinową (reaktywny w reakcji CuAAC), lub azydkową (reaktywny w reakcji CuAAC, reakcji Staudingera), czy amidofosforan z łańcuchem węglowym zakończonym funkcją alkenową (reaktywny w reakcji Michaela). Wszystkie analogi ATP zostały użyte w eksperymencie z kinazą Cdk2, w roli substratu wykorzystano białko p27^{Kip1}. Białko to pełni istotną funkcję w cyklu życiowym komórki – usytuowane w jądrze komórkowym jest inhibitorem wzrostu i podziału komórki. Gdy ufosforylowane, zostaje rozpoznane przez CRM1 (przenośnik przez błonę komórkową jądra) i usunięte z przestrzeni jądra komórkowego, co uniemożliwia dalszą inhibicję wzrostu komórkowego.⁹⁶ Wykonując elektroforezę SDS-PAGE udowodniono, że wszystkie z analogów ATP są akceptowane przez kinazę

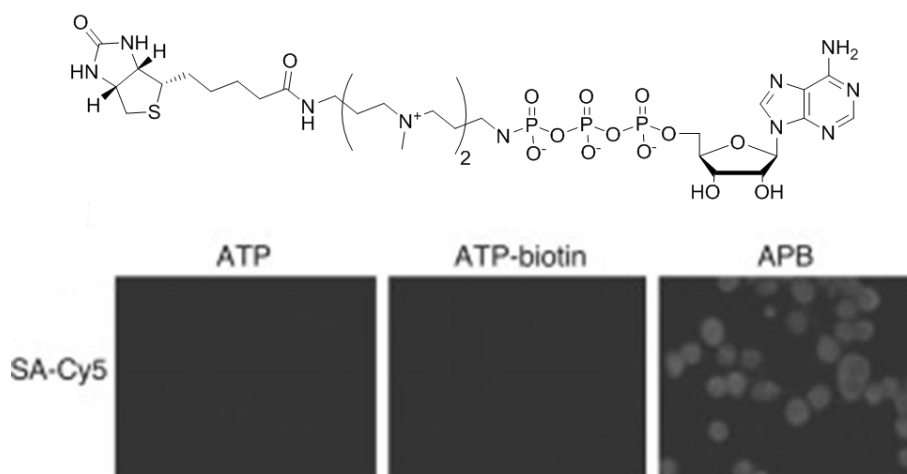
Cdk2, co skutkuje wprowadzeniem modyfikowanej reszty fosforanowej do docelowego białka.

Ufosforylowanie białka modyfikowaną resztą fosforanową niesie ze sobą możliwość późniejszego wprowadzenia znacznika i wyznakowania białka, na przykład fluorescencyjnie. Jednak wprowadza to dodatkowy krok w syntezie i wymusza stosowanie warunków chemicznej ligacji z układami, które nie zawsze są w stanie przetrwać w tych warunkach (przykładowo obecność jonów miedzi niezbędnych w reakcji CuAAC może doprowadzić do denaturacji białka⁹⁷). Lepszym rozwiązaniem jest wprowadzenie w procesie fosforylacji enzymatycznej fluorescencyjnie znakowanego fosforanu. Aby to jednak było możliwe należy wybrać kinazę, która zaakceptuje tak zmodyfikowany analog ATP i wydajnie przeniesie znakowaną resztę fosforanową na docelowe białko. Badania trzech kinaz (Abl, PKA, CK2) przeprowadzone Pflum *et al*⁹⁸ wykazały, że są one w stanie w dość szerokim zakresie zaakceptować analogi ATP znakowane resztą dansylu w pozycji γ łańcucha fosforanowego. W toku eksperymentu inkubowano razem analog ATP, odpowiednią kinazę oraz peptydowy substrat. Po hydrolizie i wykonaniu analizy mas w układzie MALDI-TOF okazało się, że wydajność wprowadzania znakowanej reszty fosforanu wynosi 81–91% w stosunku do naturalnego ATP. W następnym kroku to samo doświadczenie powtórzono, tym razem na pełnowymiarowym białku – β -kazeinie. W przypadku kinazy CK2 wydajność fosforylacji z udziałem ATP-dansyl wyniosła 54% w stosunku do naturalnego substratu. Udowodniwszy, że analogi ATP są substratami w reakcji fosforylacji pełnych białek, autorzy zdecydowali się na opracowanie układu do poszukiwania inhibitorów kinaz. W tym celu zmodyfikowano peptyd-substrat kinazy Abl przyłączając fluorofor – rodaminę (ROX) do N-końca peptydu. Wg założeń eksperymentu po skutecznej fosforylacji reszta dansylowa powinna być przyłączona do peptydu i wykazywać efekt FRET z rodaminą (por. 8.1), które można stwierdzić za pomocą metod spektroskopowych. (Rys. 22) W procedurze poszukiwań inhibitora kinaza była preinkubowana z wybranymi związkami, które są znane ze swoich właściwości inhibujących kinazy. Następnie do mieszaniny dodawano znakowany peptyd i ATP-dansyl. Stwierdzono, że pod nieobecność inhibitora emisja fluorescencji typowa dla rodaminy (595 nm) wzrasta o 30% przy naświetlaniu układu światłem charakterystycznym dla absorpcji barwnika dansylowego (360 nm) w stosunku do stanu przed reakcją. W przypadku zastosowania inhibitorów kinaz wzrost fluorescencji nie następował.



Rys. 22 Idea działania układu do poszukiwania inhibitorów kinaz. Po fosforylacji substratu resztą fosforanową wyznakowaną dansylem, zachodzi oddziaływanie między barwnikami, co można śledzić metodami spektroskopowymi. Rysunek na podstawie pracy Green *et al.*⁹⁸

Ze względu na bardzo wysoką polarność nukleotydów, a zwłaszcza trifosforanów nukleozydów (por. rozdział 2.4) wykorzystanie tego typu analogów nukleotydów w układach komórkowych jest ograniczone. Mimo to próba taka została podjęta w pracy Fouda *et al.*⁹⁹ W eksperymencie reszta biotyny została przyłączona do grupy γ -fosforanowej za pomocą linkera poliaminowego (APB, *ATP-polyamine-biotin*). Podobnie jak w przypadku linkera polietylenoglikolowego (PEG, *polyethylene glycol*) jest to linker polarny, a więc rozpuszczalny w wodzie, ale przy tym znany ze swoich zdolności do transportowania dokomórkowego polianionowych układów – takich jak DNA.¹⁰⁰ W pierwszym podejściu autorzy przeprowadzili eksperyment w warunkach *in vitro* w celu stwierdzenia, czy linker poliaminowy jest akceptowany przez kinazę PKA na równi z linkerem PEG. Po przeprowadzeniu elektroforezy SDS-PAGE ufosforylowane białko zwizualizowano z użyciem adduktu streptawidyna-cyjanina 5. Dodatkowo scharakteryzowano je i potwierdzono fakt fosforylacji za pomocą spektrometrii mas (MALDI-TOF). W ilościowym eksperymencie autorzy stwierdzili, że wydajność fosforylacji z użyciem APB wynosi $55 \pm 6\%$ w stosunku do ATP. Potwierdziwszy ten fakt autorzy przeprowadzili badania z lizatami komórek z linii HeLa. Podobnie jak w przypadku eksperymentu *in vitro* potwierdzone zostało, że APB jest substratem również dla kinaz pochodzących z komórek HeLa. W ostatnim etapie badań zostały zatem użyte żywe komórki HeLa. Po inkubacji komórek z analogiem APB, odmyciu, utrwaleniu i wizualizacji za pomocą adduktu streptawidyna-cyjanina 5 badacze byli w stanie zaobserwować fluorescencję cyjaniny 5 wewnątrz komórek. Fluorescencja nie była widoczna w przypadku kontroli inkubowanej z naturalnym ATP, bądź adduktem ATP-biotyna z linkerem PEG. Analogicznie przeprowadzony eksperyment poprzedzony inkubacją ze staurosporyną (inhibitor kinaz o szerokim działaniu) dowiódł, że obserwowana fosforylacja jest wyłącznie wynikiem działania kinaz.



Rys. 23 Struktura analogu ATP znakowanego biotyną z linkerem poliaminowym oraz obraz mikroskopowy komórek HeLa po inkubacji z ATP oraz ich analogami biotynowymi (zawierającymi linkery PEG oraz poliaminowy odpowiednio) i wizualizacji ich za pomocą adduktu streptawidyna-Cy5.

Rysunek zaczerpnięty z pracy Fouda *et al.*⁹⁹

Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914830920668).

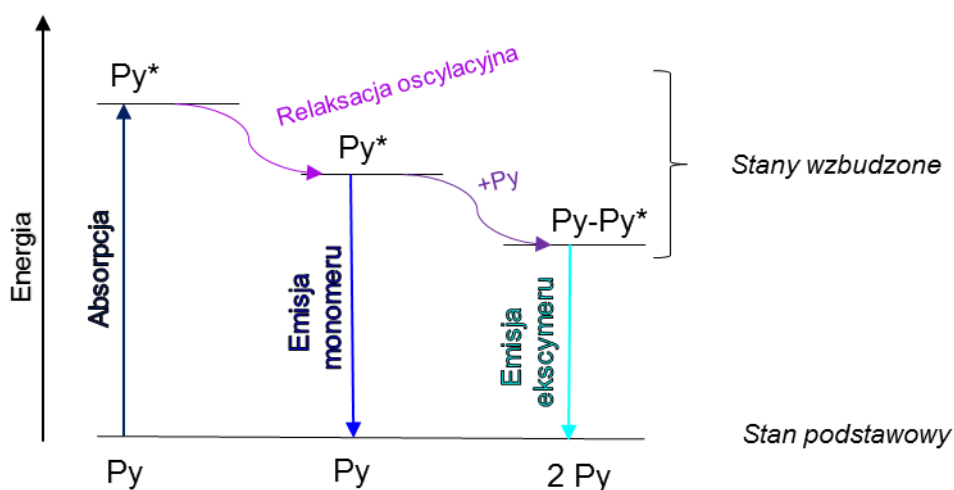
6.5. Podsumowanie rozdziału

Cząsteczka ATP zawiera wiele pozycji, w których możliwe jest wprowadzenie modyfikacji umożliwiającej jej śledzenie. W zależności od wykorzystania pozycji w obrębie rybozy, adeniny bądź też łańcucha oligofosforanowego można tak dostosować analog ATP, by był akceptowany przez wybraną ATPazę i umożliwił monitorowanie jej aktywności. Pojedynczy znacznik fluorescencyjny jest relatywnie niewielką ingerencją w strukturę ATP i często nie przeszkadza w rozpoznawaniu przez enzym, czego dowodzą przykłady przedstawione w tym rozdziale. Wadą takiego podejścia jest konieczność zastosowania bardziej skomplikowanych układów pomiarowych, aby w ogóle zaobserwować jakąkolwiek zmianę sygnału. Wiąże się to najczęściej z wprowadzeniem kolejnego związku, który oddziałując z fluoroforem pozwoli na odczyt odpowiedzi. W następnych rozdziałach opisane zostaną dwa szczególne zjawiska fluorescencyjne – fluorescencja ekscymerowa i zjawisko FRET. Żeby mogły zaistnieć, konieczne jest wykorzystanie dwóch oddziałujących ze sobą fluoroforów w cząsteczce, jednak dzięki temu wizualizacja może odbywać się bezpośrednio, przez detekcję widm fluorescencyjnych i nie wymaga dodatkowych zabiegów w celu uzyskania odpowiedzi układu. Z uwagi na bardzo ograniczoną liczbę przykładów wykorzystania tych zjawisk w badaniu oddziaływań ATP, opis literatury zostanie rozszerzony także na układy, w których wykorzystano kwasy nukleinowe.

7. Fluorescencja ekscymerowa w badaniach oddziaływań kwasów nukleinowych

7.1. Fluorescencja ekscymerowa – wstęp

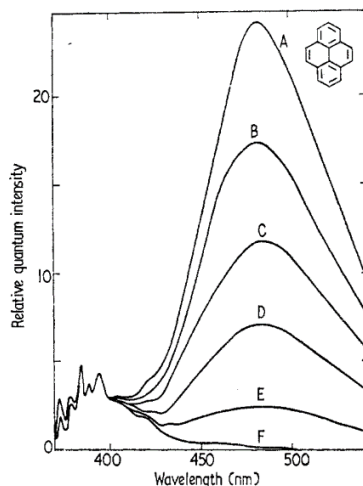
Fluorescencja niektórych fluoroforów może zmieniać się w zależności od różnych czynników. Jednym z takich czynników jest stężenie. Niektóre związki w wysokich stężeniach po wzbudzeniu mogą utworzyć dimer z cząsteczką tego samego związku w stanie podstawowym, co obniża energię układu. W ten sposób tworzony jest wzbudzony dimer – ekscymer (*excited dimer*).^{101, 102} Ekscymery z definicji istnieć mogą wyłącznie w stanie wzbudzonym. Po wyemitowaniu kwantu promieniowania (który ma niższą energię w stosunku do kwantu wyemitowanego przez monomer) dimer rozkłada się natychmiast na dwa monomery w stanie podstawowym. (Rys. 24)



Rys. 24 Uproszczony diagram Jabłońskiego dla wzbudzonej cząsteczki pirenu. Asocjacja wzbudzonej cząsteczki pirenu z kolejną cząsteczką w stanie podstawowym skutkuje utworzeniem wzbudzonego dimeru, którego energia jest niższa w stosunku do pojedynczo wzbudzonej cząsteczki. Na podstawie pracy Wang *et al.*¹⁰³

Zdolność do tworzenia ekscymerów przez cząsteczkę zależy w dużej mierze od czasu życia stanu wzbudzonego. Im jest on dłuższy, tym większa jest szansa, że wzbudzony monomer napotka inny monomer w stanie podstawowym i utworzy z nim ekscymer. Przykładowo czas życia stanu wzbudzonego cząsteczki pirenu – najszerzej opisanego fluorofora tworzącego ekscymery – waha się od 290 do 340 ns, w zależności od rozpuszczalnika. Z kolei perylen, wykazuje czas życia fluorescencji około 5,8 ns.¹⁰⁴ Znajduje to odzwierciedlenie w ich zdolności do tworzenia ekscymerów. W przypadku perylenu ekscymery te można wykryć jedynie w szczególnych przypadkach w formie ciała stałego – kryształów lub przy osadzaniu na matrycach.¹⁰⁵ Z kolei piren tworzy ekscymery z szerokim i silnym pasmem emisji już w roztworach. Węglowodór ten absorbuje promieniowanie o długości fali ok. 340 nm, zaś emituje promieniowanie o długości fali ok. 380 nm i 400 nm. W sytuacji zatężenia

roztworu pirenu i naświetlenia go promieniowaniem o długości fali 340 nm, pasma emisji wymienione powyżej zanikają niemal całkowicie (tym bardziej, im mocniej zatężony jest roztwór, zatem im bardziej cząsteczki pirenu zbliżone są do siebie) na rzecz nowego, bardzo szerokiego pasma emisji występującego przy długości fali około 490 nm. (Rys. 25)



Rys. 25 Widmo emisji fluorescencji pirenu w zależności od jego stężenia w cykloheksanie. Widma emisji zostały znormalizowane do pasma emisji fluorescencji monomerowej. Kolejne widma rejestrowane były w stężeniach:

A – 10^{-2} M, **B** – $7,75 \times 10^{-3}$ M, **C** – $5,5 \times 10^{-3}$ M, **D** – $3,25 \times 10^{-3}$ M, **E** – 10^{-3} M, **F** – 10^{-4} M.

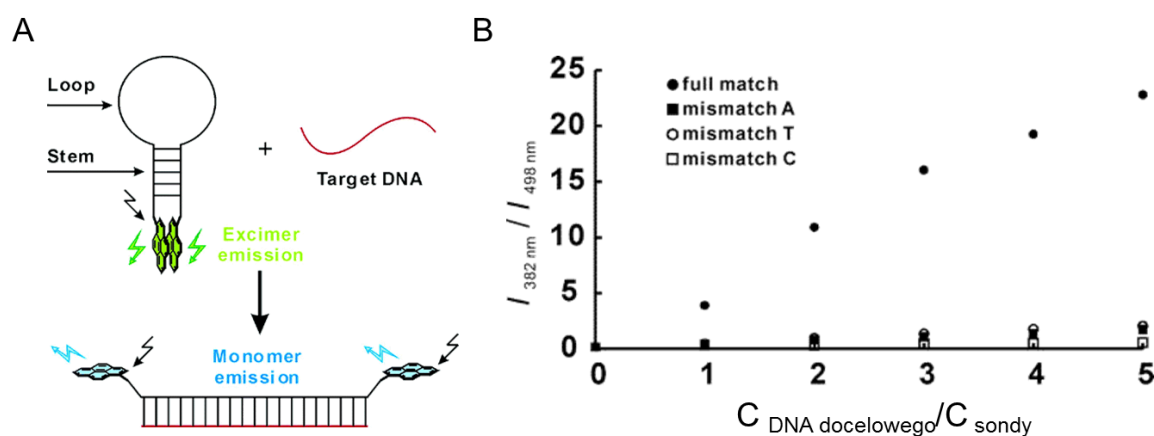
Wykres zaczerpnięty z pracy Birska.¹⁰¹

Efekt ekscymerowy występuje także w mikroskali, w sytuacji gdy dwie cząsteczki pirenu znajdują się w przybliżeniu w odległości ok. 1 nm.¹⁰⁶ Fakt ten sprawia, że piren bardzo często jest wykorzystywany w sondach molekularnych służących do badania odległości między cząsteczkami biologicznymi. Pierwszy przykład został już zaprezentowany w przypadku syntezy sensora rozpoznającego cząsteczkę ATP (por. rozdział 5.3). W następnym rozdziale omówione zostaną szerzej przykłady wykorzystania pirenu w roli sensora odległości w badaniu oddziaływań cząsteczek biologicznych, a zwłaszcza kwasów nukleinowych. Rozdział nie będzie traktował o analogach ATP wykazujących fluorescencję ekscymerową z uwagi na to, że literatura na ten temat jest bardzo ograniczona. Omawiana tematyka zostanie rozszerzona o przykłady zastosowanie fluorescencji ekscymerowej w badaniach kwasów nukleinowych.

7.2. Fluorescencja ekscymerowa w badaniu kwasów nukleinowych

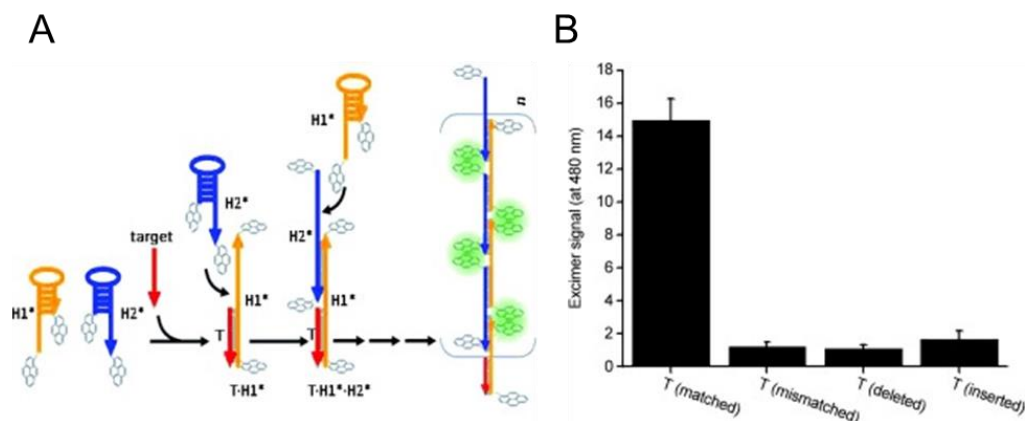
Piren jest fluoroforem najczęściej wykorzystywanym w kontekście sond ekscymerowych. Jak przedstawiono w poprzednim rozdziale, tworzy on ekscymery, które dają bardzo wyraźny sygnał, przesunięty batochromowo w stosunku do emisji monomerów. W kontekście kwasów nukleinowych można wyróżnić dwa sposoby wprowadzania pirenu do cząsteczek – jest on umieszczony na końcach cząsteczki, albo pomiędzy nukleotydami. W pierwszym przypadku są to zwykle sondy

ukierunkowane na konkretną sekwencję nukleotydową – przyłączenie sondy do sekwencji docelowej, zmienia konformację kwasu nukleinowego, a cząsteczki pirenu oddalają się od siebie, co powoduje zmianę fluorescencji. Przykład takiej sondy zaprezentowano w pracy Fujimoto *et al.*¹⁰⁷ Badacze zsyntetyzowali cząsteczkę DNA, do której obu końców przyłączyli cząsteczki pirenu. W tym celu otrzymali aktywne formy pirenu – amidofosforyn 3-pirenopropanolu (przyłączenie do końca 5' DNA) oraz aktywny ester kwasu 3-pirenopropionowego (przyłączenie do końca 3' DNA, por. rozdz. 10.4). Sekwencja DNA została dobrana tak, by rejony bliższe końcom kwasu nukleinowego były komplementarne, natomiast pośrodku cząsteczki występowała sekwencja komplementarna do docelowego DNA. W sytuacji braku docelowego DNA w otoczeniu sekwencje skrajne parują ze sobą, co powoduje utworzenie struktury typu spinki do włosów (*hairpin*) i zbliżenie cząsteczek pirenu do siebie. Skutkuje to powstaniem emisji ekscymerowej (Rys. 26 A). W założeniu, po związaniu docelowej cząsteczki DNA, sonda powinna ulec rozpleceniu w obszarze krańcowym, co oddala cząsteczki pirenu i generuje wyłącznie fluorescencję monomerową. W pierwszym podejściu badacze zweryfikowali, czy denaturacja sondy powoduje zmianę jej fluorescencji. Dokonano tego podgrzewając stopniowo próbkę z sondą i mierząc widma fluorescencji. Zgodnie z oczekiwaniami podwyższanie temperatury spowodowało stopniowy zanik fluorescencji ekscymerowej na rzecz monomerowej. W kolejnym badaniu przeprowadzono eksperyment, w którym miareczkowano sondę fragmentem docelowego DNA. Zgodnie z oczekiwaniami zwiększające się stężenie DNA docelowego spowodowało wzrost fluorescencji monomerowej kosztem fluorescencji ekscymerowej. Wynik ten był istotny, gdyż faktycznie pokazał, że sonda spełnia swoje zadanie w wykrywaniu komplementarnego DNA. Ostatni eksperyment miał wykazać, czy sonda daje odpowiedź wobec częściowo komplementarnego DNA. W tym celu badacze przeprowadzili analogiczne eksperymenty z DNA o sekwencji komplementarnej, z pojedynczo zmienionymi nukleotydami w środku sekwencji (guanina została zastąpiona adeniną, tyminą, lub cytozyną). Eksperyment wykazał, że sonda jest w stanie rozróżnić DNA o nawet tak drobnych różnicach w sekwencji. (Rys. 26 B)



Rys. 26 A) idea działania sondy DNA wykrywającej cząsteczki DNA o określonej sekwencji
 B) Stosunek fluorescencji monomerowej do fluorescencji ekscymerowej w zależności od zastosowanego nadmiaru DNA docelowego oraz trzech jego analogów z pojedynczymi zmianami

Inny przykład układu do wykrywania minimalnych ilości DNA w roztworze za pomocą łańcuchowej reakcji hybrydyzacji (HCR, *hybridization chain reaction*) został opracowany przez Huanga.¹⁰⁸ W układzie tym rolę sondy pełnią dwa rodzaje fragmentów DNA tworzące strukturę typu *hairpin*¹⁰⁹ z lepkimi końcami (sonda 1 i sonda 2). Sonda 1 ma fragment 5'-końcowy komplementarny do sekwencji pętli sondy 2, a sonda 2 ma fragment 3'-końcowy komplementarny do sekwencji pętli sondy 1. Ponadto każda z sond ma na końcach 5' i 3' przyłączone cząsteczki pirenu, które jednak oddalone są od siebie na tyle, by nie mogły tworzyć ekscymerów w obrębie jednego fragmentu kwasu nukleinowego. Przy tym sekwencja lepkiego końca sondy 1 jest komplementarna z poszukiwaną sekwencją DNA. W przypadku pojawienia się takiego fragmentu kwasu nukleinowego w otoczeniu, następuje łańcuchowa reakcja parowania komplementarnych sekwencji, najpierw poszukiwanego DNA z sondą 1, a następnie naprzemienne rozplatanie i parowanie sond 2 i 1. Powoduje to zbliżenie reszt pirenowych, które mogą zacząć wykazywać fluorescencję ekscymerową (Rys. 27A). W ten sposób może zostać wykryta nawet bardzo niewielka ilość DNA (nawet 1 nM, przy zastosowaniu sond w stężeniu 500 nM każda), przy bardzo mocnym wzmocnieniu sygnału. Autorzy wykazali, że sonda jest bardzo czuła na wszelkie zmiany sekwencji docelowego DNA – zarówno *mismatch*, insercja, jak i delecja pojedynczego nukleotydu wewnątrz sekwencji docelowego DNA nie powodowały znaczącej odpowiedzi układu. (Rys. 27B)

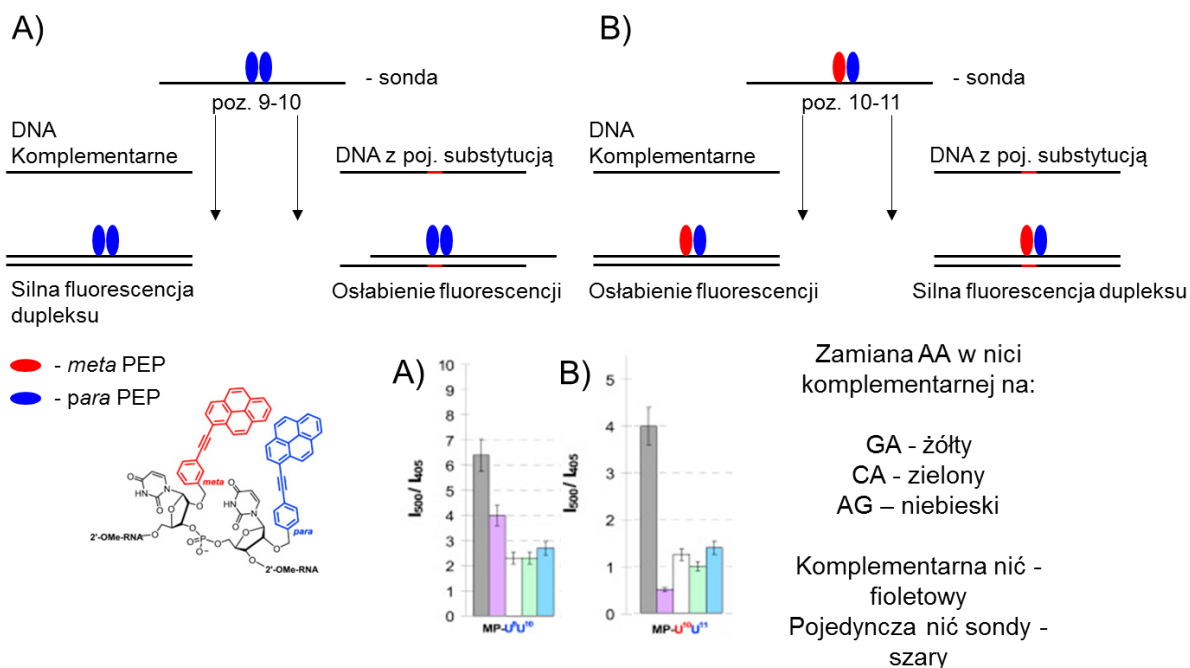


Rys. 27 A) idea działania łańcuchowej reakcji hybrydyzacji w wykrywaniu docelowego DNA
B) różnica odpowiedzi w przypadku zmian sekwencji wewnątrz sekwencji docelowego DNA. Rysunek
zaczerpnięty z pracy Huang *et al.*¹⁰⁸
Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914831278830).

Jednym z cennych zastosowań tego typu układów jest wyszukiwanie DNA o danej sekwencji w układach biologicznych. Autorzy przeprowadzili eksperyment z wykorzystaniem sond w serum cielęcym (FBS). Emisja ekscymeru pirenowego pokrywa się w znacznym stopniu z naturalną fluorescencją komórek, co zakłóciło analizę i uniemożliwiło proste odczytanie odpowiedzi fluorescencyjnej. Obejściem tego problemu okazała się rejestracja czasów życia fluorescencji. Typowy czas życia fluorescencji tła obiektów biologicznych wynosi poniżej 5 ns, co jest wartością znacznie

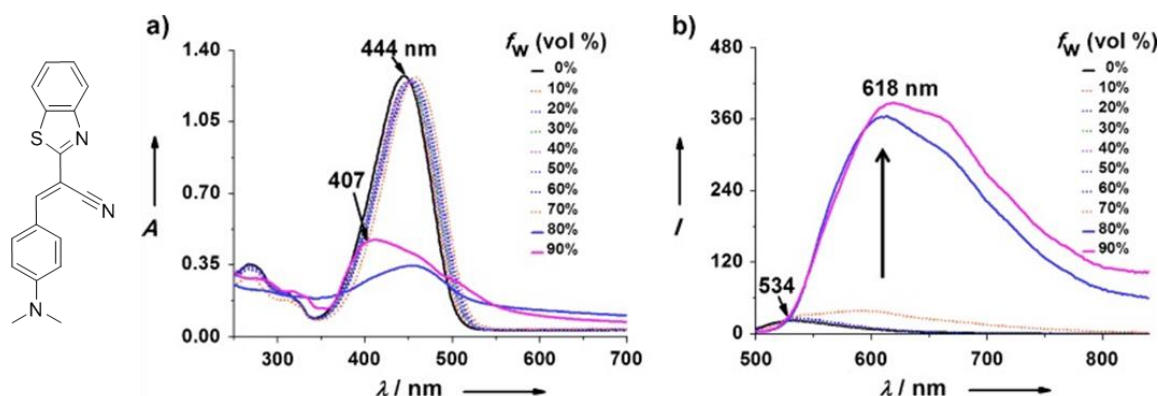
niższą niż typowy czas życia ekscymeru pirenu. Obserwacja ta umożliwiła detekcję w złożonym układzie biologicznym fragmentów DNA o stężeniu nawet 10 nM przy stężeniu sond wynoszącym 500 nM.

W przypadku sond oligonukleotydowych znakowanych wewnątrz sekwencji kwasu nukleinowego konieczna jest zwykle modyfikacja nukleotydu tak, by możliwe było przyłączenie fluorofora. Przykład zastosowania takiej modyfikacji ukazano w pracy Astakhova *et al.*¹¹⁰ W roli fluorofora tworzącego ekscymer wykorzystano fenyloetynylopiren (PEP, *phenylethynyl pyrene*) – związek ten tworzy ekscymer podobnie jak piren, jednak długość fali emisji jest przesunięta w stronę dłuższych fal światła (monomer: 405 nm, ekscymer: 500 nm). W celu umieszczenia go wewnątrz sekwencji łańcucha DNA autorzy otrzymali specjalnie zmodyfikowany nukleotyd urydynowy zawierający barwnik PEP, izomery *para* oraz *meta*. PEP został przyłączony w pozycji 2'-O, a następnie nukleozyd przekształcono w formę amidofosforynu i użyty w syntezie oligonukleotydów w fazie stałej. Przy jego pomocy uzyskano sondy RNA, każda zawierająca po dwa sąsiadujące zmodyfikowane nukleotydy-PEP, w różnych konfiguracjach *meta* i *para* (2x *meta*, *meta/para*, *para/meta*, oraz 2x *para*), oraz pozycjach umieszczenia ich (odpowiednio 9 i 10, oraz 10 i 11 nukleotyd). Następnie wszystkie sondy zostały zbadane w warunkach hybrydyzacji z komplementarnymi niciami DNA. W warunkach występowania pojedynczej nici sondy, fluorescencja ekscymerowa była dominująca (szary słupek na wykresie, Rys. 28). Po hybrydyzacji intensywność fluorescencji ulegała zmianie, w zależności od sondy rosnąc lub malejąc. Dwie sondy wykazujące najsilniejszy efekt zmiany dały dwa przeciwstawne rezultaty – sonda zawierająca w pozycji 9 i 10 nukleotydy z modyfikacjami *para/para* wykazała znacząco wyższą emisję fluorescencji w przypadku parowania z dokładnie dopasowanym DNA (Rys. 28A, ostatni wykres), niż w przypadku DNA, które uległo pojedynczej substytucji. Odwrotnie zareagowała sonda zawierająca modyfikację *meta/para* w pozycji 10 i 11 (Rys. 28B, drugi wykres). W jej przypadku parowanie z dokładnie komplementarną nicią spowodowało znacząco niższą fluorescencję w stosunku do fluorescencji wykazanej w reakcji z DNA z pojedynczą substytucją. W ten sposób autorzy otrzymali narzędzie do wyszukiwania SNP (*single nucleotide polymorphism*) w docelowym DNA.



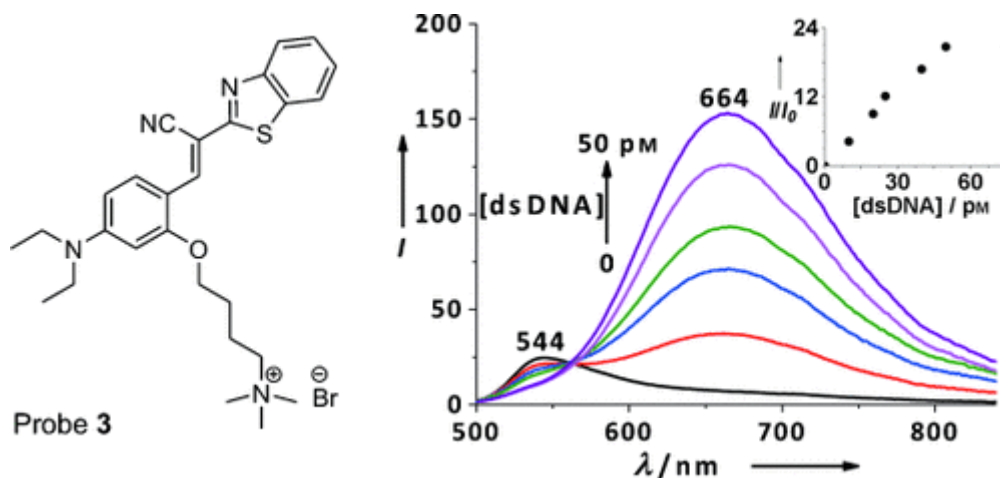
Rys. 28 Fluorescencja RNA zawierającego PEP w pozycji 9/10 (A) oraz 10/11 (B) podstawiony w pozycji *meta* bądź *para*. Najsilniejsza zawsze jest fluorescencja pojedynczej nici sondy (szary), obniża się ona w dupletach z DNA – komplementarnym (fioletowy), oraz z pojedynczymi zamianami sekwencji AA na GA, CA, oraz AG. Sondy z dwiema modyfikacjami *para*PEP w pozycji 9 i 10 (A), oraz *meta*PEP/*para*PEP w pozycjach 10 i 11 (B). Wykres zaczerpnięty z pracy Astakhova *et al.*¹¹⁰ Powielone za zgodą wydawcy (nr licencji 4914831387824).

PEP to analog pirenu wykazujący emisję fluorescencji przesuniętą w stosunku do pirenu w stronę dłuższych długości fal (batochromowo). Jest to korzystne, gdyż wzbudzenie układu promieniowaniem o niższej energii niesie ze sobą mniejszą szansę na zniszczenie badanego obiektu biologicznego promieniowaniem UV, a ponadto fluorescencja barwnika jest odseparowana od naturalnej fluorescencji komórek, co jest obejściem problemu zasygnalizowanego już w pracy Huanga.¹⁰⁸ Przesunięcie emisji PEP w stosunku do pirenu nie jest wielkie (ok. 40 nm), odbywa się jednak kosztem znaczącego wzrostu niepolarności i wielkości cząsteczki. Może mieć to duży wpływ na zastosowania biologiczne, czy rozpuszczalność w wodzie. W pracy Han *et al.*¹¹¹ postanowiono obejść ten problem odchodząc od podstawowej struktury pirenu i znajdując zupełnie inną cząsteczkę wykazującą efekt fluorescencji ekscymerowej. Związkiem takim okazał się barwnik cyjanowinylenowy. Autorzy w pracy otrzymali na drodze prostej reakcji dwa analogi nowego barwnika. Wykazali oni, że barwnik cyjanowinylenowy w zależności od stężenia może wykazywać różną emisję fluorescencji – monomerowa emisja występuje przy długości fali około 540 nm, natomiast ekscymerowa – przy długości fali około 620 nm. Wzbudzenie następuje przy naświetleniu światłem o długości fali 440 nm.



Rys. 29 Struktura barwnika cyjanowinylowego zaprezentowanego w pracy Han *et al.* oraz jego widmo absorpcji (a) oraz emisji (b) w układzie MeCN/H₂O. W legendzie ukazany jest procent wody w acetonitrylu. Im jest on wyższy, tym mocniej agregują cząsteczki barwnika i stąd pojawiająca się fluorescencja ekscymerowa. Rysunek zaczerpnięty z pracy Han *et al.*¹¹¹ Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914831494555).

W tej samej pracy autorzy zaprezentowali zastosowanie nowo otrzymanego barwnika w kontekście wykrywania obecności DNA. W tym celu zmodyfikowali oni otrzymany barwnik tak, by zawierał on linker zakończony dodatnio naładowanym czwartorzędowym atomem azotu. Modyfikacja ta oddziaływała elektrostatycznie z ujemnie naładowanym łańcuchem kwasu nukleinowego, co powodowało agregację wielu cząsteczek barwnika wzdłuż nici DNA i skutkowało emisją ekscymerową w zakresie około 664 nm.



Rys. 30 Struktura barwnika zdolnego oddziaływać z DNA oraz obraz zmieniającego się widma w zależności od stężenia DNA w próbce (od 0 do 50 pM). Zaczerpnięty z pracy Han *et al.*¹¹¹ Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914831494555).

Podsumowując – zastosowany barwnik wykazał szereg zalet. Ma preferencyjną w stosunku do barwników pirenowych długość fali wzbudzenia – 440 nm, co wykracza poza wartość szkodliwego dla komórek ultrafioletu, pasma fluorescencji ekscymerowej i monomerowej są odsunięte od długości fali naturalnej fluorescencji komórek, a także od siebie nawzajem, poza tym może być on łatwo modyfikowany, co nie wpływa znacząco na jego właściwości fluorescencyjne. Ponadto w zaprezentowanej przez autorów formie z linkerem pozwala na opracowanie bardzo czułej metody detekcji DNA, która nie wymaga interkalacji barwnika wewnątrz helisy.

7.3. Podsumowanie rozdziału

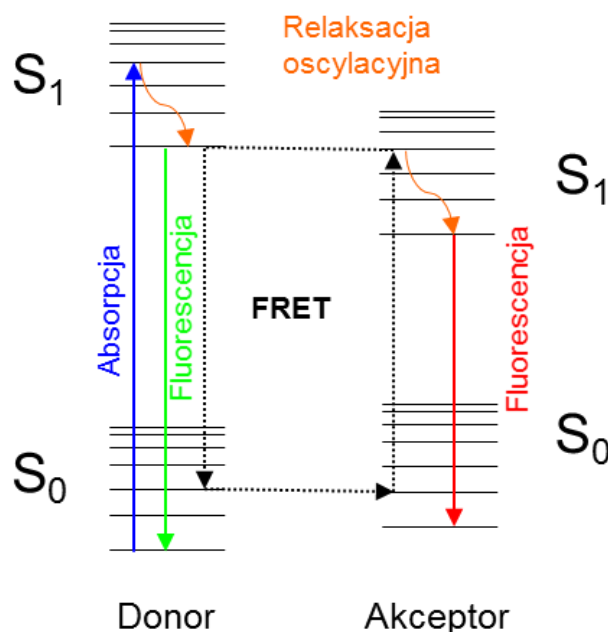
Fluorescencja ekscymerowa to rodzaj fluorescencji, w którym dany barwnik po wzbudzeniu oddziałuje z drugą taką samą cząsteczką barwnika tworząc dimer w stanie wzbudzonym, który emituje światło o większej długości fali w porównaniu do wzbudzonego monomeru. W ogólności to, czy możliwe będzie uzyskanie ekscymeru zależy od stężenia barwnika w roztworze, jednak w mikroskali „stężenie” można symulować umieszczając barwniki przyłączone w bliskiej odległości do siebie. Wykorzystując tę właściwość można mierzyć odległości między cząsteczkami biologicznymi. W tym rozdziale ukazano wybrane zastosowania takich układów w kontekście chemii kwasów nukleinowych. Ekscymery tworzone są na bardzo niewielkiej odległości, przez co są układem bardziej czułym na zwiększającą się odległość, niż np. sondy wykorzystujące zjawisko FRET. Przykładowo, przy pomiarze bardzo niewielkiego oddalenia się cząsteczek biologicznych fluorescencja ekscymerowa ustanie, co da mierzalny efekt, podczas gdy dla takiego samego oddalenia efekt FRET jeszcze nie uległby zmianie. Wadą ekscymerów jest jednak to, że bardzo ograniczona liczba barwników je tworzy, a z tego najbardziej popularny piren – z jednej strony wymaga wzbudzenia w zakresie UV, który może być niszczący dla żywych komórek, a z drugiej strony wykazuje fluorescencję w zakresie do 500 nm, co łatwo może interferować z naturalną fluorescencją komórek. W następnym rozdziale omówiony zostanie efekt FRET, który nie ma wielu z tych ograniczeń i który jest bardzo szeroko wykorzystywany w badaniach biologicznych.

8. Zjawisko FRET i jego zastosowanie w badaniu oddziaływań nukleotydów z cząsteczkami biologicznymi

8.1. Podstawy teoretyczne zjawiska FRET

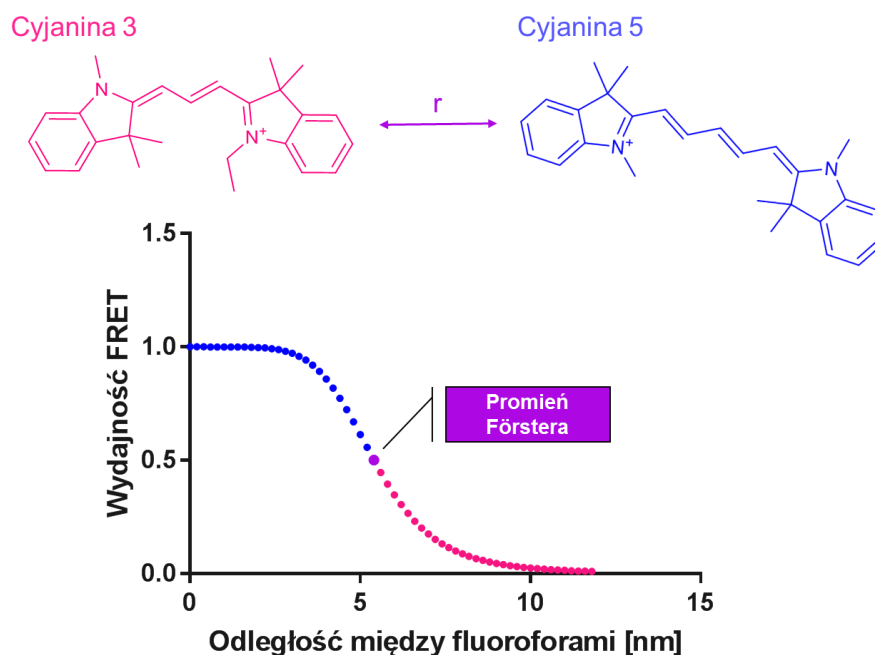
Zjawisko FRET (*Förster resonance energy transfer*) to mechanizm bezpromienistego przeniesienia energii między dwoma fluoroforami. Jeden z tych fluoroforów (donor) jest wzbudzany kwantem promieniowania z zewnątrz, a następnie przekazuje energię drugiemu fluoroforowi (akceptorowi), który wypromieniowuje ją w postaci kwantu promieniowania. Zjawisko to jest przedstawione poniżej na diagramie Jabłońskiego (Rys. 31). Donor po absorpcji kwantu promieniowania (niebieska strzałka) zostaje wzbudzony, a jeden z jego elektronów zostaje przeniesiony na wyższy poziom energetyczny. Następnie w sposób typowy dla fluorescencji następuje relaksacja, a elektron wytraca energię na sposób drgań, znajduje się jednak wciąż w obrębie wyższego elektronowego poziomu energetycznego ($S_0 \rightarrow S_1$). Gdyby donor był odizolowany, nastąpiłoby wypromieniowanie energii (zielona strzałka) w postaci charakterystycznego dla niego kwantu promieniowania. W sytuacji gdy w bliskiej

odległości znajduje się akceptor dochodzi do bezpromienistego przekazania energii i wzbudzenia go na wyższy elektronowy poziom energetyczny (czarne, kropkowane strzałki). Kolejno następuje relaksacja w obrębie tego poziomu do niższego poziomu oscylacyjnego, a następnie powrót akceptora do niższego elektronowego poziomu energetycznego z jednoczesną emisją fotonu ($S_1 \rightarrow S_0$, czerwona strzałka).



Rys. 31 Diagram Jabłońskiego ilustrujący zjawisko FRET. Na podstawie rysunku Mooney.¹¹²

Zjawisko FRET zachodzi w sytuacji, gdy fluorofory znajdują się w bliskiej odległości od siebie (między 1 a 10 nm)¹¹³. Intensywność tego efektu bardzo silnie zależy od odległości. Dla każdej pary fluoroforów zdefiniowany jest promień Förstera, który jest wartością odległości między fluoroforami, przy której 50% wzbudzonych fluoroforów przekaże swoją energię do akceptorów. Wzór na wydajność transferu energii $E = \frac{r_0^6}{r^6 + r_0^6}$, gdzie r_0 to promień Förstera, a r to odległość między fluoroforami, pokazuje że wydajność ta spada bardzo szybko wraz z odległością. Przykładowo jedną z najpopularniejszych par FRET stosowanych w badaniach biologicznych jest para cyjanina 3 – cyjanina 5 (Cy3-Cy5). Promień Förstera dla tej pary wynosi 5,4 nm.¹¹⁴ Oznacza to, że już w odległości 5,4 nm fluorofory będą oddziaływać ze sobą tylko w 50%, a wartość ta będzie szybko spadała wraz z powiększającą się odległością. (Rys. 32)



Rys. 32 Zależność wydajności efektu FRET od odległości między cyjaniną 3 (donor) i cyjaniną 5 (akceptor). Wartości wg pracy Yuan et al.¹¹⁴

Promień Förstera może być też określony poniższym równaniem (Równanie 1):

$$r_0^6 = \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

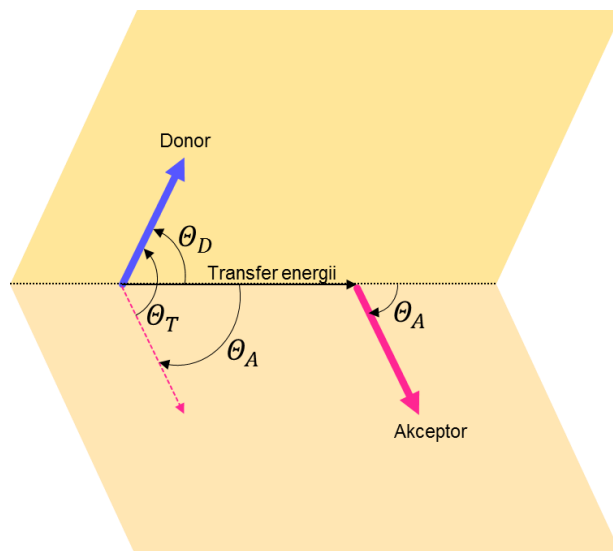
Równanie 1 pozwalające określić promień Förstera

gdzie κ^2 to współczynnik orientacji donora i akceptora wobec siebie, Q_D jest wydajnością kwantową donora, n jest współczynnikiem załamania ośrodka, w którym znajdują się fluorofory, N liczbą Avogadra.¹¹⁵ Całka będąca składową równania odpowiada stopniu nakrywania widma emisji donora oraz widma wzbudzenia akceptora. W równaniu tym F_D odpowiada znormalizowanej do jedności intensywności emisji fluorescencji donora, ε_A – molowej absorpcji akceptora. Istotnym czynnikiem związanym z wyżej wymienionym równaniem 1 jest współczynnik orientacji donora i akceptora wobec siebie. Jego wartość zdefiniowana jest w następujący sposób (Równanie 2):

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

Równanie 2 określające wartość współczynnika orientacji κ^2

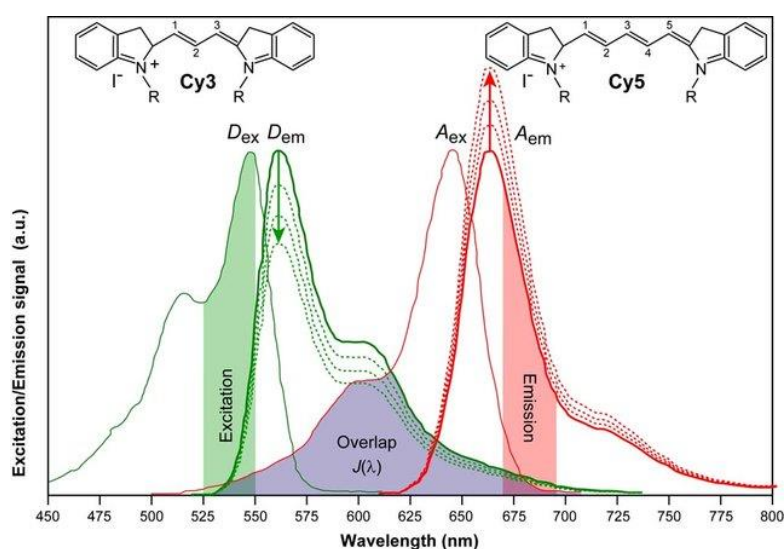
gdzie θ_T odpowiada wartości kąta między dipolowym momentem przejścia emisji donora oraz dipolowym momentem przejścia absorpcji akceptora. θ_D oraz θ_A oznaczają odpowiednio wartości kątów między momentami przejść donora i akceptora, a wektorem przeniesienia energii. (Rys. 33)



Rys. 33 Kąty między dipolowymi momentami przejść donora i akceptora, a kierunkiem przeniesienia energii w zjawisku FRET.

Ponieważ ustalenie orientacji donora i akceptora wobec siebie nie jest możliwe (zwłaszcza w roztworze, a więc też w warunkach fizjologicznych), współczynnik κ^2 nie może być dokładnie wyznaczony. Jego zakres w skrajnych przypadkach wynosi od $\kappa^2 = 0$ dla prostopadle ustawionych dipolowych momentów przejścia, do $\kappa^2 = 4$ w przypadku antyrównolegle ustawionych dipoli. Ponieważ w roztworze występuje ich rotacja, w większości przypadków słuszne jest przyjęcie uśrednionej wartości wynoszącej $\kappa^2 = 2/3$.¹¹⁶

W równaniu 1 został zasygnalizowany problem nakrywania się widm donora i akceptora. Istotne jest takie dobranie oddziałujących związków, aby widmo emisji donora w jak największym stopniu pokrywało się z widmem wzbudzenia akceptora. Dla pary Cy3-Cy5 stopień pokrywania przedstawiony został poniżej. (Rys. 34)



Rys. 34 Pokrywanie się widm wzbudzenia i emisji cyjaniny 3 i cyjaniny 5. Rysunek zaczerpnięty z pracy Ishikawa-Ankerhold *et al.*¹¹⁷

Warto zwrócić uwagę, że widmo wzbudzenia akceptora może częściowo pokrywać się także z widmem wzbudzenia donora. W takiej sytuacji jak ta przedstawiona na Rys. 34 należy uważnie dobierać długość fali wzbudzającej donor, gdyż wybranie najwyższego pasma wzbudzenia cyjaniny 3 (ok. 540 nm) może wzbudzić także cyjaninę 5 – akceptor, a w efekcie doprowadzić do błędnej interpretacji obserwowanej emisji akceptora, która jednak nie będzie wynikać jedynie z efektu FRET.

Szczególnym przypadkiem zjawiska FRET jest wygaszanie fluorescencji. W takim przypadku akceptor FRET nie jest fluoroforem, a po przekazaniu energii z donora rozproszenie jej następuje w sposób bezpromienisty – najczęściej na sposób ciepła.

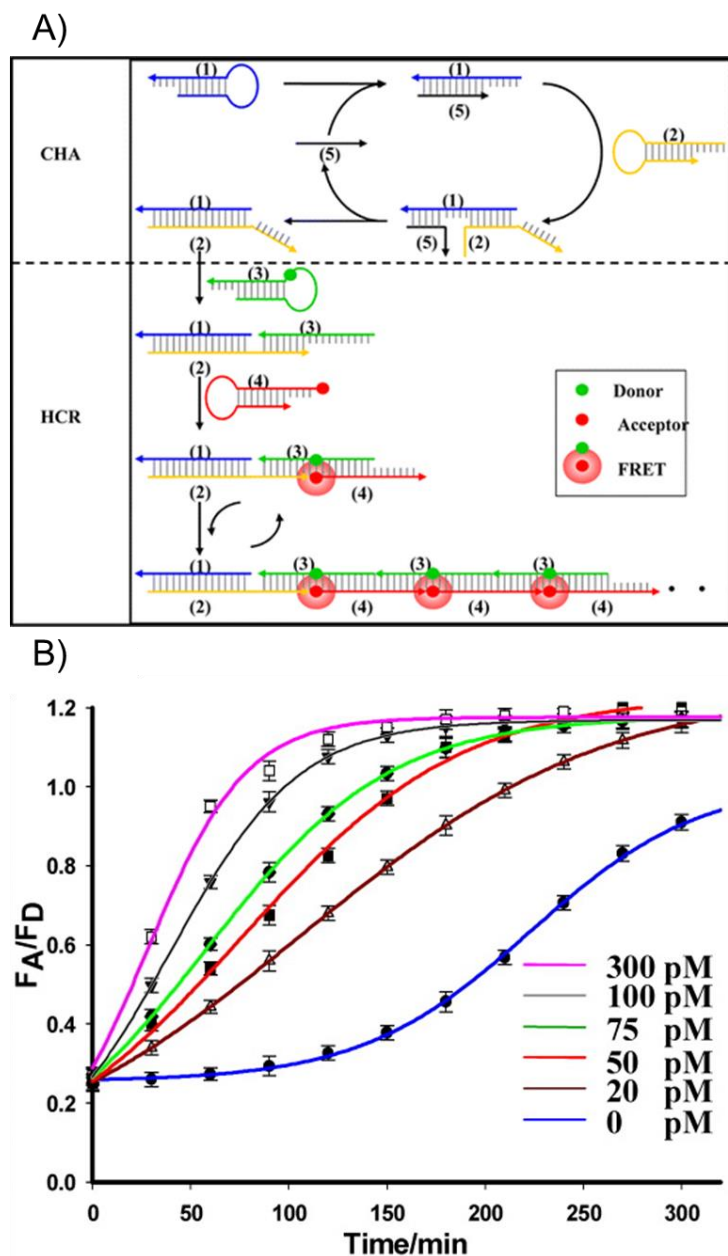
W literaturze znane są bardzo różne pary FRET. Z uwagi na dużo większą dostępność rozmaitych barwników, metody te są dużo powszechniej stosowane niż metody opierające się o efekt ekscymerowy. W następnych rozdziałach zostaną przedstawione różne przykłady zastosowania efektu FRET w badaniu oddziaływań nukleotydów i kwasów nukleinowych z biomolekułami.

8.2. Zjawisko FRET w badaniu oddziaływań kwasów nukleinowych

Intensywność zjawiska FRET bardzo silnie zależy od odległości między fluoroforami. Z tego względu jest ono szeroko wykorzystywane w badaniach biologicznych do analizowania oddziaływań między makrocząsteczkami biologicznymi, czy też w analityce, na przykład do poszukiwania określonych sekwencji DNA. Przykład takiego analitycznego zastosowania zjawiska FRET ukazano w pracy Quan *et al.*¹¹⁸ Autorzy zaprezentowali omawiany już wcześniej mechanizm HCR (por. rozdział 7.2, praca Huang *et al.*) w poszukiwaniu DNA o określonej sekwencji, jednocześnie rozszerzając metodę tak, by możliwe było wykrywanie bardzo niskich stężeń określonego analitu. W pracy tej autorzy opracowali cztery sondy DNA, które tworzą strukturę typu *hairpin*. Każda z nich zakończona jest lepкими końcami DNA. Sondy (1) oraz (2) pozostały niewyznakowane, sonda (3) zawierała cząsteczkę fluoresceiny wewnątrz nici DNA, a sonda (4) cząsteczkę tetrametylorodaminy na końcu 3'. Wszystkie sondy mogą współistnieć w roztworze równocześnie, dopóki w otoczeniu nie pojawi się cząsteczka DNA-katalizatora. Wtedy dochodzi do utworzenia dupleksu między nią i komplementarną do niej sondą (1), co następnie uruchamia kaskadę reakcji, rozplecenia struktury *hairpin* sondy (1), parowania sondy (1) z sondą (2), co z kolei prowadzi do utworzenia lepkiego końca sondy (2), komplementarnego do wyznakowanej sondy (3). Następnie kolejno w powtarzalnej reakcji tworzenia dupleksu i parowania sond (3) i (4) dochodzi do utworzenia długiego dupleksu DNA, w którym barwniki fluorescencyjne znajdują się na tyle blisko, by mogło zajść zjawisko FRET. (Rys. 35) Metoda ta jest bardzo czuła, przy zastosowaniu sond w stężeniach 1 μM , jest w stanie wykryć obecność DNA docelowego w stężeniu 20 pM.

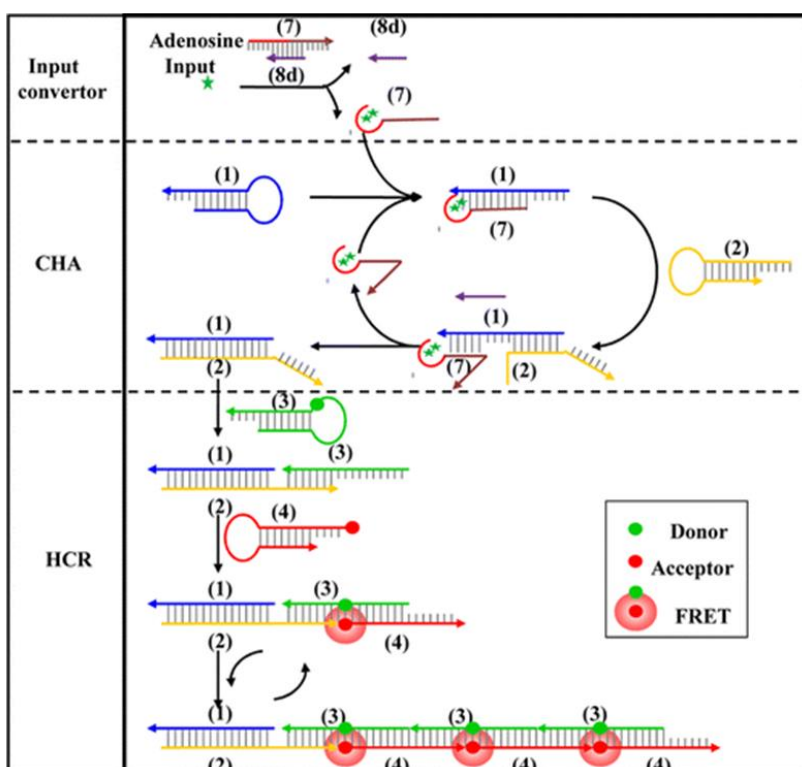
W drugiej części pracy autorzy sprawdzili czy istnieje możliwość zastosowania opracowanej metody w celu wykrywania małych cząsteczkowych związków w niskich stężeniach. W tym celu badacze opracowali strukturę aptameru wiążącego testowy

analit – adenozyne (7). Aptamer ten na krótkim odcinku był komplementarny z sekwencją inhibitora (8d). Rozwiązanie to uniemożliwiło aptamerowi wiązanie się z sondą (1). Dopiero w sytuacji pojawienia się adenozyzny w środowisku reakcji dochodzi do rozplecenia sekwencji inhibitora z sekwencją aptameru, co umożliwia dalsze parowanie sekwencji aptameru z sekwencją sondy (1) i dalsze generowanie odpowiedzi w taki sposób, jak zostało to opisane powyżej (Rys. 36). Metoda ta jest bardzo czuła i umożliwiła autorom wykrycie adenozyzny już w stężeniu 200 pM.

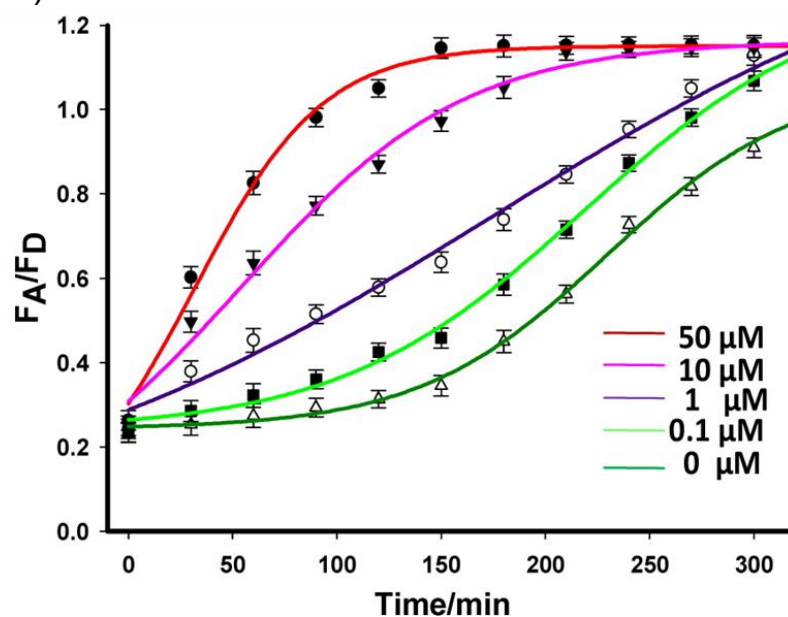


Rys. 35 A) schemat eksperymentu wykrywania DNA docelowego w metodzie HCR wykorzystującej zjawisko FRET. B) zmieniający się w czasie stosunek intensywności fluorescencji akceptora do intensywności fluorescencji donora w zależności od zastosowanego stężenia docelowego DNA. Zaczepnięto z pracy Quan *et al.*¹¹⁸ Copyright (2016) American Chemical Society.

A)



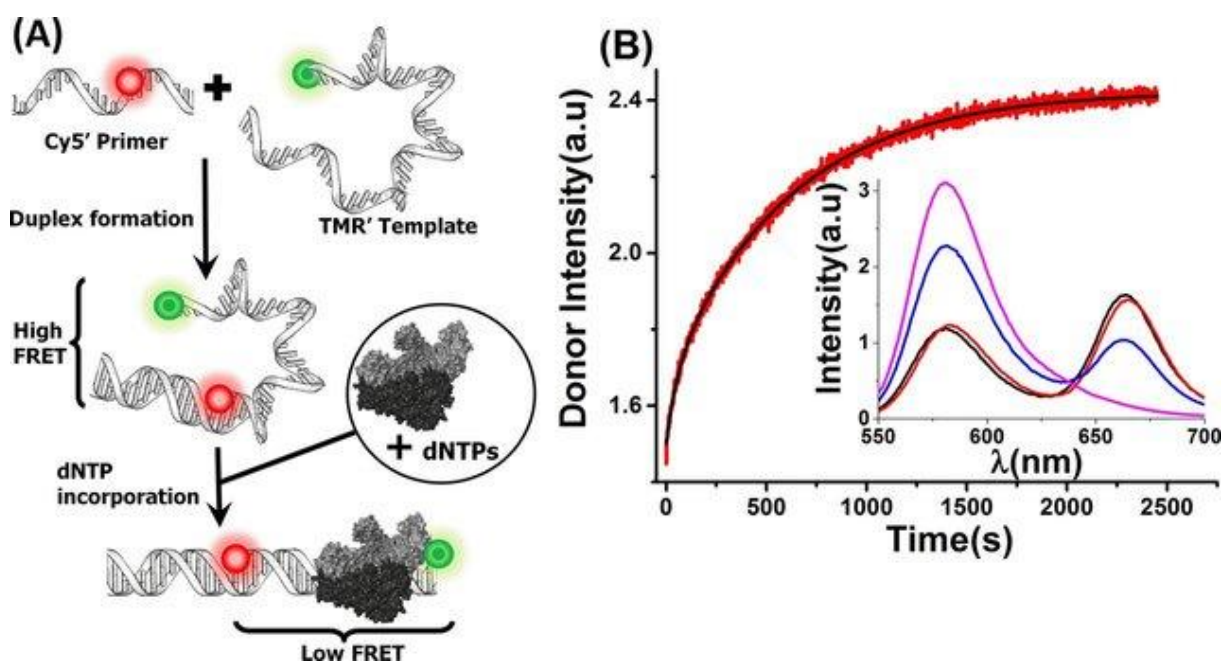
B)



Rys. 36 A) schemat eksperymentu z zastosowaniem aptameru wiążącego adenozyne
B) zmieniający się w czasie stosunek intensywności fluorescencji akceptora do intensywności fluorescencji donora w zależności od zastosowanego stężenia adenozyne. Zaczerpnięto z pracy Quan *et al.*¹¹⁸ Copyright (2016) American Chemical Society.

Oprócz badania oddziaływań między kwasami nukleinowymi, techniki FRET w biologii użyteczne są też do opracowywania sond pozwalających na monitorowanie aktywności enzymów. Szczególnie interesujące są enzymy, których inhibicja może mieć efekt terapeutyczny w rozmaitych chorobach organizmu. Przykładem takiego

enzymu jest odwrotna transkryptaza wirusa HIV. Opracowanie procedury pozwalającej w czasie rzeczywistym badać aktywność tego enzymu mogą być użyteczne w poszukiwaniu jego inhibitorów. Wyzwania tego podjęto się w pracy Sharma *et al.*¹¹⁹ W pracy tej autorzy otrzymali DNA nici matrycowej wyznakowany tetrametylorodaminą (TMR) oraz odcinek primeru DNA wyznakowany cyjaniną 5. Ze względu na ich komplementarność tworzą one dupleks, co zbliża do siebie barwniki i powoduje pojawienie się efektu FRET. Zastosowane stężenie kwasów nukleinowych to 100 nM. W momencie pojawienia się w środowisku reakcji odwrotnej transkryptazy (100 nM) i trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dNTP; 100 μ M) rozpoczyna się reakcja odwrotnej transkrypcji, a stopniowo tworzona nić komplementarna do nici matrycowej usztywnia strukturę i oddala barwniki od siebie powodując zaniknięcie efektu FRET. (Rys. 37)

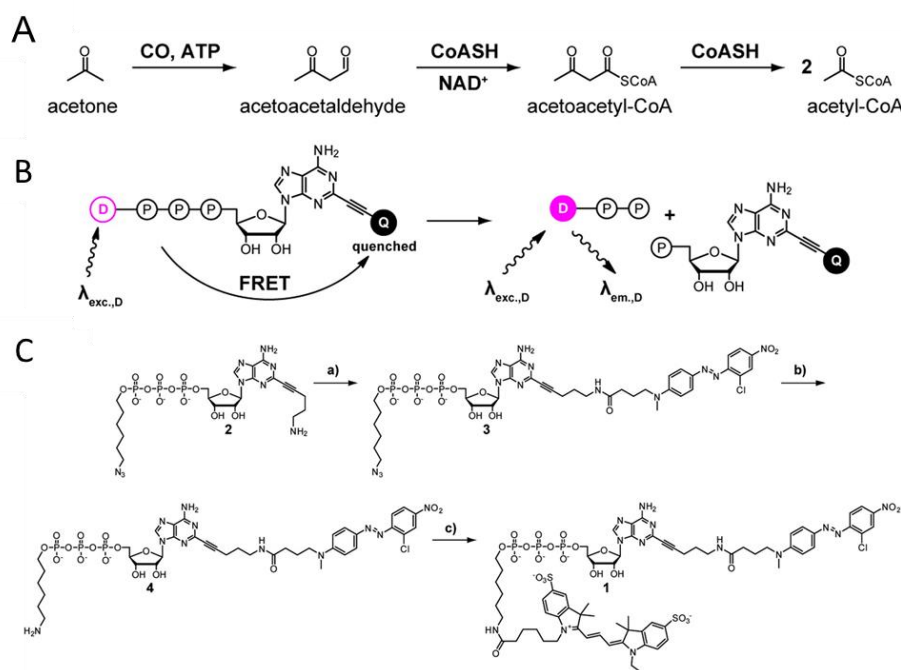


Rys. 37 A) Schemat działania układu FRET do monitorowania aktywności odwrotnej transkryptazy, B) Zmiana intensywności fluorescencji donora (TMR) w miarę postępu reakcji. Wewnętrzny obrazek: czarny: widmo pod nieobecność odwrotnej transkryptazy, czerwony: widmo po dodaniu odwrotnej transkryptazy, niebieski: widmo po dodaniu odwrotnej transkryptazy oraz po 100 μ M każdego dNTP, różowy: widmo nici matrycowej wyznakowanej TMR i w obecności niewyznakowanego primeru. Zaczepnięto z pracy Sharma *et al.*¹¹⁹ Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914840240584).

Opracowana metoda została wykorzystana do zbadania wpływu znanych inhibitorów (AZT, newirapina) na aktywność odwrotnej transkryptazy i w obu przypadkach autorzy wykazali, że pozwala ona na monitorowanie aktywności enzymu oraz stopnia jego inhibicji.

8.3. Analogi ATP wykazujące efekt FRET i ich zastosowanie w badaniach enzymatycznych

Przedstawione w poprzednim rozdziale przykłady ukazywały zastosowanie znakowanych kwasów nukleinowych w roli sond do monitorowania aktywności enzymatycznej, albo jako narzędzie w detekcji innych kwasów nukleinowych, bądź związków małowcząsteczkowych. Jednak zjawisko FRET można wykorzystać także w przypadku dużo mniejszych cząsteczek, takich jak pojedyncze nukleotydy. Przykład takiego związku zaprezentowano w pracy Acosta *et al.*,¹²⁰ gdzie badano mechanizm proces karbonylacji acetonu przez bakterię *Desulfococcus biacutus*. (Rys. 38) Naukowcy użyli analogu ATP zawierającego przyłączony barwnik fluorescencyjny (sulfo-Cy3) w pozycji γ ugrupowania trifosforanowego, oraz wygaszacz fluorescencji (Eclipse-quencher) przyłączony w pozycji C2 adeniny. Został on otrzymany na drodze dwustopniowego przyłączania barwników do analogu ATP,¹²¹ za pomocą strategii NHS. (por. rozdz. 10.4)



Rys. 38

A) schemat szlaku metabolicznego acetonu przeprowadzanego przez bakterię *Desulfococcus biacutus*

B) Idea zastosowania sondy ATP zawierającej wygaszacz fluorescencji oraz fluorofor

C) Schemat syntezy analogu ATP wykorzystanego w pracy Acosta *et al.*¹²⁰

a) Eclipse-quencher-NHS, 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,7), DMF, 12 h, 26%.

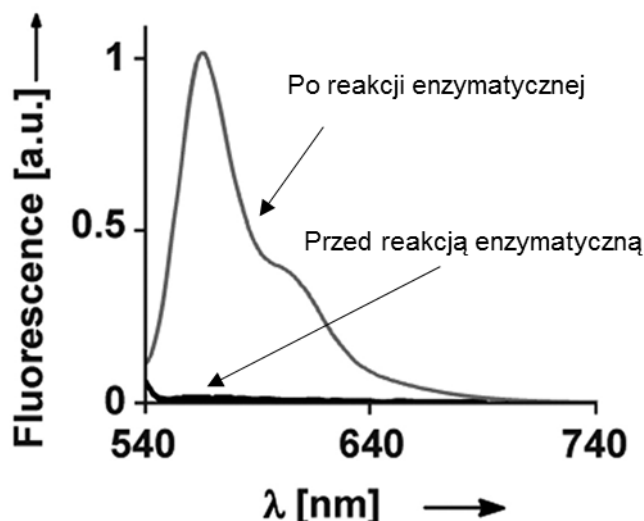
b) TCEP, H₂O/MeOH/Et₃N, 4 h, 57%.

c) SulfoCy3-NHS, 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,7), DMF, 12 h, 80%.

Copyright © 2014 American Chemical Society.

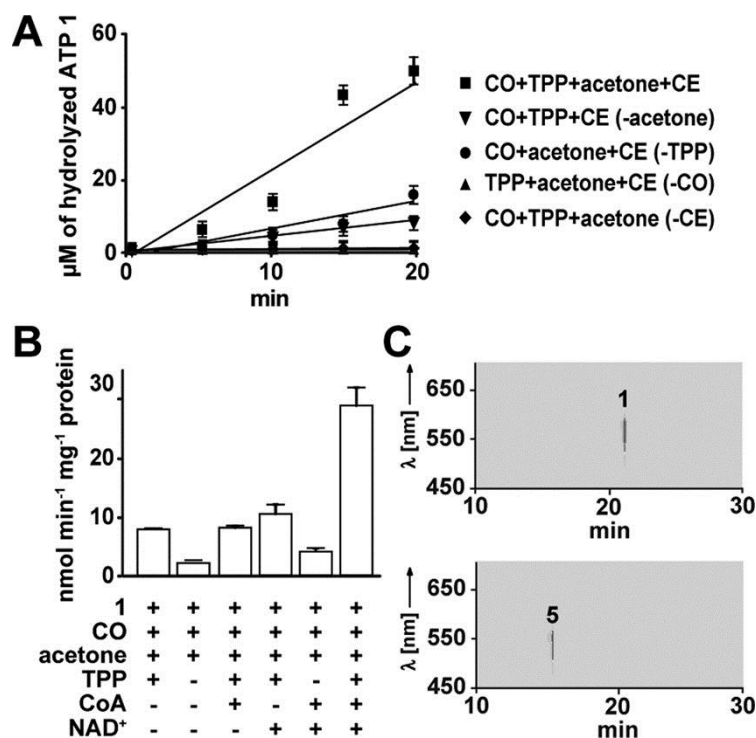
Otrzymany analog został sprawdzony w reakcji z modelową fosfodiesterazą PDE-I, która jest enzymem hydrolizującym wiązanie α,β -pirofosforanowe, niespecyficznym względem zasady nukleotydowej w nukleotydzie. W reakcji tej autorzy stwierdzili

znaczące zwiększenie intensywności emisji fluorescencji, co sugerowało, że fluorofor istotnie był wygaszony, a degradacja łańcucha oligofosforanowego spowodowała odseparowanie wygaszacza i powrót emisji cyjaniny (Rys. 39). Autorzy zidentyfikowali powstałe fragmenty jako difosforan sulfocyjaniny 3 oraz monofosforan adenozyiny z przyłączonym wygaszczem. Upewniwszy się, że degradacja łańcucha fosforanowego skutkuje pojawianiem się fluorescencji, autorzy przystąpili do właściwej części badań bakterii *Desulfococcus biacutus*.



Rys. 39 Różnica widma emisji fluorescencji sulfocyjaniny 3 przed i po reakcji z enzymem PDE-I. Wykres zaczerpnięty z pracy Acosta et al.¹²⁰ Copyright © 2014 American Chemical Society

Głównym celem badań było zbadanie mechanizmu reakcji przemiany acetonu w acetylokoenzym A, oraz weryfikacja hipotezy, że w przemianę tę zaangażowany jest pirofosforan tiaminy. Hipoteza ta została wysnuta na podstawie wstępnych badań, w których ustalono, że w ekstrakcie komórkowym bakterii w obecności acetonu i tlenu węgla (II), dochodzi do degradacji analogu ATP i odnowienia jego fluorescencji z prędkością $2,1 \pm 0,5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1}$ na mg białek ekstraktu. Jako kontrola posłużyło doświadczenie w którym nie zastosowano CO – wtedy degradacja sondy nie była obserwowana (Rys. 40 A, C). Dodanie pirofosforanu tiaminy spowodowało zwiększenie tej prędkości do $7,77 \pm 0,27 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1}$ na mg białek ekstraktu. Co istotne, pod nieobecność acetonu również dochodziło do degradacji sondy ATP, jednak reakcja ta była znacznie wolniejsza, co dowodzi, że inne ATP-azy obecne w ekstrakcie wnoszą odpowiednio mniejszy udział w reakcji degradacji sondy, niż te zaangażowane w metabolizm acetonu (Rys. 40 A). W następnym kroku autorzy zbadali, że wprowadzenie kofaktorów reakcji utleniania (koenzym A oraz NAD^+) powoduje dalsze przyspieszenie reakcji, co świadczy o przesuwaniu równowagi reakcji karbonylacji acetonu przez usuwanie produktu. Prędkość w tym przypadku wyniosła $28,7 \pm 3,11 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1}$ na mg białek ekstraktu (Rys. 40 B). W etapie utlenienia acetyloacetonu biorą udział obydwa kofaktory. Dodanie każdego z nich z osobna nie powodowało zwiększenia szybkości reakcji.



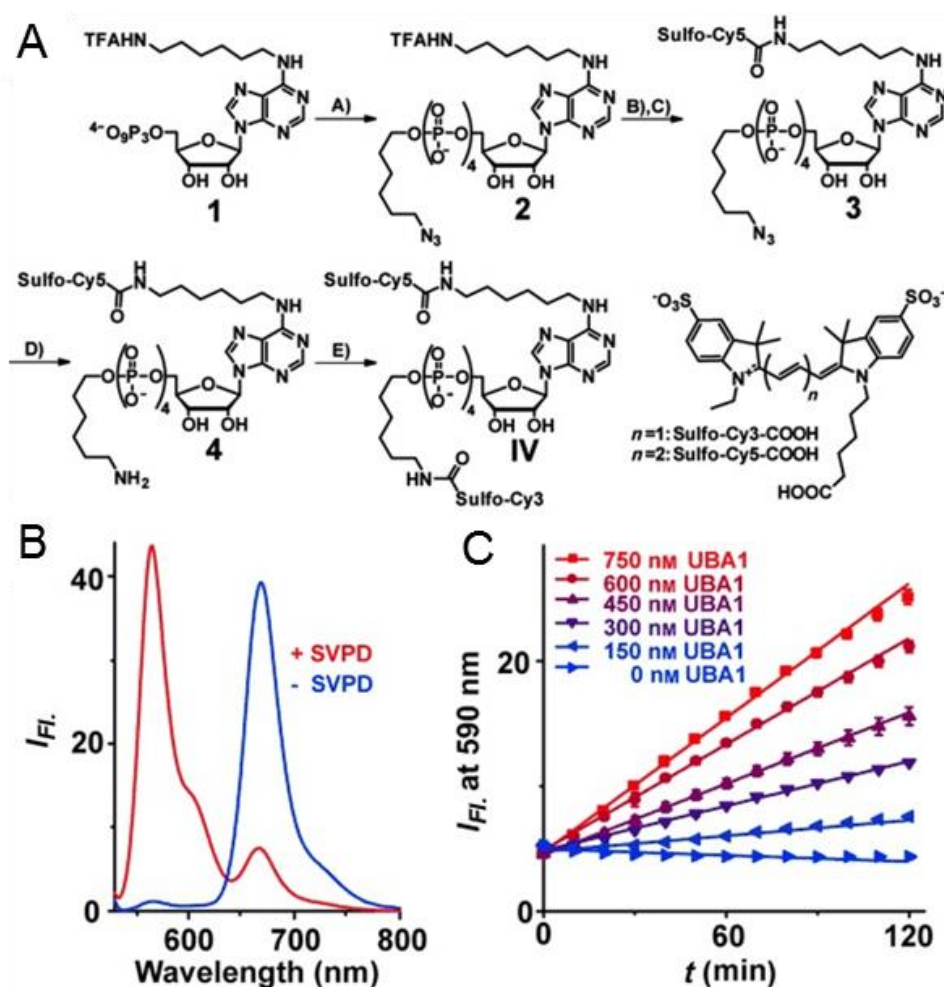
Rys. 40 Porównanie warunków reakcji degradacji acetonu przez bakterię *Desulfococcus biacutus*. Ilustracja zaczerpnięta z pracy Acosta et al.¹²⁰

- A) zmiany stężenia sondy ATP w czasie w różnych układach eksperymentalnych
- B) zmiana szybkości konsumpcji sondy ATP w ekstraktach komórkowych w różnych układach eksperymentalnych
- C) górny panel – chromatogram HPLC pobrany po 60 min reakcji kontrolnej, w której zamiast CO użyto N₂. Sygnał zaznaczony jako 1 został scharakteryzowany przy pomocy HR MS jako nienaruszona sonda ATP. Dolny panel – chromatogram HPLC pobrany po 60 min reakcji kontrolnej zawierającej wszystkie niezbędne substraty. Sygnał zaznaczony jako 5 został scharakteryzowany jako difosforan sulfocyjaniny 3 – produkt degradacji sondy ATP.
- Copyright © 2014 American Chemical Society

Dzięki zastosowaniu nowej sondy ATP autorzy byli w stanie wysnuć wniosek co do mechanizmu przekształcenia acetonu, że w reakcji nie dochodzi do jego fosforylacji, co jednak nie wyklucza, że może dochodzić do jego adenylacji. Reakcja przekształcenia 1 mola acetonu w acetoacetylo-CoA przez tę ściśle beztlenową bakterię wymaga zużycia 1 mola ATP. Autorzy zwracają uwagę, że bakterie aerobowe do uzyskania 1 mola tego samego produktu z acetonu wymagają przynajmniej 2 moli ATP. Jest to przykład dostosowania szlaku metabolicznego bakterii beztlenowej, która dysponując dużo mniejszymi zasobami energetycznymi, musi dużo oszczędniej nimi gospodarować w porównaniu z bakteriami zdolnymi do przeprowadzenia oddychania tlenowego.

Kolejnym interesującym przykładem sondy ATP zastosowanym przez tych samych badaczy jest analog ATP zawierający dwa fluorofory wykazujące efekt FRET – sulfocyjaninę 3 i sulfocyjaninę 5.¹²² Posłużył on do badania reakcji aktywacji ubikwityny, która jest pierwszym etapem procesu ubikwitynacji białka. (por. roz. 3.4).

ATP jest wykorzystywany przez białko E1/UBA1 do aktywacji ubikwityny przez jej adenylację. Eksperymenty *in silico* wykazały, że białko to najlepiej akceptuje modyfikację ATP wprowadzoną w pozycji N6 adeniny (por. roz. 6.1), przy czym modyfikacja reszty trifosforanowej w bardzo nikły sposób wpływa na wiązanie analogu przez UBA1. Rozszerzone eksperymenty dotyczące tolerancji enzymu UBA1 wobec różnych analogów ATP wykazały, że analog tetrafosforanowy jest lepiej akceptowany przez UBA1 niż analog trifosforanowy. W związku z tym autorzy zdecydowali się wprowadzić modyfikacje w pozycji N6 oraz w pozycji reszty fosforanowej δ . W reakcji przyłączania fluoroforów użyta została strategia NHS. Otrzymana sonda wykazywała efekt FRET, a reakcja z enzymem PDE-I wykazała, że degradacja łańcucha fosforanowego skutkuje zakończeniem oddziaływania barwników i ustaniem efektu FRET. (Rys. 41B) Autorzy zbadali też zachowanie sondy w obecności jedynie enzymu UBA1 – byli w stanie obserwować liniową zmianę fluorescencji w czasie. Wzrost ten był tym szybszy, im wyższe stężenie enzymu zostało użyte w eksperymencie. (Rys. 41C)



Rys. 41 **A**) Synteza sondy ATP. Kolejne etapy syntezy opisane zostały poniżej:
A) 1. EDC-HCl, DMF, 2,5 h; 2. MeOH, 3 h; 3. 6-azydoheksylofosforan, 12 h, 40 °C, 23 %;
B) 0,1 M NaOH, 4 h;
C) Sulfo-Cy5 aktywny ester NHS, 0,1 M NaHCO₃, DMF, pH 8,7, 12 h, 23 %;

- D) trikarboksyetylofosfina, Et₃N, H₂O, MeOH, 4 h, 74 %;
- E) Sulfo-Cy3 aktywny ester NHS, 0.1 M NaHCO₃, DMF, pH 8,7, 12 h, 61 %.
- B)** widmo emisji fluorescencji sondy ATP przy wzbudzeniu falą o długości 520 nm przed (niebieski) oraz po (czerwony) reakcji z enzymem PDE-I.
- C)** Wzrost intensywności fluorescencji przy długości fali 590 nm sondy ATP. Im więcej enzymu UBA1 znajduje się w środowisku, tym szybciej sonda ATP jest degradowana, co skutkuje szybszym pojawianiem się emisji fluorescencji charakterystycznej dla sulfocyjaniny 3.
- Zaczerpnięte z pracy Hacker et al.¹²² Powielone za zgodą wydawcy (nr licencji 4914840478710)
-

Po potwierdzeniu, że otrzymany analog ATP może być sondą pozwalającą na monitorowanie aktywności UBA1, autorzy wykorzystali go w poszukiwaniu inhibitorów tego enzymu. W tym celu poddali badaniu 1279 związków które wykorzystali jako potencjalne inhibitory reakcji degradacji sondy ATP przez UBA1. Metoda ta pozwoliła im wytypować pięć związków, które obniżały aktywność UBA1 o ponad 90%. Jednym z tych związków był znany wcześniej związek antynowotworowy β -lapachone, który jednak nie był do tej pory znany ze zdolności inhibicji UBA1.

8.4. Podsumowanie rozdziału

Zjawisko przeniesienia energii pomiędzy fluoroforami stanowi bardzo użyteczne narzędzie w badaniu odległości między różnego rodzaju molekułami w mikroskali. Technika ta może być zastosowana, gdy odległości między oddziałującymi fluoroforami nie przekraczają 10 nm (w przypadku ekscymerów – ok. 1 nm). Ponadto efekt FRET wykazuje wiele różnych par fluoroforów. W uproszczeniu, jeżeli widmo emisji fluorescencji donora pokrywa się z widmem wzbudzenia akceptora można zakładać, że efekt FRET wystąpi. Jest to znacząca przewaga w stosunku do fluorescencji ekscymerowej, w której bardzo niewiele cząsteczek jest w stanie stworzyć ekscymer, który byłby użyteczny w badaniach biologicznych i większość literatury sprowadza się właściwie do wykorzystania ekscymerów pirenu. Ponadto do obserwacji zjawiska FRET można wykorzystać niemal dowolne pary fluoroforów, odpowiednio dobrane pod względem zastosowania. Przykładowo wykonując badania w komórkach można dobrać takie fluorofory, by ich widma emisji i wzbudzenia były odsunięte od naturalnej emisji fluorescencji komórek. W przypadku pirenu wzbudzenie następuje w zakresie UV, który może być niszczący dla komórek, natomiast długość fali emisji wynosi mniej niż 500 nm, co może interferować ze wspomnianą fluorescencją komórek.

Z kolei z syntetycznego punktu widzenia otrzymywanie takich sond jak zaproponowane w pracach Acosta *et al.*, czy Hacker *et al.*,^{120, 122} nastrocza pewnych trudności, gdyż wymaga kolejnego przyłączania fluoroforów, co z kolei wymaga stosowania grup ochronnych, przez co syntezy stają się wieloetapowe, a ich ostateczna wydajność może być niska. Jednym ze sposobów uniknięcia takich przeszkód jest zastosowanie bardziej wydajnych reakcji przyłączania. W następnym rozdziale przedstawione zostaną reakcje typu „click”, a w szczególności reakcja CuAAC (*copper catalysed alkyne-azide cycloaddition*). Ich wydajność,

bioortogonalność oraz wysoka tolerancja wobec innych grup funkcyjnych w otoczeniu czyni z nich doskonałe narzędzia w syntezie sond fluorescencyjnych.

9. Reakcje typu „click” w chemii nukleotydów

9.1. Charakterystyka reakcji „click” i reakcja CuAAC

Termin „click chemistry” ukuły został przez profesora K. B. Sharplessa w pracy przeglądowej z 2001 roku.¹²³ W pracy tej charakterystyka reakcji typu „click” sformułowana jest następująco:

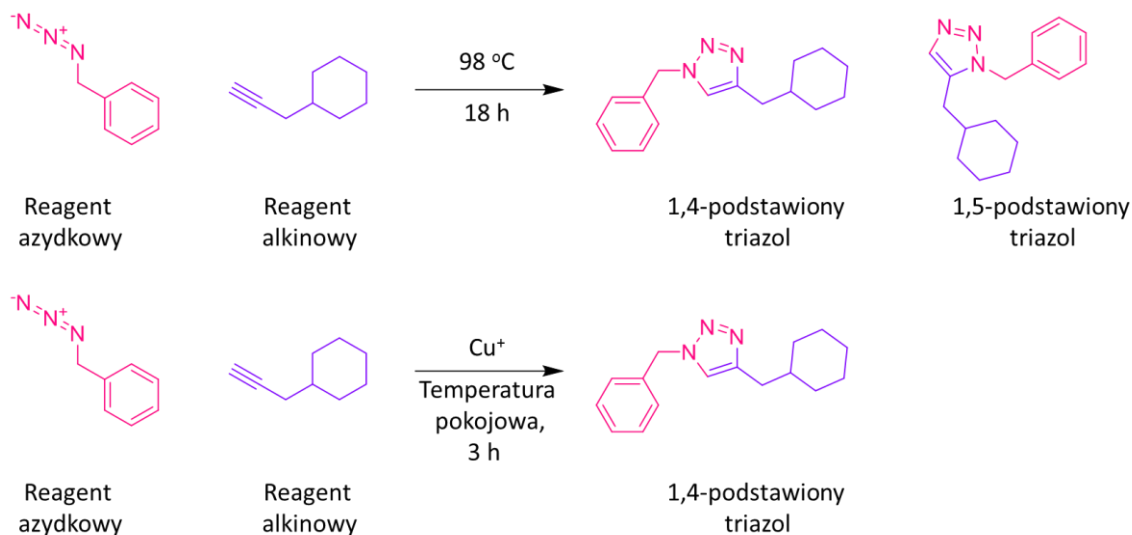
„The reaction must be modular, wide in scope, give very high yields, generate only inoffensive byproducts that can be removed by nonchromatographic methods, and be stereospecific (but not necessarily enantioselective). The required process characteristics include simple reaction conditions (ideally, the process should be insensitive to oxygen and water), readily available starting materials and reagents, the use of no solvent or a solvent that is benign (such as water) or easily removed, and simple product isolation. Purification — if required — must be by nonchromatographic methods, such as crystallization or distillation, and the product must be stable under physiological conditions.”

Do kategorii reakcji „click” zaliczono cztery główne klasy reakcji spełniające te warunki:

- Cykloaddycje nienasyconych związków – w szczególności 1,3-dipolarne cykloaddycje oraz reakcje typu Dielsa-Aldera.
- Addycje nukleofilowe – w szczególności otwarcie naprężonych pierścieni typu epoksyd, azyrydyna, itp.
- Reakcje grupy karbonylowej, w szczególności te, w których produktem jest mocznik, tiomocznik, amid, itp.
- Addycje do wiązania wielokrotnego – w szczególności reakcje, w których powstaje epoksyd, azyrydyna, diol, ale także addycje nukleofila, np. reakcja Michaela.

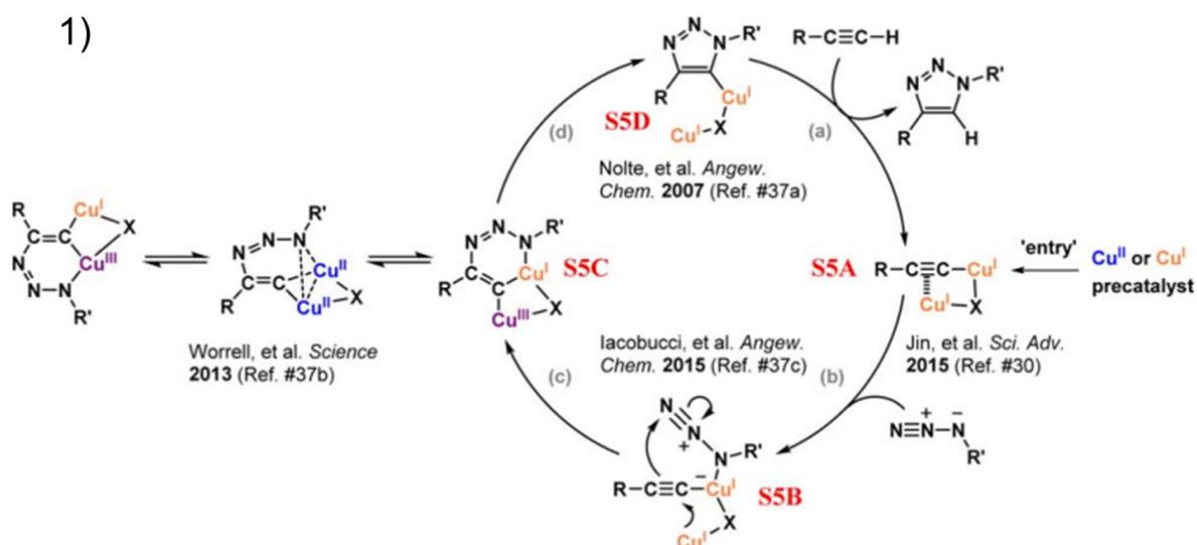
Reakcja, której zostanie poświęcone najwięcej uwagi w niniejszym rozdziale to należąca do pierwszej z wymienionych grup, reakcja CuAAC (*copper catalysed alkyne-azide cycloaddition*), która jest odmianą reakcji Huisgena. Oryginalna reakcja Huisgena polega na reakcji grup alkinowej i azydkowej w podwyższonej temperaturze skutkującej utworzeniem 1,4- oraz 1,5- podstawionych triazoli. Warunki w jakich przebiega klasyczna cykloaddycja Huisgena są dość wymagające, co znacząco ogranicza jej zastosowanie dla dużej liczby związków biologicznie czynnych, które

mogłyby zostać zniszczone po przedłużonej ekspozycji na podwyższoną temperaturę (Rys. 42). Dopiero odkrycie przez Sharplessa i Meldala^{124, 125} że jony miedzi mogą katalizować tę reakcję, czyniąc ją regioselektywną (powstaje jedynie izomer 1,4-podstawiony, Rys. 42, Rys. 43,), sprawiło że reakcja CuAAC zaczęła być bardzo szeroko stosowana w syntezie związków biologicznie czynnych.

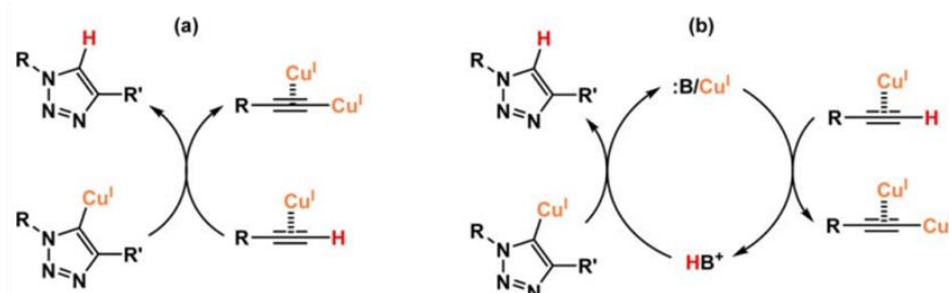


Rys. 42 reakcja cykloaddycji Huisgena oraz reakcja CuAAC.

Dokładna rola jonów miedzi w reakcji CuAAC została podsumowana na schemacie poniżej (Rys. 43). Reakcję rozpoczyna utworzenie kompleksu dwóch jonów miedzi z wiązaniami π oraz σ grupy alkinowej (**S5A**). Następnie do tego adduktu przyłączana jest reszta azydkowa, co skutkuje utworzeniem metalocyklicznego adduktu po utlenieniu jednego z jonów miedzi (z I $\rightarrow$ III st. utl., **S5C**). W ostatnim etapie dochodzi do redukcyjnej kontrakcji pierścienia i utworzenia miedziowej soli triazolidowej. Cykl zostaje zamknięty przez deprotonację kolejnej grupy alkinowej, odłączenie nowopowstałego triazolu i utworzenie kolejnego kompleksu jonów miedzi z kolejną grupą alkinową.¹²⁶



2)



Rys. 43 1) Mechanizm reakcji CuAAC zaprezentowany w pracy Zhu *et al.*¹²⁶

2) Ostatni etap cyklu katalicznego może zostać zrealizowany bezpośrednio (a), bądź za pośrednictwem zasady (b).

Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914840592637)

Reakcja CuAAC pozostawia duże pole manewru w dobieraniu warunków reakcji. Jony miedzi do reakcji można wprowadzić bezpośrednio w postaci soli miedzi (I). Jony miedzi na pierwszym stopniu utlenienia nie są jednak stabilne i łatwo ulegają utlenieniu, co sprawia, że konieczne jest zapewnienie beztlenowej atmosfery reakcji.

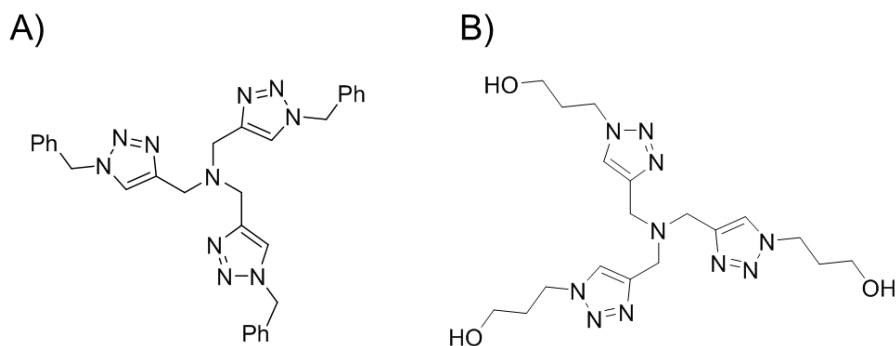
Kolejnym ograniczeniem jest konieczność dodania zasady, która będzie w stanie zdeprotonować grupę alkinową i doprowadzić do rozpoczęcia cyklu katalicznego. Z drugiej jednak strony, nadmiar zasady może skutkować dimeryzacją powstałych produktów.¹²⁷ Niektóre sole miedzi (I) mogą ponadto powodować nieoczekiwane rezultaty, na przykład zastosowanie jodku miedzi (I) może doprowadzić do utworzenia 5-jodo-1,2,3-triazoli¹²⁸ zamiast oczekiwanego produktu. Zaletą soli miedzi (I) jest jednak rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, którą można dobierać według potrzeby, wybierając odpowiednią sól. Przykładowo kompleks trifluorometanosulfonianu miedzi (I) (CuOTf) z benzenem i z dodatkiem 2,6-lutydyny dobrze sprawdza się w rozpuszczalnikach organicznych. Innym interesującym źródłem jonów miedzi (I) jest octan miedzi (I). Jest to polimer $[(CH_3CO_2Cu)_2]_n$, w którym jony Cu^+ znajdują się od siebie w odległości około 0,256 nm.¹²⁹ Dobrze to koresponduje z postulowaną w obliczeniach odległością między jonami miedzi, które tworzą aktywny kompleks w reakcji CuAAC (0,254 – 0,288 nm).¹³⁰ Związek ten okazał się zdolny katalizować reakcję zarówno w rozpuszczalnikach organicznych, jak i w wodzie, dając bardzo wysokie wydajności w bardzo krótkim czasie. Jest to o tyle ciekawe, że odczynnik ten jest wrażliwy na wodę i w jej obecności rozkłada się do tlenku miedzi (I) oraz kwasu octowego.¹³¹

W przypadku roztworów wodnych, bardzo często spotykane w literaturze podejście to zastosowanie soli miedzi (II), a następnie zredukowanie jej *in situ* za pomocą odpowiedniego reduktora. Najpopularniejszym źródłem miedzi (I) tego typu jest para $CuSO_4$ – askorbinian sodu. Askorbinian sodu może pełnić ponadto rolę zasady, która deprotonuje alkin. Dodatkową zaletą tego podejścia jest fakt, że używany zwykle w nadmiarze askorbinian zapobiega utlenieniu jonu miedzi (I).¹³²

Reakcja CuAAC może zostać przyspieszona także przez zastosowanie odpowiednich ligandów wielokleszczowych kompleksujących jon miedzi (I). Zastosowanie takiego kompleksu miedzi (I) pozytywnie wpływa na przebieg reakcji

CuAAC. W kompleksie jon miedzi jest stabilizowany; nie ulega utlenieniu. Ponadto reakcja CuAAC ulega przyspieszeniu przy zastosowaniu kompleksu miedzi (I), w stosunku do szybkości reakcji przeprowadzanej bez tego kompleksu.¹³³ Ponadto w przypadku zastosowania bardziej wrażliwych substratów (np. białka) ligand nie pozwala na zbyt dużą ich ekspozycję wobec jonów miedzi, co zabezpiecza je przed szkodliwym wpływem jonów (np. denaturacja białka powodowana obecnością jonu Cu^+).

Przykładem takiego ligandu jest TBTA.¹³⁴ Pozwala on utrzymać stabilność jonu Cu^+ w rozpuszczalniku organicznym, jednak ze względu na swoje hydrofobowe właściwości (Rys. 44) nie nadaje się on do zastosowania w roztworze wodnym. W literaturze znane są jednak analogiczne ligandy, które kompleksują jon Cu^+ w podobny sposób, ale posiadają dodatkowe grupy hydrofilowe, które zwiększają ich rozpuszczalność w wodzie, np. THPTA (Rys. 44)



Rys. 44 Dwa ligandy kompleksujące jon miedzi (I).
A) hydrofobowy ligand TBTA. B) hydrofilowy ligand THPTA

Reakcję cykloaddycji Huisgena mogą katalizować także inne metale. Szczególnie interesujący jest tutaj przypadek rutenu, który w reakcji RuAAC katalizuje reakcję prowadząc do otrzymania jedynie 1,5-podstawionego triazolu.¹³⁵ Podobnie opracowano warunki AgAAC – reakcji katalizowanej kompleksem srebra, w której powstawał jedynie triazol 1,4-podstawiony.¹³⁶ Mimo tych odkryć, ze względu na swoją prostotę, łatwość manipulacji warunkami, dostępność wymaganych odczynników i wszechstronność ta reakcja katalizowana miedzią pozostaje najczęściej opisywaną reakcją tego typu w literaturze. Następny rozdział zostanie poświęcony zastosowaniu reakcji CuAAC w chemii nukleotydów.

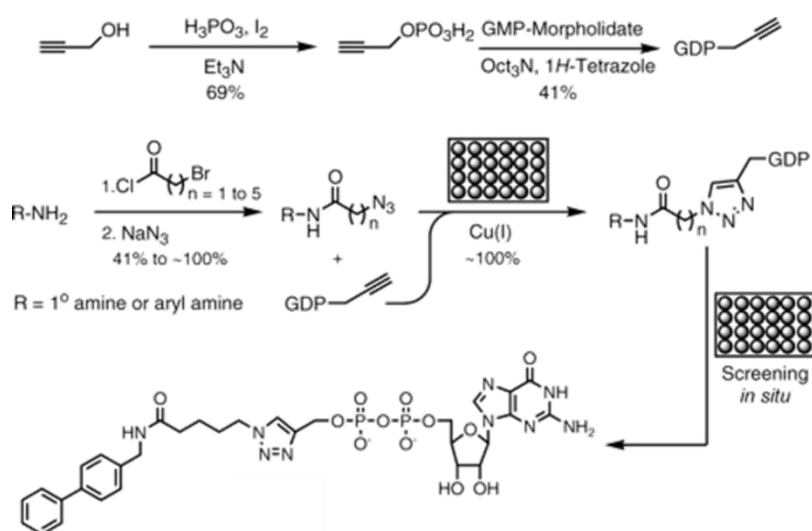
9.2. Reakcja CuAAC w chemii nukleotydów

Z uwagi na łatwość przeprowadzenia reakcja CuAAC zyskała dużą popularność także w chemii nukleotydów. Reagujące ze sobą ugrupowania azydkowe i alkinowe są relatywnie małe, a ich wprowadzenie do struktury cząsteczki związku naturalnego na ogół nie naraża na syntetyczne trudności. Poza tym, są to grupy bioortogonalne – oznacza to, że reagują one wyłącznie ze sobą, nie mając możliwości reakcji z innymi,

powszechnie spotykanymi w przyrodzie grupami funkcyjnymi (aminowe, karboksylowe, karbonylowe, tiolowe, itp.) Ponadto powstający 1,2,3-triazol jest związkiem stabilnym i nietoksycznym.¹³⁷

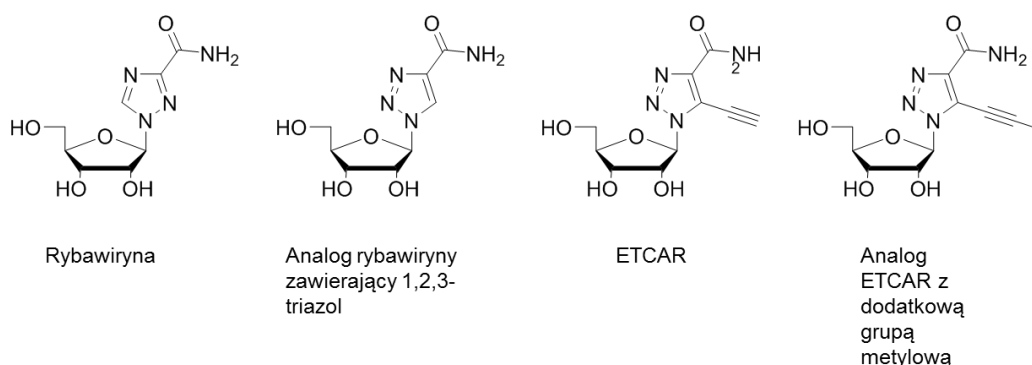
W literaturze można wyróżnić kilka głównych klas zastosowań reakcji CuAAC kwasów nukleinowych i nukleotydów. Jest ona wykorzystywana w syntezie nowych związków biologicznie aktywnych, które mogą pełnić rolę leków.¹³⁸ Ponadto reakcja CuAAC znalazła zastosowanie w przyłączaniu kwasów nukleinowych do podłoży stałych oraz nanomateriałów.^{139, 140} Można też przy jej pomocy połączyć ze sobą krótsze fragmenty kwasów nukleinowych, by uzyskać większą strukturę.¹⁴¹ Znajduje też zastosowanie w syntezie znakowanych nukleozydów, nukleotydów oraz kwasów nukleinowych.^{142, 143}

Łatwość i szybkość przeprowadzania reakcji CuAAC powoduje, że może ona zostać wykorzystana w syntezie bibliotek związków, opartych o wspólny schemat budowy. Przykład takiego podejścia zaprezentowano w pracy Lee *et al.*¹⁴⁴ Fukozylotransferaza jest enzymem syntetyzującym łańcuchy glikoproteinowe oraz glikolipidowe na powierzchni komórek. Związki te mają kluczowe znaczenie dla kontaktu komórek z otoczeniem, odkryto ich znaczenie w procesach fizjologicznych takich jak poruszanie się komórek, embriogeneza, zapłodnienie, ale także w procesach chorobowych – takich jak tworzenie przerzutów.^{145, 146} Jako donora reszty cukrowej enzym ten używa nukleotydocukru – guanozynowego difosforanu fukozy (GDP-Fuc). W cytowanej pracy badacze otrzymali analog GDP zmodyfikowany resztą fosforanu propargilowego w pozycji β . Związek ten został poddany reakcji z 85 różnymi azydami organicznymi, co pozwoliło otrzymać z wysoką wydajnością serię różnych analogów GDP. (Rys. 45) Badanie enzymatyczne z enzymem α -1,3-fukozylotransferazą VI (Fuc-T VI) pozwoliło wyłonić trzy związki, które miały najwyższe powinowactwo wobec enzymu. Dalsze badania powinowactwa pozwoliły wyłonić jeden związek, który okazał się skutecznym i selektywnym inhibitorem Fuc-T VI.



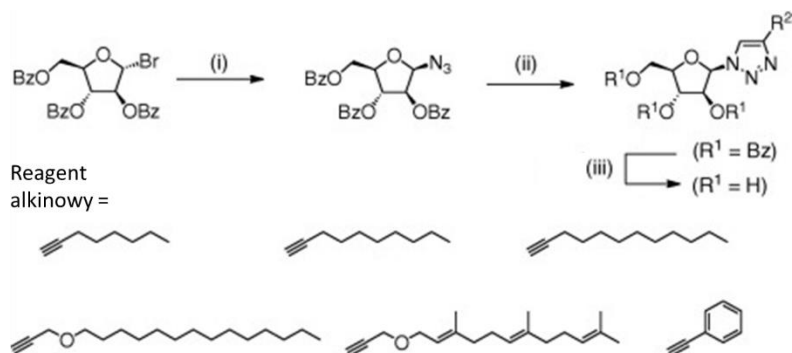
Rys. 45 Synteza biblioteki związków - potencjalnych inhibitorów fukozylotransferazy przy pomocy reakcji CuAAC. Otrzymane związki zostały przebadane pod kątem ich właściwości inhibicyjnych, co

Ugrupowanie triazolowe może także być włączone w strukturę nukleotydu pełniąc rolę analogu zasady, czy reszty fosforanowej kwasu nukleinowego. Przykładem takiego związku może być analog rybawiryny, który zawiera 1,2,3-triazol przyłączony w pozycji 1' rybozy. Związki tego typu mogą wykazywać pewne działanie przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe. Przykładowo wspomniany analog rybawiryny (Rys. 46) w postaci nukleozydu nie przejawia szczególnych właściwości antynowotworowych, ale w postaci 5'-monofosforanu nukleozydu może wykazywać działanie terapeutyczne porównywalne z rybawiryną.^{147, 148} Dużym problemem w zastosowaniu tego rodzaju związków jest cytotoksyczność, która zwykle pojawia się gdy związek jest aktywny biologicznie. Kolejny z opracowanych analogów (ETCAR) nie wykazał aktywności przeciwnowotworowej, wykazał jednak działanie przeciwwirusowe (wirusy FLUAV, FLUBV, PIV-3, RSV), przy jednocześnie zwiększonej cytotoksyczności.^{149, 150} Z kolei modyfikacja polegająca na wprowadzeniu dodatkowej grupy metylowej w pozycji alkinu zmniejszyła jego cytotoksyczność, ale przy jednoczesnym zmniejszeniu aktywności przeciwwirusowej.



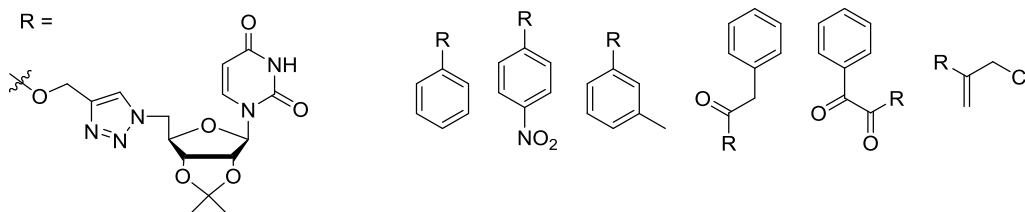
Rys. 46 Nukleozydy zawierające resztę 1,2,3-triazolu w miejscu zasady azotowej

Analogi takie znajdują zastosowanie nie tylko w walce z komórkami nowotworowymi czy wirusami, ale także mogą wykazywać aktywność przeciwbakteryjną. W pracy Wilkinson *et al.*¹⁵¹ zaprezentowano syntezę serii analogów zawierających podstawiony 1,2,3-triazol w pozycji 1'-rybozy jako potencjalnych inhibitorów *Mycobacterium bovis*. (Rys. 47) Otrzymane związki wykazywały umiarkowaną aktywność przeciwko tej bakterii, jednak okazały się selektywne wobec niej, gdyż w równolegle przeprowadzonej kontroli nie wykazały one żadnego działania przeciw bakteriom *E. coli*.



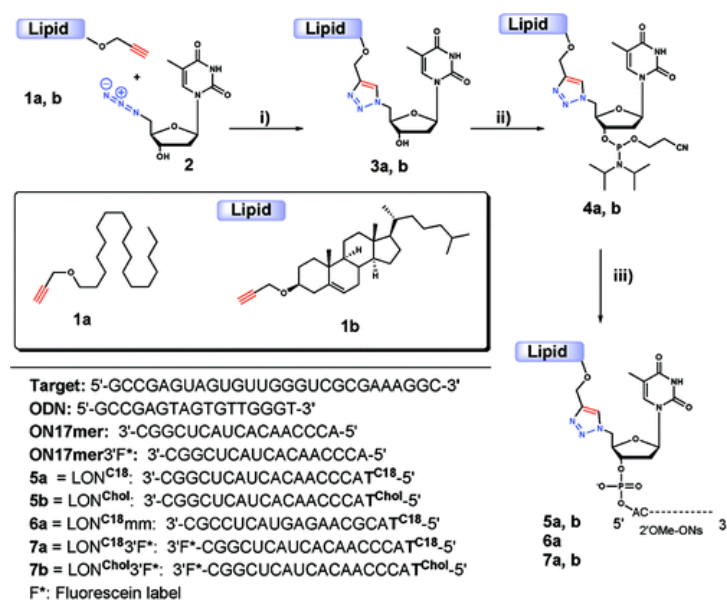
Rys. 47 Syntez analogów nukleozydów o potencjalnej aktywności antybakteryjnej. (i) – NaN_3 , $\text{Bu}_4\text{NH}_3\text{SO}_3$, 1/1 DCM/ $\text{NaHCO}_3(\text{sat.})$, (ii) – reagent alkinowy, CuI , DIPEA , 110°C , (iii) – NaOCH_3 , MeOH/THF . Schemat z pracy Wilkinson *et al.* ¹⁵¹

Grupa triazolowa może również pełnić rolę analogu reszty fosforanowej. Związki tego typu mogą wykazywać działanie jako analogi pojedynczych nukleotydów, lub też być włączane w strukturę kwasu nukleinowego. W przypadku mononukleotydów zawierających triazol w pozycji 5' można wyróżnić nukleozyd urydynowy wykazujący aktywność przeciwgrzybiczą. (Rys. 48) Związek ten jest analogiem urydynowego difosforanu N-acetyloglukozaminy, który jest naturalnym substratem syntazy chitynowej w syntezie chityny, będącej składnikiem ścian komórkowych grzybów. Ponieważ chitynowe ściany komórkowe są cechą charakterystyczną dla grzybów, nie posiadają jej ani rośliny, ani zwierzęta, to związek taki może być ekologicznym sposobem na niszczenie grzybów zagrażających uprawom roślin. ¹⁵²



Rys. 48 Analog nukleozydu o działaniu przeciwgrzybiczym. Ilustracja na podstawie pracy Chaudhary *et al.* ¹⁵²

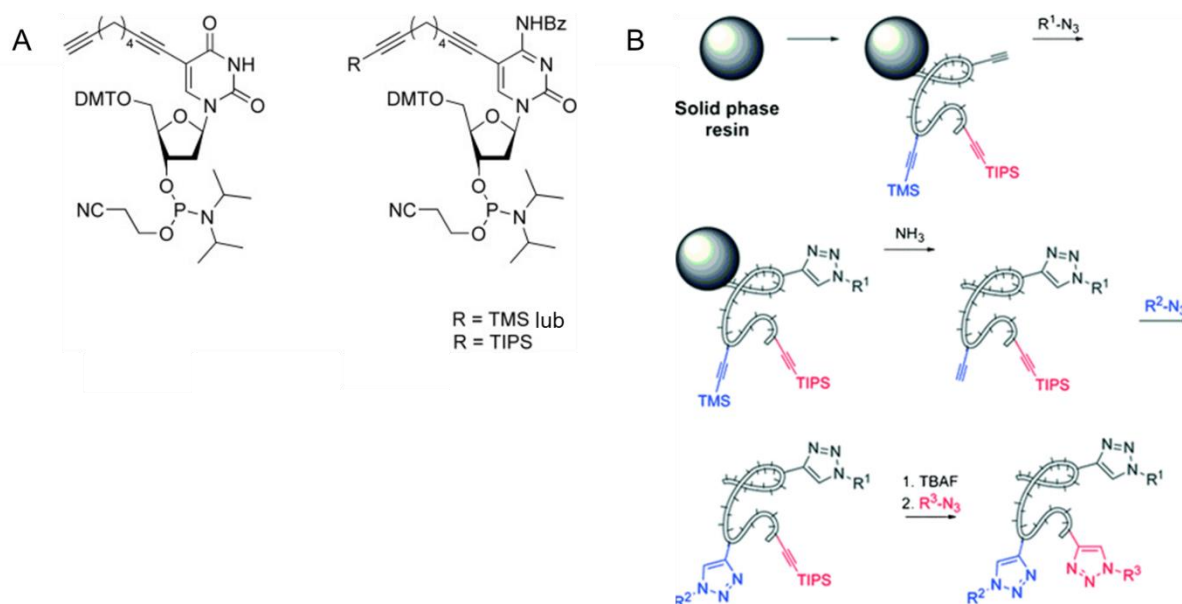
W przypadku kwasów nukleinowych grupa triazolowa może pełnić rolę analogu reszty fosforanowej, który jest dodatkowo łącznikiem z inną biologicznie aktywną cząsteczką. Przykładowo w pracy Godeau ¹⁵³ wykorzystano 5'-azydotymidynę do otrzymania serii adduktów z różnymi cząsteczkami lipidowymi. Następnie tak zmodyfikowane nukleozydy zostały włączone do łańcucha oligonukleotydowego. Cząsteczki lipidów były w stanie przeniesić kwas nukleinowy przez błonę komórkową komórek z linii Huh7 zainfekowanych wirusem HCV, a następnie powstrzymać namnażanie się wirusa.



Rys. 49 Synteza kwasu nukleinowego związanego z cząsteczką lipidu za pomocą grupy triazolowej. Zaczerpnięto z pracy Godeau ¹⁵³ Copyright © 2008 American Chemical Society

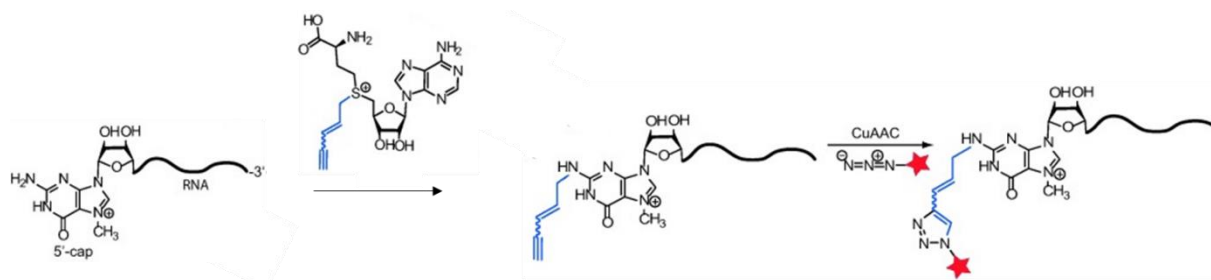
Reakcja CuAAC znalazła zastosowanie do syntezy koniugatów nukleotydów i kwasów nukleinowych z różnego rodzaju znacznikami. Zwykle nukleozyd zawierający ugrupowanie azydkowe/alkinowe wprowadza się do kwasu nukleinowego, a reakcja CuAAC przeprowadzona jest z udziałem całej cząsteczki oligonukleotydu,¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Możliwe jest też odmienne podejście i zmiana kolejności etapów, np. grupy funkcyjne reaktywne w CuAAC wprowadza się do cząsteczki oligonukleotydu, a następnie przeprowadza CuAAC.¹⁵⁷

Pierwsze podejście zostało zaprezentowane w pracy Gramlich *et al.*¹⁵⁸ Badacze otrzymali w tej pracy trzy analogi amidofosforynów nukleozydów: analog urydynowy zawierający grupę alkinową, oraz dwa analogi cytydynowe, z których każdy zawierał ugrupowanie alkinowe, jednak zabezpieczone na dwa różne sposoby grupami TMS oraz TIPS. (Rys. 50 A) Wszystkie trzy analogi zostały włączone do łańcucha DNA z wysokimi wydajnościami z wykorzystaniem syntezy oligonukleotydów w fazie stałej. Tak zmodyfikowane cząsteczki DNA zostały poddane sekwencyjnej reakcji CuAAC; w pierwszej reakcji brał udział analog urydynowy – jedyny posiadający reaktywną grupę alkinową. Oligonukleotyd potraktowano roztworem amoniaku, co doprowadziło do odcięcia oligonukleotydu od złoza, a jednocześnie nastąpiło usunięcie grup TMS z funkcji alkinowych, co umożliwiło ich reakcję CuAAC. Po tej reakcji produkt oczyszczono używając HPLC i potraktowano roztworem TBAF. Spowodowało to usunięcie ostatniej grupy zabezpieczającej (TIPS) i umożliwiło ostatnią reakcję CuAAC z kolejnym reagentem azydkowymi. (Rys. 50 B)



Rys. 50 A) Analogi nukleozydów wykorzystane w syntezie DNA zdolnego do wielokrotnej reakcji CuAAC. B) schemat wielokrotnej reakcji CuAAC. Zaczepnięto z pracy Gramlich *et al.*¹⁵⁸ Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914840835150)

Odmienne podejście zastosowano w pracy Schulz *et al.*¹⁵⁷ Wykorzystano tutaj naturalnie występujący proces biologiczny, jakim jest metylacja końca 5' mRNA kapu dokonywana przez metylotransferazę mRNA.¹⁵⁹ Główną ideą było wykorzystanie tego enzymu do wprowadzenia na końcu 5' mRNA grupy reaktywnej w CuAAC. W tym celu naukowcy otrzymali specjalnie zmodyfikowany analog S-adenozylometioniny – związku, który jest naturalnym donorem grupy metylowej w komórkach.¹⁶⁰ W tym przypadku grupę metylową zamieniono na linker zawierający funkcję alkinową. Reakcja przeniesienia linkera na koniec 5' mRNA była katalizowana przez metylotransferazę Glatg2. Nowowprowadzona grupa alkinowa umożliwiła wyznakowanie tak zmodyfikowanego mRNA poprzez przeprowadzenie reakcji CuAAC z azydową pochodną barwnika Eterneon.



Rys. 51 Schemat wprowadzania grupy funkcyjnej reaktywnej w reakcji CuAAC za pomocą reakcji enzymatycznej z następczą reakcją CuAAC z barwnikiem fluorescencyjnym. Zaadaptowano z pracy Schulz *et al.*¹⁵⁷ Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914840957347)

9.3. Podsumowanie rozdziału

Od czasu odkrycia w roku 2002 przez zespoły Sharplessa i Meldala reakcja CuAAC zyskała ogromną popularność wśród chemików. Łatwość jej przeprowadzenia, proste

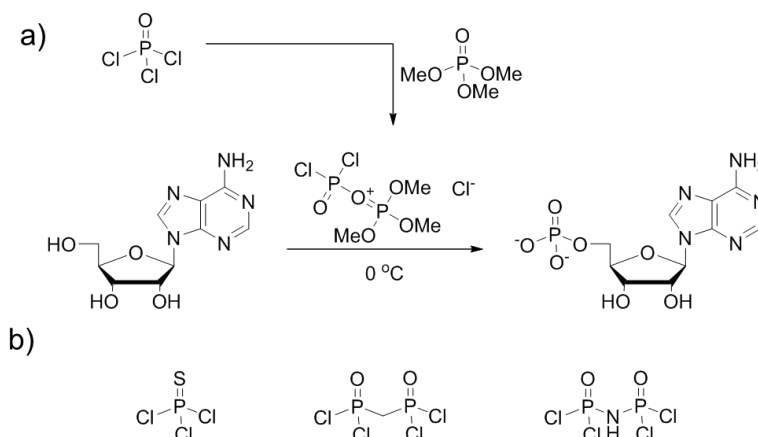
substraty, selektywność i wysokie wydajności sprawiają, że znalazła ona zastosowanie w niemal wszystkich polach syntezy chemicznej – od chemii materiałów, przez syntezę polimerów, nanotechnologię, chemię leków, aż na otrzymywaniu narzędzi dla biologii molekularnej kończąc. Reakcja CuAAC znalazła też zastosowanie w chemii nukleotydów, a w literaturze można znaleźć pełne spektrum jej zastosowań – zarówno w syntezie nukleozydów, nukleotydów czy całych długich cząsteczek kwasów nukleinowych. Powstające w wyniku reakcji CuAAC addukty DNA i RNA znajdują zastosowanie jako leki, w syntezie biokoniuugatów, czy nanotechnologii. Jednak reakcja CuAAC to tylko jedno z narzędzi, jakie jest konieczne do opanowania w syntezie modyfikowanych nukleotydów. W następnym rozdziale zostaną przedstawione inne metody chemicznej modyfikacji nukleotydów, które mają duże znaczenie z punktu widzenia niniejszej pracy.

10. Metody chemiczne stosowane w syntezie znakowanych nukleotydów

10.1. Fosforylacja Yoshikawy

Najbardziej podstawowe, wchodzące w skład DNA/RNA 5'-fosforany nukleozydów (A, T, G, C, U) produkowane są na masową skalę i dostępne handlowo w relatywnie niskich cenach. Dotyczy to mono-, di- oraz trifosforanów tych nukleozydów. Istnieją jednak nukleotydy zawierające modyfikacje w reszcie rybozy, czy w obrębie zasady azotowej, które nie są dostępne handlowo. W tym przypadku konieczne jest rozpoczęcie syntezy od otrzymania właściwego nukleozydu, a następnie przeprowadzenie go w formę ufosforylowaną. W przypadku fosforylacji pozycji 5'-O nukleozydu najlepiej sprawdza się reakcja opracowana przez Yoshikawę.¹⁶¹ W reakcji tej nukleozyd zawieszany jest w fosforanie trimetylu, a mieszanina schładzana jest do temperatury 0 °C. Następnie do reakcji dodawany jest chlorek fosforylu. Fosforylacja Yoshikawy jest reakcją bardzo selektywną, w jej przebiegu powstaje właściwie jedynie 5'-O fosforylowany nukleozyd. Jest to spowodowane tworzeniem się adduktu pomiędzy rozpuszczalnikiem, a cząsteczką POCl₃. (Rys. 52 a) Powstający elektrofili ma dużą zawadę steryczną, przez co preferencyjnie reaguje on z najbardziej odsłoniętą, pierwszorzędową grupą hydroksylową nukleozydu, która znajduje się w pozycji 5'.

Oprócz standardowej fosforylacji Yoshikawy, w której wykorzystywany jest chlorek fosforylu znane są też jej modyfikacje, w której wykorzystywane są innego rodzaju odczynniki fosforylujące – chlorek tiofosforylu,¹⁶² chlorek metylobisfosfonianowy,¹⁶³ czy chlorek imidobisfosfonianowy.¹⁶⁴ (Rys. 52 b) W ten sposób można otrzymać także modyfikowane nukleotydy – odpowiednio 5'-tiofosforany nukleozydów, 5'-bisfosfoniany nukleozydów czy 5'-imidofosforany nukleozydów.



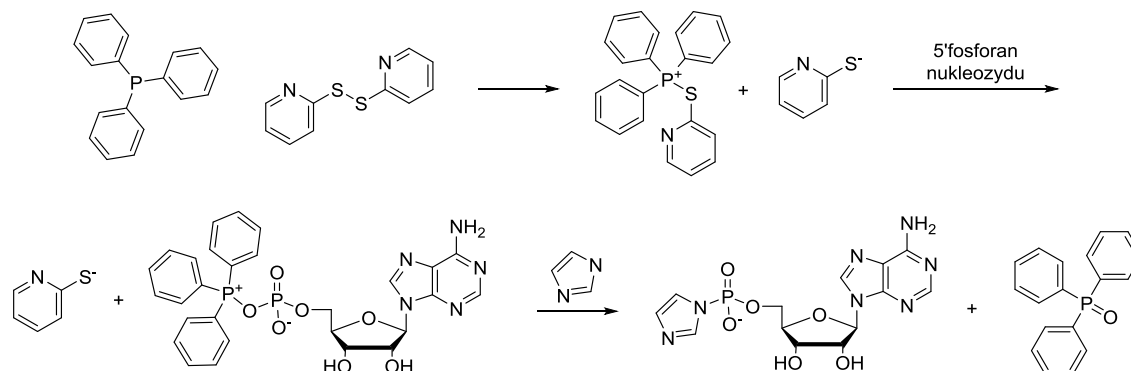
Rys. 52 a) schemat reakcji fosforylacji Yoshikawy
b) różne odczynniki fosforylujące, które mogą zostać użyte w zmodyfikowanej reakcji Yoshikawy

10.2. Reakcja aktywacji fosforanów nukleozydów

Reszty fosforanowe nukleotydów nie zawierają grupy opuszczającej, co sprawia że atomy fosforu wchodzące w ich skład są bardzo słabymi elektrofili. Aby możliwa była jakakolwiek reakcja wykorzystująca tę pozycję jako centrum elektrofilowe, należy zaktywować resztę fosforanową przez zamianę jednego z atomów tlenu na dobrą grupę opuszczającą. W literaturze znanych jest wiele tego typu metod, które wykorzystują różne grupy opuszczające. Do modyfikacji takich zaliczyć można modyfikację morfolinową,¹⁶⁵ chlorek fosforylu nukleozydu,¹⁶⁶ czy *P*-imidazolidy nukleotydów.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Modyfikacja morfolinowa wprowadzana jest z użyciem odczynnika aktywującego resztę fosforanową (DCC, *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid). Reakcja ta może generować produkty uboczne, a powstałe aktywne pochodne nukleotydów nie dają zadowalających wydajności w reakcjach sprzęgania. Z kolei użycie chlorku kwasowego nukleozydu ograniczone jest właściwie jedynie do reakcji następcej po reakcji fosforylacji. Wtedy zamiast etapu hydrolizy, wprowadza się odpowiedni nukleofil, który reaguje z chlorkiem fosforylu nukleozydu. Podejście takie zastosowano między innymi w syntezie ATP lub jego analogów.^{166, 170} Ostatnia z wymienionych modyfikacji jest najciekawsza z punktu widzenia niniejszej pracy – powstałe *P*-imidazolidy nukleotydów są trwałe i można je przechowywać w postaci soli litowej, bądź sodowej przez długi okres czasu. Reakcja przyłączenia imidazolu przebiega z bardzo wysoką wydajnością, a powstający produkt jest dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach takich jak DMF czy DMSO.

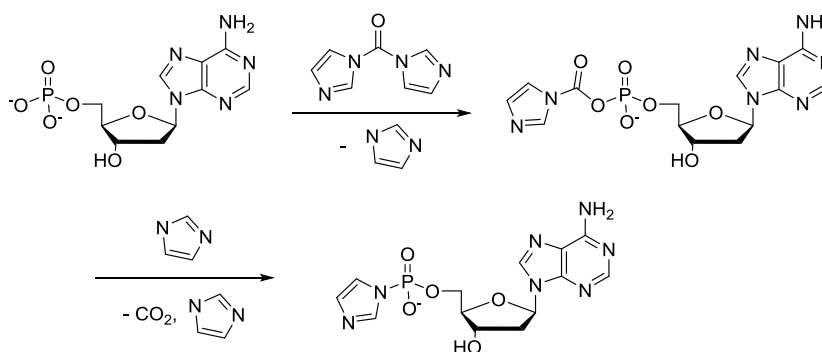
W przypadku reakcji Mukaiyamy i Hashimoto¹⁶⁷ aktywacja nukleotydu rozpoczyna się przez atak trifenylofosfiny na atom siarki 2,2'-ditiopirydyny. Powstały addukt jest następnie atakowany przez grupę fosforanową nukleotydu, co doprowadza do utworzenia aktywnego centrum elektrofilowego, które jest atakowane przez obecną w środowisku reakcji cząsteczkę imidazolu. (Rys. 53) Jednocześnie w tym etapie reakcji tworzy się bardzo trwały termodynamicznie tlenek trifenylofosfiny, co jest siłą

napędową tej reakcji, a jednocześnie powodem, dla którego zachodzi ona z tak wysoką wydajnością.



Rys. 53 Schemat reakcji tworzenia *P*-imidazolidu nukleotydu

Drugą metodą utworzenia *P*-imidazolidu nukleotydu jest opracowana przez Hoarda¹⁶⁸ reakcja z 1,1'-karbonylodiimidazolem (CDI). Rozpoczyna się ona od ataku grupy fosforanowej na karbonylowy atom węgla CDI, co prowadzi do utworzenia aktywnego mieszanego bezwodnika karbaminowo-fosforanowego. Utworzone w ten sposób centrum elektrofilowe na atomie fosforu jest atakowane przez uwolnioną z CDI cząsteczkę imidazolu. Skutkuje to utworzeniem oczekiwanego *P*-imidazolidu z jednoczesnym rozkładem odchodzącego kwasu karbamoiloimidazolowego na imidazol i dwutlenek węgla. W przypadku rybonukleotydów dochodzi do pobocznej reakcji utworzenia 2',3'-węglanu rybozy, który jednak może zostać usunięty przez hydrolizę zasadową.

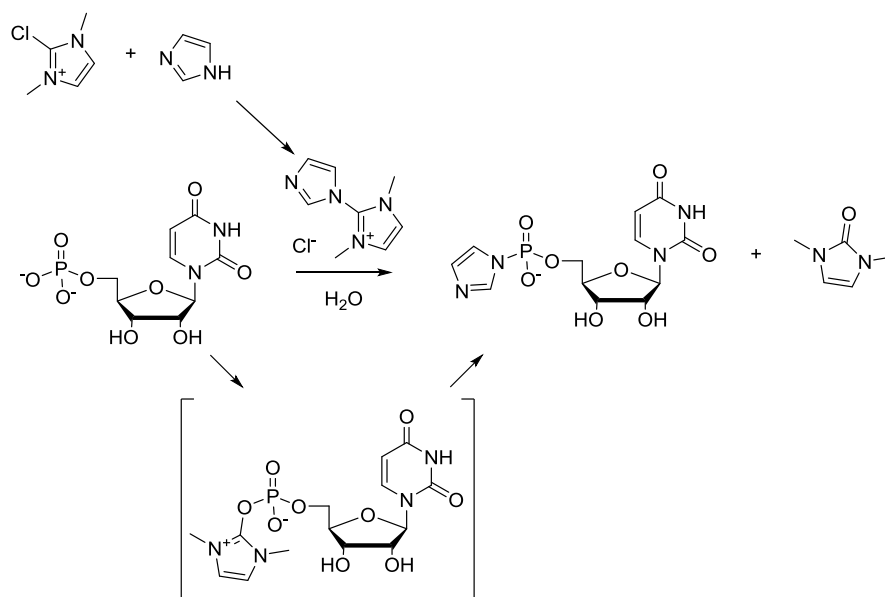


Rys. 54 Metoda syntezy *P*-imidazolidu deoksyrybonukleotydu z wykorzystaniem karbonylodiimidazolu

Ostatnia z prezentowanych tutaj metod otrzymywania *P*-imidazolidów nukleotydów różni się od poprzednich ze względu na środowisko reakcji. W przeciwieństwie do metod Mukaiyamy i Hashimoto czy Hoarda i Otta, które wymagały zastosowania polarnego rozpuszczalnika aprotycznego (DMF, DMSO), reakcja Tanaki¹⁶⁹ może zostać przeprowadzona w wodzie. Jest to bardzo duża zaleta, gdyż na ogół sole nukleotydów są trudno rozpuszczalne w innych rozpuszczalnikach niż woda, co zmusza chemików do poszukiwania obejścia tego problemu. Dokonuje się tego na przykład otrzymując rozpuszczalne w tych rozpuszczalnikach sole trialkiloamoniowe nukleotydów. Jest to jednak rozwiązanie uciążliwe, gdyż jedyny sposób wymiany

powszechnie dostępnej handlowo soli sodowej na sól trialkiloamoniową nukleotydu to zastosowanie złoza jonowymennego. Metoda aktywacji, która działa w warunkach wodnych i może być zastosowana wobec soli sodowych nukleotydów jest bardzo interesującym uzupełnieniem metod dostępnych do tej pory.

W metodzie Tanaki odczynnikiem wprowadzającym ugrupowanie imidazolowe do reszty fosforanu jest chlorek 2-chloro-1,3-dimetyloimidazoliowy. Reaguje on z imidazolem, który jest następnie atakowany przez resztę fosforanu nukleotydu. Powstaje aktywny związek przejściowy, w którym atom fosforu pełni rolę centrum elektrofilowego, na które przebiega atak cząsteczki imidazolu skutkujący uzyskaniem pożądanego *P*-imidazolidu. (Rys. 55) Użyteczność tej metody potwierdzono w pracy Tanaki otrzymując nukleotydocykry z wydajnością 41–59%.

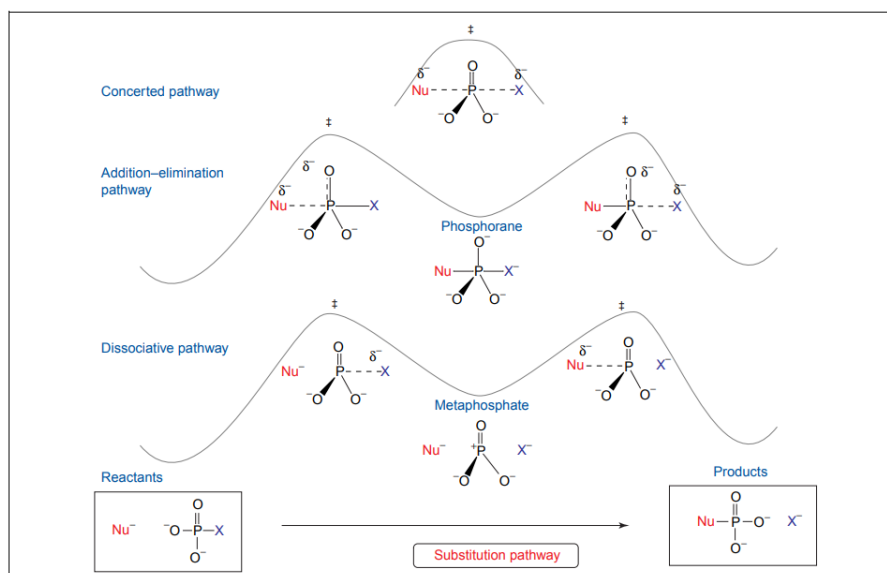


Rys. 55 Metoda tworzenia *P*-imidazolidu nukleotydu w wodzie. Wg Tanaka *et al.*¹⁶⁹

10.3. Reakcje aktywowanych nukleotydów z różnymi nukleofilami

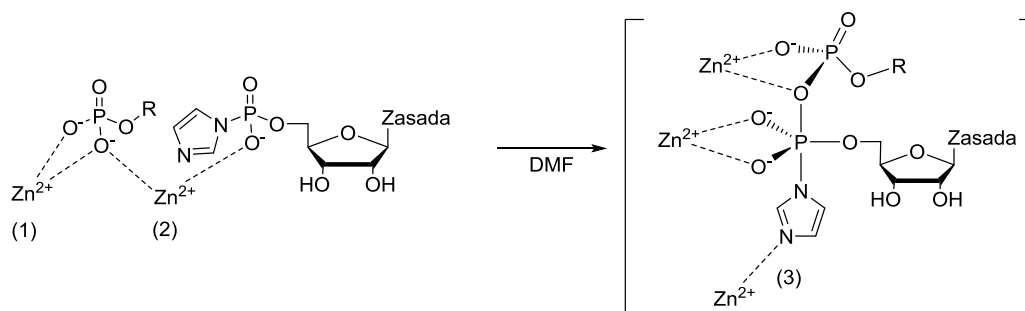
Atom fosforu w zaktywowanej reszcie fosforanowej staje się centrum elektrofilowym, które może reagować z różnymi nukleofilami. W kontekście syntezy nowych analogów nukleotydów najistotniejsza jest reakcja, w której nukleofilem jest inne ugrupowanie fosforanowe. Prowadzi ona do wydłużenia łańcucha fosforanowego poprzez utworzenie wiązania pirofosforanowego. Dokładny mechanizm tworzenia tego wiązania nie jest znany. W pracy przeglądowej Allena¹⁷¹ postulowane są trzy możliwe mechanizmy – mechanizm uzgodniony, mechanizm addycji-eliminacji, oraz mechanizm dysocjacyjny. (Rys. 56) Różnią się one kolejnością tworzenia i zrywania wiązań między atomem fosforu, nukleofilem i grupą opuszczającą. Różny jest także profil energetyczny każdego typu reakcji. Mechanizm uzgodniony jest najprostszy i bardzo przypomina mechanizm typowej substytucji nukleofilowej S_N2 . Występuje tutaj stan przejściowy z atomem fosforu związanym zarówno z grupą opuszczającą jak i nukleofilem. W miarę postępu reakcji wiązanie z nukleofilem wzmacnia się, a elektrony

z wiązania z grupą opuszczającą stopniowo lokalizują się na jej powierzchni. Ostatecznie dochodzi do utworzenia wiązania atomu fosforu z nukleofilem i zerwania wiązania z grupą opuszczającą. (Rys. 56 *concerted pathway*) W dwóch pozostałych mechanizmach dochodzi do utworzenia produktu pośredniego. W mechanizmie addycji-eliminacji najpierw dochodzi do addycji nukleofila do atomu fosforu, a następnie nietrwały pięciowiązalny produkt przejściowy rozpada się z odejściem grupy opuszczającej. (Rys. 56 *addition-elimination pathway*) W mechanizmie dysocjacyjnym najpierw dochodzi do spontanicznego odejścia grupy opuszczającej, a dopiero w drugiej kolejności następuje atak nukleofila na atom fosforu. (Rys. 56 *dissociative pathway*). W obliczeniach zostało wykazane, że dla monoestrów kwasu fosforowego preferencyjne są drugi i trzeci z zaproponowanych mechanizmów, a to, jak ostatecznie przebiegnie reakcja w danym przypadku zależy od właściwości grupy opuszczającej. Im jest ona lepszą grupą opuszczającą, tym większą preferencję wykazuje w kierunku mechanizmu dysocjacyjnego.¹⁷²



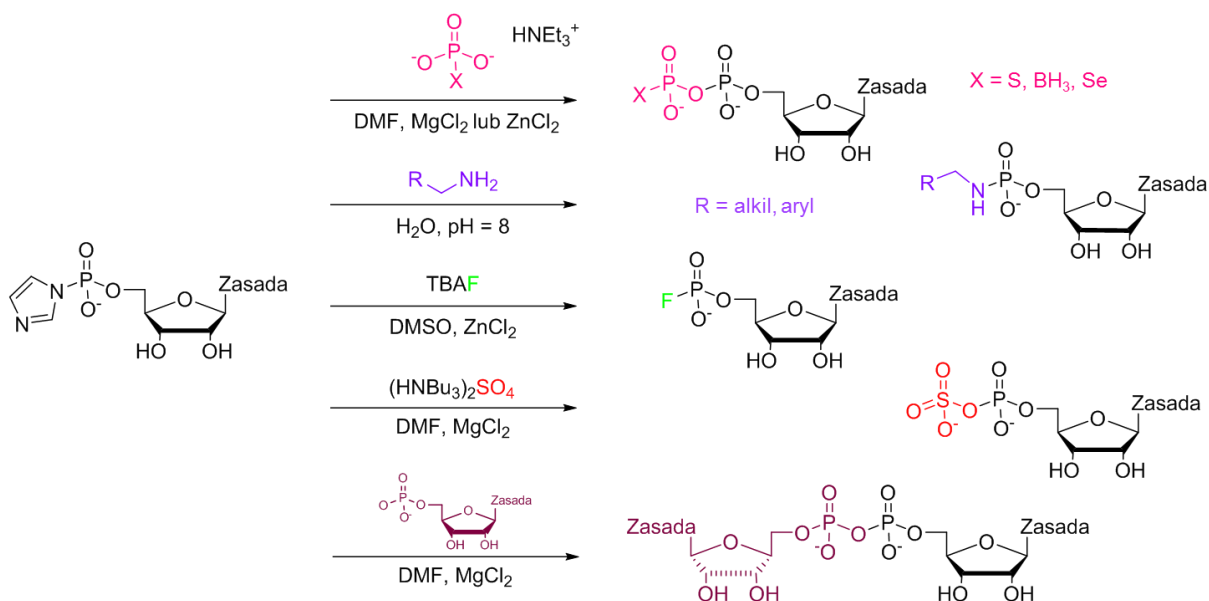
Rys. 56 Postulowane mechanizmy reakcji substytucji w obrębie reszty fosforanowej.
Zaczerpnięte z pracy Allena¹⁷¹ Powielone za zgodą wydawcy (nr licencji 4914841051327)

Powyższy opis jest prawdziwy dla zaktywowanej reszty fosforanowej reagującej z nukleofilem nieposiadającym ładunku. W przypadku zastosowania na przykład fosforanu jako nukleofila, reakcja nie zajdzie. Dzieje się tak, gdyż nawet zaktywowana reszta fosforanowa posiada ujemnie naładowany atom tlenu. Ładunek ten zapobiega zbliżeniu jakiegokolwiek nukleofila, który także niósłby ładunek ujemny. Problem ten rozwiązuje się stosując chlorki metali dwuwartościowych – manganu, cynku, bądź magnezu.¹⁷³ Ich działanie jest wielotorowe. Dwuwartościowy jon metalu neutralizuje ładunki ujemne obydwu reagujących reszt fosforanowych, umożliwiając ich zbliżenie. Skompleksowane jonami metalu nukleotydy są lepiej rozpuszczalne w rozpuszczalnikach aprotycznych (DMF, DMSO). Ponadto jony metalu kompleksują atom azotu w reszcie imidazolu powodując przesunięcie gęstości elektronowej z wiązania P–N co dodatkowo je osłabia i zwiększa właściwości elektrofilowe reszty fosforanowej. (Rys. 57)



Rys. 57 Postulowane działanie jonów metalu na przebieg reakcji tworzenia wiązania bezwodnikowego. Wyróżnić można kompleksowanie reszt fosforanowych (1), które zwiększa rozpuszczalność reagentów, jednocześnie maskując ładunki ujemne, co umożliwia zbliżenie się reszt fosforanowych do siebie (2). Działanie jonów cynku powoduje też osłabienie wiązania P–N (3), co sprzyja odejściu grupy opuszczającej (imidazolu)

Nukleofilem w reakcji z *P*-imidazolidem nukleotydu nie musi być jedynie inna anion fosforanowy. Znane są reakcje podstawienia grupy imidazolowej przez analogi fosforanów¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ (w tym nukleotydy¹⁷⁷), aminy,¹⁷⁸ czy jony nieorganiczne (fluorek, siarczan).^{179, 180} Zwykle reakcje te są przeprowadzane w rozpuszczalniku aprotycznym (DMF, DMSO) i w przypadku nukleofili anionowych muszą być katalizowane solami metali, tak jak w przypadku przyłączania pojedynczej reszty fosforanowej. Wyjątkiem jest reakcja podstawienia reszty imidazolu aminą monoalkilową. Ze względu na brak ładunku ujemnego obecnego na atomie azotu, reakcja ta przebiega bez konieczności stosowania katalizatora i może zostać przeprowadzona nawet w wodzie.

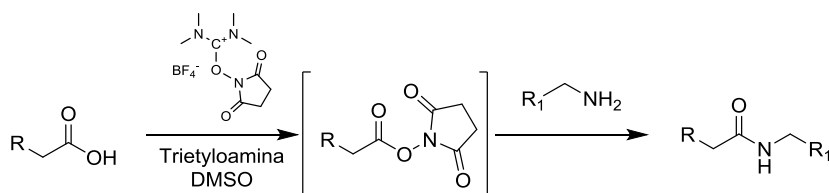


Rys. 58 Potencjał zastosowania *P*-imidazolidów nukleotydu w reakcjach z różnymi nukleofilami

10.4. Synteza i właściwości estrów NHS

Strategia syntezy aktywnych estrów NHS (*N*-Hydroxysuccinimide) to aktywacja kwasów karboksylowych, które następnie poddawane reakcji z aminami dają odpowiednie amidy. Reakcja ta jest bardzo przydatna i znalazła zastosowanie w wielu

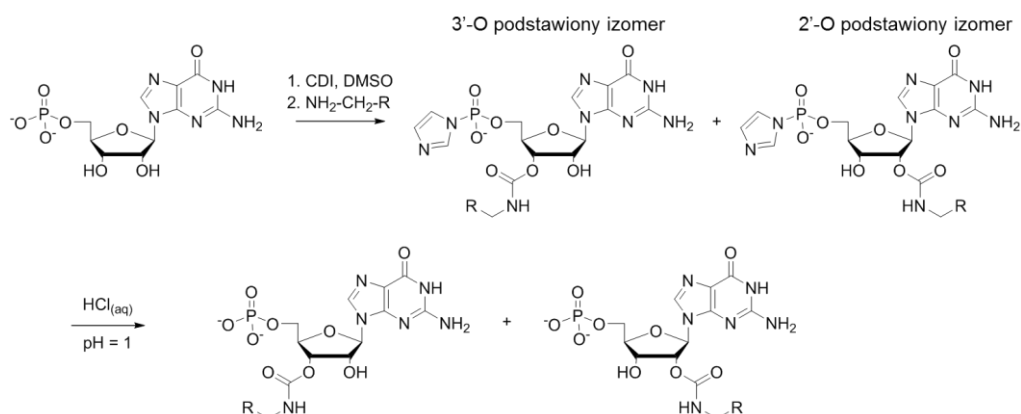
różnych dziedzinach chemii, między innymi w funkcjonalizacji barwników fluorescencyjnych¹⁸¹, osadzaniu biomolekuł na podłożach stałych,¹⁸² funkcjonalizacji nanomateriałów,¹⁸³ czy też w wizualizacji makrocząsteczek biologicznych.¹⁸⁴ W 1989 roku Knorr zaproponował użycie TSTU (tetrafluoroboran *N,N,N',N'*-Tetrametylo-*O*-(*N*-sukcynimidylo)mocznika) jako odczynnika do syntezy estrów aktywnych.¹⁸⁵ Reakcję z tym odczynnikiem przeprowadza się w DMF lub DMSO, uprzednio deprotonując kwas karboksylowy za pomocą zasady (np. trietyloaminy). Wydajności obserwowane przy zastosowaniu tej strategii wynoszą 51-89%.¹⁸⁵ Estry te mogą bezpośrednio zostać przemienione w amidy w reakcji z odpowiednimi aminami.



Rys. 59 Schemat reakcji aktywacji kwasu karboksylowego z bezpośrednim podstawieniem aminy

10.5. Funkcjonalizacja rybozy w pozycji 2'-O oraz 3'-O

Wspomniana w rozdziale 10.2 reakcja nukleotydu z 1,1'-karbonyloimidazolem (CDI) została przedstawiona jako metoda aktywacji fosforanów deoksyrybonukleozydów. W przypadku rybonukleotydów reakcja ta skutkowałą nie tylko *P*-aktywacją reszty fosforanowej, ale też utworzeniem 2',3'-węglanu rybozy. Wspomniano już, że grupa ta może zostać usunięta w środowisku zasadowym. Może też posłużyć w reakcji wprowadzenia nowego linkera, który umożliwi przyłączenie funkcjonalnej cząsteczki – na przykład znacznika fluorescencyjnego. Metoda ta została opisana m.in. w pracy Warminski *et al.*¹⁸⁶ Po zastosowaniu CDI wobec nukleotydu, jego nadmiar jest hydrolizowany, a produkt pośredni poddawany jest działaniu odpowiedniej aminy pierwszorzędowej w obecności silnej zasady (DBU). Z uwagi na możliwość reakcji aminy z *P*-imidazolidem nukleotydu, możliwe jest uzyskanie mieszaniny *P*-imidazolidu oczekiwanego nukleotydu z jego amidofosforanowym analogiem. Aby uzyskać czysty nukleotyd możliwa jest hydroliza kwasowa obydwu tych form nukleotydu w pH = 1. Cechą tej metody jest powstawanie w nierównych proporcjach izomerów zawierających ugrupowanie karbaminianowe w 2' lub 3' pozycji rybozy w proporcji 1:1 – 1:2 w zależności od nukleotydu.



Rys. 60 Schemat reakcji wprowadzania linkera przyłączonego za pośrednictwem grupy karbaminianowej. Na podstawie pracy Warminski *et al.*¹⁸⁶

11. Enzymy hydrolizujące nukleotydy zawierające zasadę adeninową

W niniejszej pracy przy badaniu właściwości sond nukleotydowych posłużono się dwoma enzymami – fosfodiesterazą I z jadu grzechotnika diamentowego (*C.adamanteus*) oraz białkami FHIT – roślinnym (*A. thaliana*) i ludzkim.

11.1. Fosfodiesteraza I pochodząca z jadu grzechotnika diamentowego (EC 3.1.4.1)

Fosfodiesteraza PDE-I (określana też skrótem SVPDE *snake venom phosphodiesterase*) jest enzymem degradującym łańcuchy oligonukleotydowe poprzez rozszczepienie wiązania pomiędzy atomem tlenu 3'-O nukleotydu, a resztą fosforanu następnego nukleotydu. W przypadku pojedynczych nukleotydów oraz ich analogów wykazuje on aktywność fosforylacji degradującej wiązanie bezwodnikowe pomiędzy resztami fosforanowymi α i β .¹⁸⁷ Enzym ten jest niespecyficzny, hydrolizuje nukleotydy niezależnie od obecnej w nich zasady azotowej. PDE-I rozpoznaje substrat po obecności reszty 5'-fosforanowej oraz obecności grupy hydroksylowej w pozycji 3'. Brak tej grupy powoduje znaczące trudności rozpoznawania substratu przez enzym, co zostało pokazane w pracy Sillero *et al.*¹⁸⁸ porównując szybkość degradacji nukleotydu GTP oraz trifosforanu 2',3'-dideoksyguanozyny (szybkość uległa pięciokrotnemu zmniejszeniu). Do swojego działania fosfodiesteraza wymaga obecności jonów magnezu (wykazując optimum aktywności przy 15 mM stężeniu jonów Mg^{2+}).¹⁸⁹ Inhibitorem tego enzymu jest EDTA, 5 mM stężenie wystarczy, aby całkowicie zablokować jego aktywność. PDE-I jest często stosowana do degradacji nukleotydów, prezentowana była też w niniejszej rozprawie jako uniwersalne narzędzie do badania właściwości sond nukleotydowych (por. rozdział 8.3).

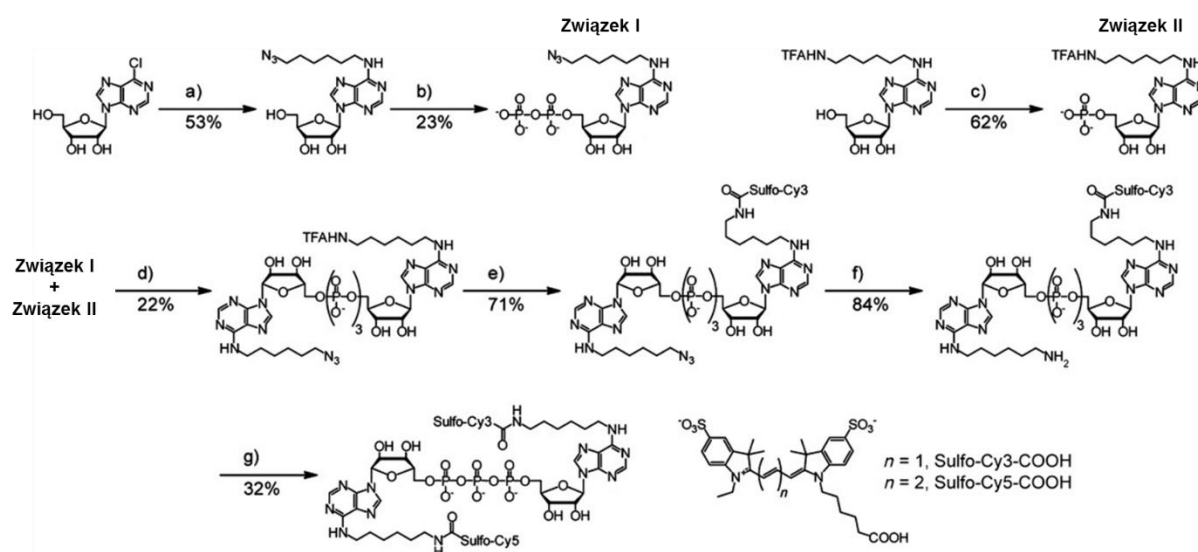
11.2. FHIT (*Fragile Histidine Triad protein*)

Białko FHIT jest antyonkogenem. Należy ono do rodziny HIT (*histidine triad proteins*) białek wiążących i hydrolizujących nukleotydy. W toku badań odkryto, że niedostateczna lub niewłaściwa ekspresja tych białek powiązana jest z występowaniem nowotworów.^{190, 191}

W przypadku białka FHIT przymiotnik *fragile* w nazwie odnosi się do występowania genu FHIT na chromosomie 3 w rejonie FRA3B, który szczególnie łatwo może ulec degradacji w fazie metafazy podziału komórkowego. W przypadku antyonkogeny prowadzić to może do rozwoju wielu nowotworów, takich jak nowotwory głowy i szyi, przewodu pokarmowego oraz piersi.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Z drugiej strony znane są doniesienia, według których wywołanie nadekspresji białka FHIT w komórkach guza hamowało jego rozwój; efekt ten nie występował w przypadku wywołania nadekspresji FHIT w niezrakowaciących komórkach.¹⁹⁵

Białko FHIT wykazuje aktywność hydrolazy degradującej oligofosforany 5',5'-diadenozyny (Ap_nA) do AMP i odpowiedniego oligofosforanu adenozy (n-1). W szczególności degraduje ono Ap_3A , którego nagromadzenie może powodować rakowacenie komórki¹⁹⁶. Aktywność hydrolazy nie jest konieczna do zatrzymania wzrostu komórki. W przypadku mutanta pozbawionego zdolności katalitycznej (substytucja H96N), dalej możliwe jest związanie cząsteczki Ap_3A . Taki kompleks pełni rolę cząsteczki sygnałowej odpowiedzialnej za zatrzymanie wzrostu komórki i skierowanie jej na drogę apoptozy.¹⁹⁷

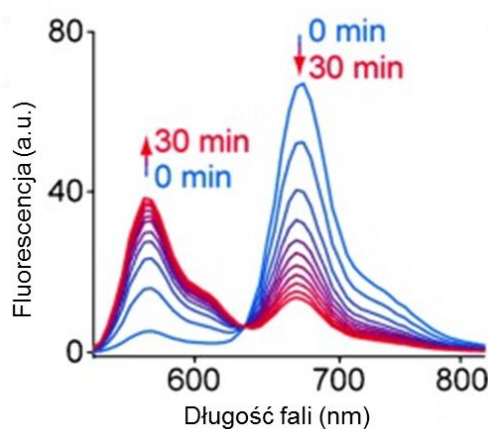
W literaturze opisane są przykłady monitorowania aktywności FHIT z użyciem sond opartych o strukturę Ap_3A . Rozwiązanie takie zaproponowano np. w pracy Hacker et al.¹⁹⁸ W pracy tej otrzymano sondę wykazującą efekt FRET. Para barwników FRET (sulfocyjanina 3 i sulfocyjanina 5) została przyłączona za pomocą odpowiednich linkerów w pozycji N-6 obydwu nukleozydów. Syntezę tej sondy przedstawiono poniżej na rysunku Rys. 61.



Rys. 61 Schemat syntezy sondy FRET – analogu dinukleotydu Ap_3A :

a) 6-azydoheksylamina, etanol, 3 h b) 1. POCl_3 , fosforan trimetylu, 1 h, 0°C ; 2. $(\text{Bu}_3\text{NH}^+)_2\text{HPO}_4^-$, Bu_3N , DMF, 30 min, RT; 3. 0,1 M TEAB, 30 min, RT; c) 1. POCl_3 , fosforan trimetylu, 1 h, 0°C ; 2. 0,1 M TEAB, 30 min, RT; d) 1. Et_3N , bezwodnik kwasu trifluorooctowego, AcCN, 10 min, RT; 2. *N*-metyloimidazol, Et_3N , 10 min, 0°C ; 3. 4, 4 Å siła molekularne, DMF, 2 h, RT; 4. 0,1 M TEAB, 30 min, RT; e) 1. 0,1 M NaOH, 3 h, RT; 2. Aktywny ester barwnika Sulfo-Cy3, 0,1 M NaHCO_3 , DMF, 12 h, RT; f) TCEP-HCl, woda, metanol, Et_3N , 12 h, RT; g) Aktywny ester Sulfo-Cy5-NHS, 0,1 M NaHCO_3 , DMF, 12 h, RT Schemat zaczerpnięty z pracy Hacker et al.¹⁹⁸ Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914841236117)

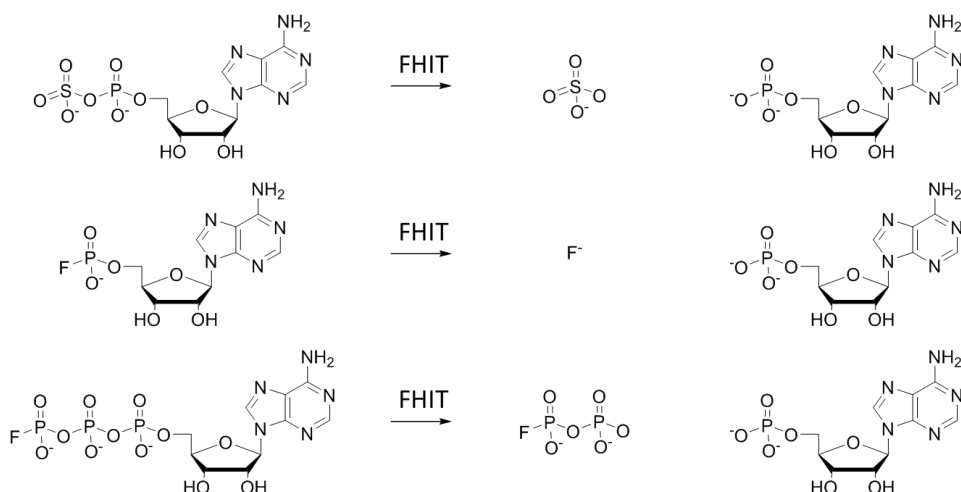
Sonda okazała się skutecznym narzędziem w monitorowaniu aktywności enzymatycznej FHIT. Została ona sprawdzona w warunkach *in vitro*, w eksperymencie tym dowiedziono, że w miarę inkubacji sondy w obecności białka FHIT intensywność fluorescencji donora FRET wzrasta, natomiast akceptora FRET – maleje. Zostało to przedstawione na ilustracji poniżej. (Rys. 62)



Rys. 62 Zmiana widma fluorescencji sondy – analogu Ap_3A w czasie inkubacji z białkiem FHIT. Wykres zaczerpnięty z pracy Hacker et al.¹⁹⁸ Powielono za zgodą wydawcy (nr licencji 4914841236117)

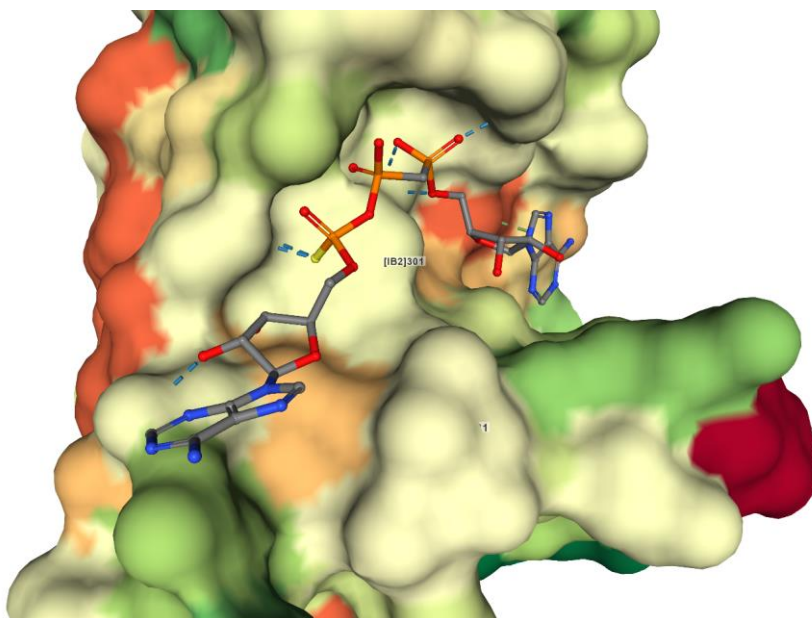
Sonda spełnia założone wymagania i może służyć jako narzędzie do badania białka FHIT. Uwagę zwraca jednak jej synteza. (Rys. 61) Jest ona wieloetapowa, a wydajność wielu etapów wynosi mniej niż 50%. Jest to niekorzystne, zwłaszcza biorąc pod uwagę, że barwniki fluorescencyjne oraz modyfikowane nukleotydy mają wysokie ceny, co znacząco zwiększa koszty ostatecznego produktu. W przedstawionej rozprawie zostanie przedstawiony krótszy i wydajniejszy sposób otrzymywania sond przydatnych w monitorowaniu aktywności białka FHIT. Będą to sondy mononukleotydowe, które jednak wykazują zdolność wiązania do badanego białka.

Głównym substratem wiązany przez białko FHIT jest trifosforan diadenozyny, nie wiąże ono natomiast naturalnych mononukleotydów adenozynowych – AMP, ADP, ani ATP.¹⁹⁶ Mimo to w pracy Guranowski et al. wykazano, że hydrolizie katalizowanej przez FHIT ulegać mogą rozmaite nukleotydy zawierające w swojej strukturze AMP.¹⁹⁹ Przykłady tej aktywności zostały przedstawione na Rys. 63.



Rys. 63 Przykłady analogów nukleotydów adenozynowych hydrolizowanych przez FHIT

Doświadczenia we wspomnianej pracy sugerują, że białko FHIT wykazuje preferencję wobec nukleotydów zawierających adenozyne i tylko jeden ładunek ujemny w obrębie reszty fosforanu γ . Naturalnie ładunek ten jest zamaskowany przez drugą adenozyne, jednak nie jest ona niezbędna dla rozpoznania substratu przez białko FHIT, nie jest też ona niezbędna w związaniu substratu do białka, gdyż większość wiązań tworzonych jest w obrębie łańcucha trifosforanowego oraz pierwszej adenozyne (Rys. 64). Sugeruje to możliwość wprowadzenia innej grupy maskującej ładunek (np. estrowej), co może umożliwiać projektowanie funkcjonalnych sond mononukleotydowych do badania aktywności białka FHIT.



Rys. 64 Wiązanie analogu Ap₃A do kieszeni białka FHIT. Struktura na podstawie Pace *et al.*²⁰⁰
Copyright (1998) National Academy of Sciences

Badania własne

12. Cele pracy

Głównym celem pracy było opracowanie narzędzi do bezinwazyjnego monitorowania w czasie rzeczywistym reakcji enzymatycznych katalizowanych przez pirofosfatazy. Cel ten planowano osiągnąć poprzez zaprojektowanie, opracowanie syntezy, a następnie otrzymanie i zbadanie właściwości nukleotydów mogących służyć jako sondy (próbniiki) molekularne. Głównym obiektem badań były nukleotydy adeninowe, stanowiące analogi ATP, ale opracowywane metody znakowania demonstrowano również na przykładach innych nukleotydów, m.in. w celu potwierdzenia ich uniwersalności. Związki projektowano tak, aby ulegały reakcji enzymatycznej jednocześnie zmieniając swoje właściwości (np. emisyjne). Emisję fluorescencji można rejestrować i wykorzystać jako pośrednią metodę badania postępu reakcji. Analogi nukleotydów zaprojektowano tak, aby kluczowym etapem ich syntezy była reakcja CuAAC, która jest szybka, wydajna i możliwa do przeprowadzenia w środowisku wodnym, co jest istotnym czynnikiem ułatwiającym syntezę ze względu na wysoką polarność nukleotydów.

Na realizację głównego celu pracy składał się szereg zadań:

- Synteza analogów nukleotydów i analogów terminalnego fosforanu zawierających grupy alkinowe.

Pierwszym celem pracy było opracowanie wydajnej syntezy szeregu analogów nukleotydów, które zawierały terminalne grupy alkinowe, reaktywne w reakcji CuAAC. Związki takie mogłyby zostać użyte w syntezie dużych bibliotek analogów nukleotydów na drodze reakcji CuAAC. Biblioteki te mogłyby zostać użyte w badaniach HTS (*high-throughput screening*) w poszukiwaniu inhibitorów białek wiążących nukleotydy (jak np. w pracy Lee et al.¹⁴⁴, por. rozdział 9.2). Z kolei zastosowanie C-fosfonianów jako analogów fosforanów w strukturach nukleotydów pozwala eksplorować nową klasę związków, które mogą wykazywać interesujące właściwości w oddziaływaniu z białkami docelowymi.

Temat ten został zapoczątkowany już podczas realizacji mojej pracy magisterskiej, w ramach której opracowałem wstępnie metody syntezy C-fosfonianów – 3-butynylowego, 2-propargilowego, oraz etynylowego. W ramach projektu doktorskiego syntezy C-fosfonianów propargilowego oraz etynylowego miały zostać zoptymalizowane i przeskalowane. Ponadto zaplanowałem uzupełnienie kolekcji otrzymanych analogów o fosforan propargilowy, który jest znany w literaturze, jednak jego synteza wymagała optymalizacji.

Drugim założonym celem syntetycznym było opracowanie wydajnej syntezy *P*-imidazolidów nukleotydów zawierających ugrupowanie alkinowe przyłączone w

obrębie reszty nukleozydu. Otrzymane w ramach realizacji tych zadań związki planowano przeznaczyć do reakcji sprzęgania z wymienionymi wyżej analogami reszty fosforanowej, w celu otrzymania analogów nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe – jedną w obrębie reszty terminalnego fosforanu, a drugą przyłączoną do reszty nukleozydu. Dodatkowym celem pracy było opracowanie takich warunków reakcji aktywacji i sprzęgania, by była ona uniwersalna i dawała dobre rezultaty dla dowolnego analogu nukleotydu, niezależnie od zasady azotowej i długości łańcucha oligofosforanowego.

- Opracowanie warunków wydajnej reakcji CuAAC nukleotydów ze znacznikami fluorescencyjnymi.

Zrealizowanie zadań z punktu pierwszego umożliwiło syntezę sond nukleotydowych, czyli nukleotydów zawierających znaczniki fluorescencyjne. W tym punkcie głównym celem było zoptymalizowanie warunków reakcji CuAAC nukleotydów zawierających grupy alkinowe z barwnikami zawierającymi grupę azydkową. W wersji pierwotnej celem tego punktu było opracowanie standardowej reakcji CuAAC nukleotydów z jedną grupą alkinową z pojedynczym barwnikiem zawierającym azydek, oraz nukleotydów z dwiema grupami alkinowymi z dwoma identycznymi barwnikami w celu syntezy sond ekscymerowych. W związku z nieoczekiwanymi wynikami uzyskanymi podczas realizacji tego zadania, narodziła się również koncepcja otrzymania serii nowej klasy nukleotydów – sond wykazujących efekt FRET.

- Opracowanie warunków sekwencyjnej reakcji CuAAC.

Eksperymenty przeprowadzane w ramach realizacji poprzedniego punktu zaowocowały interesującą obserwacją skutkującą rozszerzeniem planów badawczych – zbadaniem reaktywności grup alkinowych nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe. W punkcie tym zaplanowano optymalizację warunków reakcji CuAAC tak, by możliwe było kontrolowane przyłączenie do nukleotydu dwóch różnych znaczników w sposób regioselektywny, a cała synteza możliwa była do przeprowadzenia bez grup zabezpieczających. Dodatkowym celem założonym w ramach tego zadania była synteza nowej klasy nukleotydów – sond wykazujących efekt FRET (pary fluoroforów donor-akceptor FRET) oraz sond wygaszeniowych (pary fluorofor-wygaszcz).

- Badania spektroskopowe otrzymanych sond.

Wszystkie sondy molekularne otrzymane w ramach realizacji poprzednich punktów należało zbadać pod względem ich właściwości spektroskopowych. Szczególnie interesujące wydały się właściwości sond ekscymerowych oraz FRET. W ramach realizacji tego punktu zaplanowano oszacowanie intensywności efektu wykazywanego przez daną sondę oraz zbadanie wpływu czynników, które mogą ten efekt zaburzać, bądź wzmacniać. Ponadto w ramach tego punktu zaplanowano zbadanie wpływu substancji niezbędnych do prowadzenia reakcji enzymatycznej (jony metali, bufor, itp.) na intensywność i stabilność fluorescencji sondy.

- Badania enzymatyczne otrzymanych sond.

Sondy, które wykazały stabilną fluorescencję w eksperymentach opisanych w poprzednim punkcie zostały przeznaczone do badań enzymatycznych. Podstawowym celem tych badań było sprawdzenie zmian fluorescencji sond w reakcji z niespecyficzną pirofosfatazą PDE-I. Eksperymenty te konieczne były dla potwierdzenia, że w zaprojektowanych sondach zmiana fluorescencji związana jest bezpośrednio z postępem ich degradacji enzymatycznej. Po potwierdzeniu zależności między postępem reakcji i zmianami fluorescencji sond, wybrane związki były skierowane do reakcji z bardziej specyficznym enzymem FHIT. Jako poboczny eksperyment zaplanowano też doświadczenie stwierdzające przydatność otrzymanych sond w poszukiwaniu inhibitorów pirofosfataz.

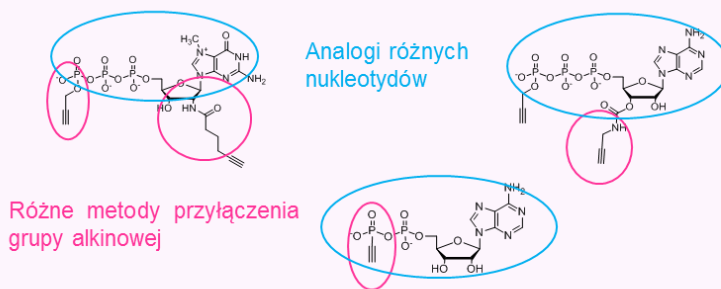
- Badania właściwości sond w lizatach komórkowych oraz komórkach *in vivo*.

Właściwości sond sprawdzonych w warunkach *in vitro* w reakcji z enzymami, zaplanowano zbadać w lizatach komórkowych. Eksperymenty te miały potwierdzić działanie sond w bardziej złożonych mieszaninach biologicznych.

Ze względu na hydrofobowy charakter fluoroforów użytych do syntezy sond nukleotydowych, spodziewano się, że sondy te wykażą zdolność penetracji błony komórkowej i lokowania się w cytozolu. Ostatnim celem zaplanowanym w ramach tego projektu było sprawdzenie, czy otrzymane sondy nukleotydowe zdolne są do penetracji błony komórkowej.

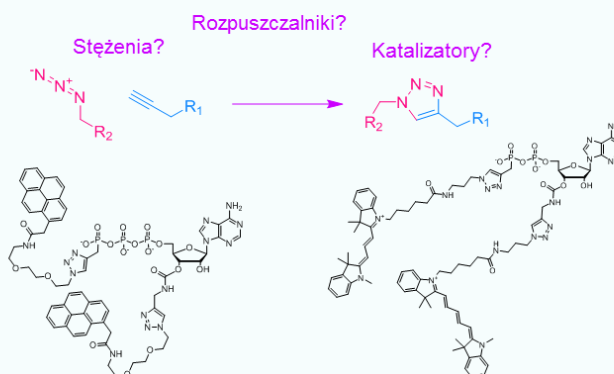
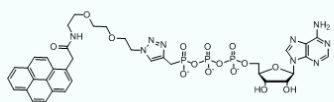
Plan projektu

Synteza chemiczna analogów nukleotydów zawierających grupy alkinowe, reaktywne w reakcji CuAAC



Opracowanie warunków reakcji CuAAC i synteza mono- i dwuznakowanych sond nukleotydowych

Opracowanie warunków reakcji sekwencyjnej CuAAC



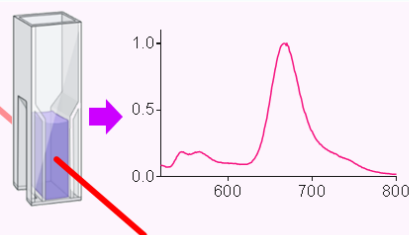
Badania spektroskopowe sond fluorescencyjnych:

- Wpływ składników buforów reakcyjnych na fluorescencję
- Badanie intensywności FRET, fluorescencji ekscymerowej

Wpływ jonów?

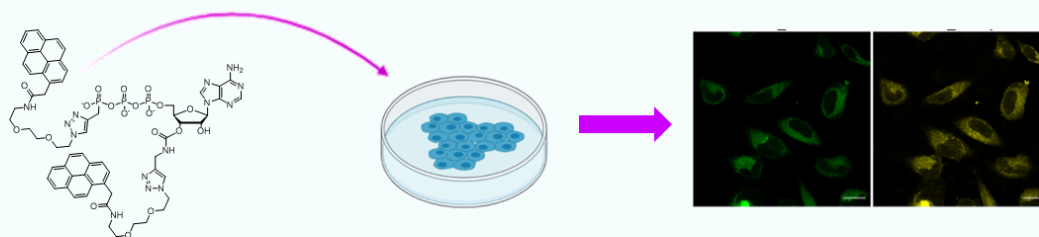
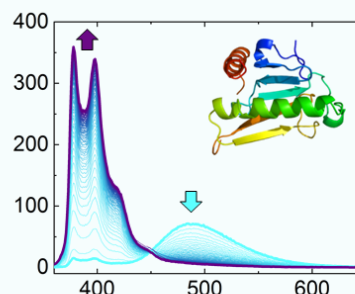
Wpływ detergentu?

Wpływ substancji buforującej?



Badania enzymatyczne i komórkowe sond fluorescencyjnych:

- Reakcje z modelowym enzymem PDE-I
- Monitorowanie reakcji specyficznego enzymu FHIT
- Badanie zdolności sond do wnikania do wnętrza komórek



13. Planowanie, synteza i badanie właściwości sond nukleotydowych

Niniejsza praca jest kontynuacją mojego projektu magisterskiego, który zakładał syntezę i zbadanie właściwości nowej klasy nukleotydów zawierających ugrupowanie alkinowe przyłączone w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego. W ramach pracy doktorskiej syntezy tych związków zostały zmodyfikowane w celu ich optymalizacji, a do puli związków dołączone zostały nukleotydy zawierające fosforan propargilu jako analog terminalnego fosforanu. Opracowana metoda okazała się wydajna oraz wszechstronna, co pozwoliło otrzymać nie tylko analogi nukleotydów adenozytowych, ale także analogi innych nukleotydów, co opisałem w rozdziałach 14.2 oraz 14.3 (gdzie numery **1** opisują analogi fosforanów użyte w syntezie, a związki z numerami **2** to nukleotydy zawierające grupę alkinową przyłączoną w terminalnej pozycji oligofosforanu). Dla otrzymanych nukleotydów **2** zoptymalizowałem warunki reakcji CuAAC z różnymi znacznikami (w niniejszej pracy opisane numerem **5**), co pozwoliło na uzyskanie biblioteki nukleotydów znakowanych w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego (opisanych numerem **6**), eksperymenty te przedstawiłem w rozdziale 16.2.

Nukleotydy monoznakowane są związkami ciekawymi i mają potencjalne zastosowanie w badaniach biologicznych, m. in. jako substraty w syntezie inhibitorów, czy też jako sondy fluorescencyjne przydatne do monitorowania aktywności enzymów. Mimo to, mają też wady, z których najpoważniejszą wydaje się zależność fluorescencji zastosowanego znacznika od zasady azotowej, jaka występuje w danym analogu nukleotydu. Aby zminimalizować ten efekt postanowiłem wprowadzić w obrębie syntetyzowanego analogu dodatkową grupę alkinową. Syntezę tych nukleotydów (opisanych numerem **4**, oraz ich prekursorów opisanych numerem **3**) opisałem w rozdziałach 14.4 – 14.7. Są to analogi nukleotydów adeninowych, ale także innych (C, G, m⁷G), które otrzymałem, aby ukazać wszechstronność opracowanej metody. Dla otrzymanych podwójnie sfunkcjonalizowanych analogów **4** zoptymalizowałem i przeprowadziłem szereg reakcji CuAAC z barwnikami wykazującymi fluorescencję ekscymerową, co zostało opisane w rozdziale 16.3. Pozwoliło mi to otrzymać bibliotekę sond ekscymerowych (związki nr **7**) – nukleotydów, które pod wpływem degradacji enzymatycznej zmieniają swoje widmo emisji fluorescencji, co pozwala pośrednio monitorować postęp reakcji enzymatycznej. Badania te opisałem w rozdziałach 17.2 oraz 18.2.

W toku optymalizacji reakcji CuAAC zauważyłem, że grupa alkinowa przyłączona w terminalnej pozycji oligofosforanu nukleotydów **4** w pewnych warunkach reaguje szybciej, niż grupa przyłączona do reszty rybozy. Aby potwierdzić tę obserwację wykonano obliczenia, których wyniki opisałem w rozdziale 16.5. Odkryta różnica reaktywności pozwoliła mi na opracowanie warunków sekwencyjnej reakcji CuAAC. W podejściu tym najpierw przeprowadzałem jedną reakcję CuAAC z wybranym znacznikiem, a następnie kolejną, z innym znacznikiem, bez wydzielania produktu pośredniego. Pozwoliło mi to uzyskać kolekcję sond **7** wykazujących efekt FRET

(rozdział 16.4). Ponadto sprawdziłem, czy selektywność reakcji CuAAC zależy od umiejscowienia grup alkinowych w strukturze nukleotydu. W tym celu otrzymałem analog ATP zawierający grupę alkinową w pozycji N6 zasady azotowej (związek **4p**, rozdział 14.8), który tak samo jak wcześniej otrzymane analogi mógł zostać poddany sekwencyjnej reakcji CuAAC. Otrzymane sondy FRET zostały zbadane spektroskopowo, a ich właściwości potwierdzono w badaniach z enzymami – modelową pirofosfatazą PDE-I, a sondy zawierające zasadę adeninową także z białkiem FHIT. W obydwu przypadkach możliwe było monitorowanie reakcji enzymatycznej poprzez obserwację zanikającej w czasie emisji fluorescencji akceptora FRET i rosnącej jednocześnie emisji fluorescencji donora FRET. Wyniki tych eksperymentów opisałem w rozdziałach 17.3 oraz 18.3.

W ostatnim etapie badań niektóre z sond ekscymerowych oraz sond FRET wykorzystano w eksperymentach dotyczących wnikania do komórek w warunkach *in vivo*. Okazało się, że niektóre z tych sond są w stanie wnikać do wnętrza komórek samoistnie lokując się w cytozolu. Opis tych eksperymentów przedstawiłem w rozdziałach 18.2 oraz 18.3.

Projekt dotyczący sekwencyjnej reakcji CuAAC jest szerszy niż tylko badania przedstawione w ramach tego doktoratu. Opracowana metoda posłużyła także do syntezy analogów zawierających 7-metyloguaninę (**4s**), które zostały użyte jako sondy do monitorowania specyficznej fosfatazy DcpS. Badania te nie są ujęte w tej pracy, jednak synteza wykorzystanych w nich analogów nukleotydów została ukazana w rozdziale 14.8.

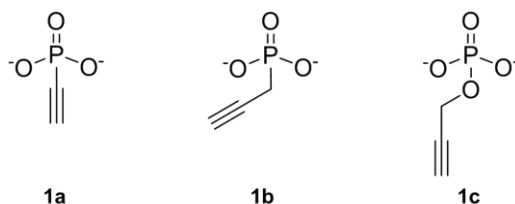
14. Strategie syntezy nukleotydów zawierających grupy alkinowe w strukturze

14.1. Wprowadzenie

Nukleotydy zawierające jedną grupę alkinową przyłączoną w obrębie terminalnej grupy fosforanowej wykorzystałem jako substraty w syntezie najprostszych fluorescencyjnych sond nukleotydowych. Stosując klasyczne metody znane z chemii nukleotydów (por. rozdział 10) zastosowałem sprzężanie aktywnych *P*-imidazolidów nukleotydów z odpowiednimi *C*-fosfonianami i fosforanami, zawierającymi funkcję alkinową. Otrzymane nukleotydy zostały scharakteryzowane za pomocą metod spektroskopowych, a następnie wykorzystane w reakcji CuAAC z różnymi substratami zawierającymi ugrupowanie azydkowe. Struktury produktów reakcji CuAAC zostały potwierdzone za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas.

14.2. Synteza analogów reszty fosforanowej zawierających funkcję alkinową

W ramach niniejszej pracy opracowano i zoptymalizowano reakcję otrzymywania trzech analogów reszty fosforanowej zawierających terminalny alkin. W przypadku C-fosfonianu etynylowego, grupa alkinowa została przyłączona bezpośrednio, z kolei C-fosfonian 2-propargilowy zawierał grupę metylenową występującą w roli krótkiego łącznika. Ostatnia z podjednostek – fosforan propargilu – zawierała ugrupowanie OCH_2 pomiędzy grupą alkinową i atomem fosforu. (Rys. 65)

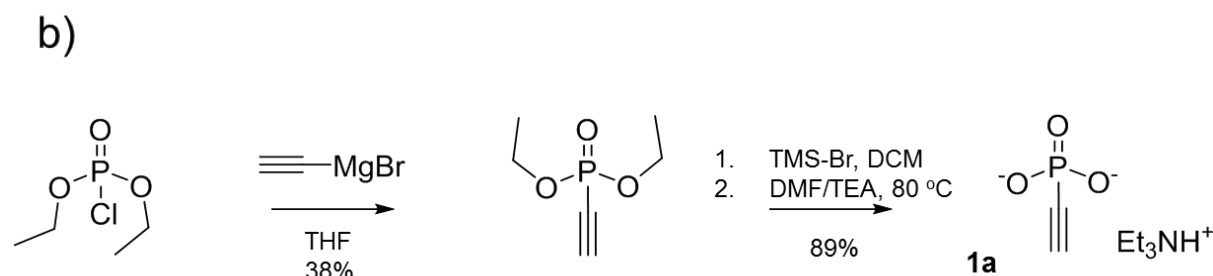
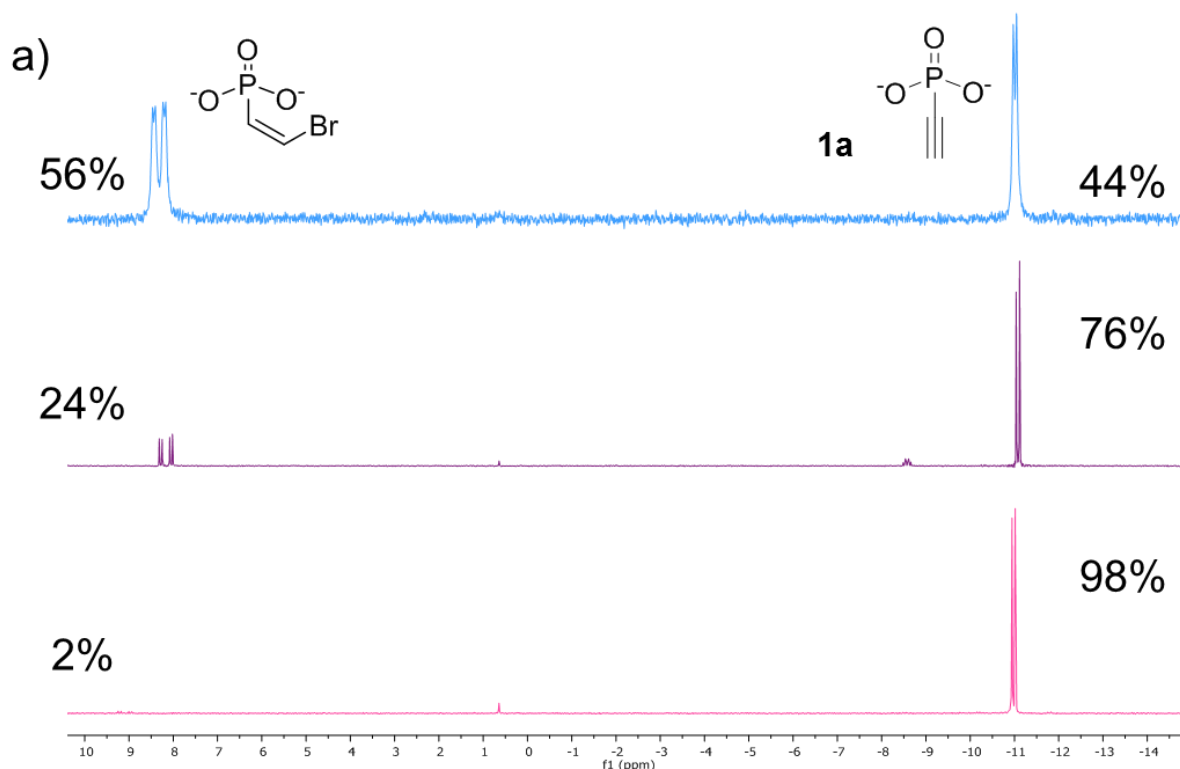


Rys. 65 Struktury C-fosfonianów etynylowego i 2-propargilowego, oraz fosforanu propargilowego.

C-fosfonian etynylowy (**1a**) został otrzymany na drodze bezpośredniej addycji roztworu bromku etynylomagnezowego w THF do chlorofosforanu dietylu. Powstały w reakcji C-fosfonian wykazuje znaczącą kwasowość alkinowego protonu, ze względu na efekt indukcyjny sąsiadującej grupy fosforylowej. W związku z tym reakcja prowadzona była z zachowaniem dwukrotnego nadmiaru bromku etynylomagnezowego, z którego połowa działała jako zasada deprotonująca powstały C-fosfonian, a druga połowa ulegała addycji do elektrofilowego atomu fosforu. Powstały produkt oczyszczany był z użyciem technik chromatograficznych. W drugim etapie zoptymalizowano warunki usuwania grup etylowych. Standardowa procedura z wykorzystaniem bromotrimetylosilanu skutkowała addycją HBr do wiązania potrójnego i uzyskaniem dużych ilości niepożądanego bromowanego produktu ubocznego, który jest bardzo trudny do oddzielenia od pożądanego C-fosfonianu. Bromowany produkt uboczny w kolejnych etapach syntez wchodził w reakcję z aktywnymi *P*-imidazolidami nukleotydów prowadząc do otrzymania niepożądanych związków. Pierwszym podejściem do rozwiązania tego problemu, opracowanym przeze mnie w ramach pracy magisterskiej, było zastosowanie 1-pentynu jako *scavengera*⁽¹⁾. Dodany w stosunku 5:1 wobec C-fosfonianu wiązał on powstający HBr i zmniejszał znacząco udział bromowanego produktu (z 56% do 24%, Rys. 66a, niebieskie i fioletowe widmo). W drugim podejściu do optymalizacji tej reakcji, zrealizowanym w ramach badań do niniejszej rozprawy, zamiast dodatku 1-pentynu, produkt otrzymany po odbezpieczeniu poddawany był reakcji eliminacji w mieszaninie DMF i trietyloaminy w podwyższonej temperaturze (Rys. 66a, różowe widmo, b). Podejście zakładające syntezę, a następnie eliminację bromowodoru okazało się bardziej korzystne, gdyż w przeciwieństwie do podejścia zakładającego użycie 1-pentynu pozwalało na uzyskanie

¹ Słowo *scavenger* zapożyczone z języka angielskiego będzie używane w tej pracy ze względu na brak polskich terminów, które w prosty sposób oddawałyby rolę, jaką pełni ten związek w wymienionej reakcji.

czystego produktu, praktycznie niezawierającego niepożądanego produktu ubocznego (zawartość ok. 2%). Otrzymany C-fosfonian po usunięciu rozpuszczalników został wyizolowany w postaci soli trietyloamoniowej, która mogła być bezpośrednio użyta w reakcji sprzęgania z *P*-imidazolidami nukleotydów.

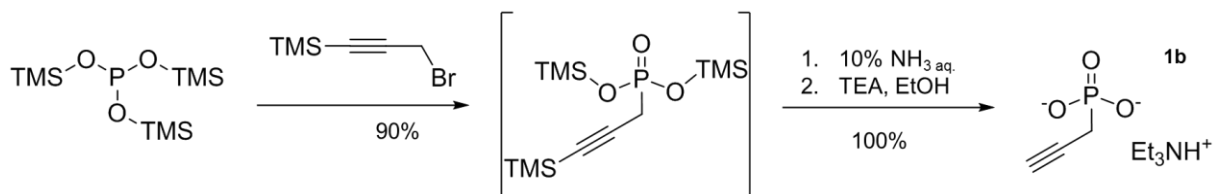


Rys. 66 a) porównanie widm ^{31}P NMR C-fosfonianu etynylowego (**1a**). Niebieskie – przed zastosowaniem 1-pentynu, fioletowe – z użyciem pięciokrotnego nadmiaru 1-pentynu, różowe – po eliminacji HBr z użyciem trietyloaminy.

b) Schemat zoptymalizowanej syntezy C-fosfonianu etynylowego.

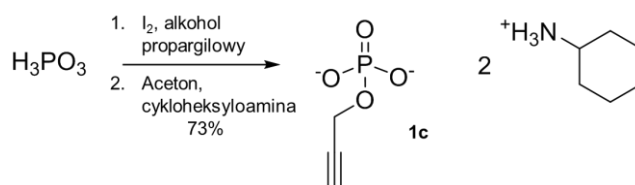
Synteza C-fosfonianu 2-propargilowego (**1b**) również została pierwotnie opracowana w ramach mojego projektu magisterskiego. W reakcji Arbuzowa tris(trimetylosililo)fosforin oraz 3-bromo-1-(trimetylosililo)-propynu powstaje pożądany C-fosfonian z funkcją propargilową zabezpieczoną grupą trimetylosililową. Zabezpieczające grupy trimetylosililowe usuwa się za pomocą 10% wodnego roztworu amoniaku. W pierwszym podejściu grupa trimetylosililowa zabezpieczająca funkcję alkinową była usuwana dopiero po przyłączeniu C-fosfonianu do nukleotydu, jednak labilność grupy karbaminianowej w środowisku zasadowym (por. rozdział 14.5)

wymusiła zmianę ścieżki syntetycznej. W drugim podejściu do syntezy, opracowanym w ramach badań do niniejszej rozprawy, po usunięciu rozpuszczalników powstały C-fosfonian był zamieniany w pożądaną sól trietyloamoniową poprzez dodanie nadmiaru trietyloaminy i kilkukrotne odparowanie z etanolem. W takiej postaci mógł być on wykorzystany w reakcji sprzęgania z *P*-imidazolidami nukleotydów.



Rys. 67 Schemat zoptymalizowanej syntezy C-fosfonianu propargilowego (**1b**)

Fosforan propargilu (**1c**) został otrzymany na drodze zmodyfikowanej metody opublikowanej przez Lee *et al.*¹⁴⁴ W metodzie tej kwas fosforowy (III) i trietyloamina rozpuszczane są alkoholu propargilowym. Reakcję zapoczątkowuje dodanie jodu, który powoduje utlenienie atomu fosforu (III) do fosforu (V), z jednoczesnym przyłączeniem alkoholu propargilowego. Powstały fosforan propargilu można wyizolować poprzez wytrącenie go cykloheksyloaminą z roztworu acetonowego. (Rys. 68) Uzyskaną w ten sposób sól fosforanu propargilu można bezpośrednio użyć w reakcji sprzęgania z *P*-imidazolidami nukleotydów, bądź też zamienić ją z użyciem chromatografii jonowymiennej na sól trietyloamoniową.

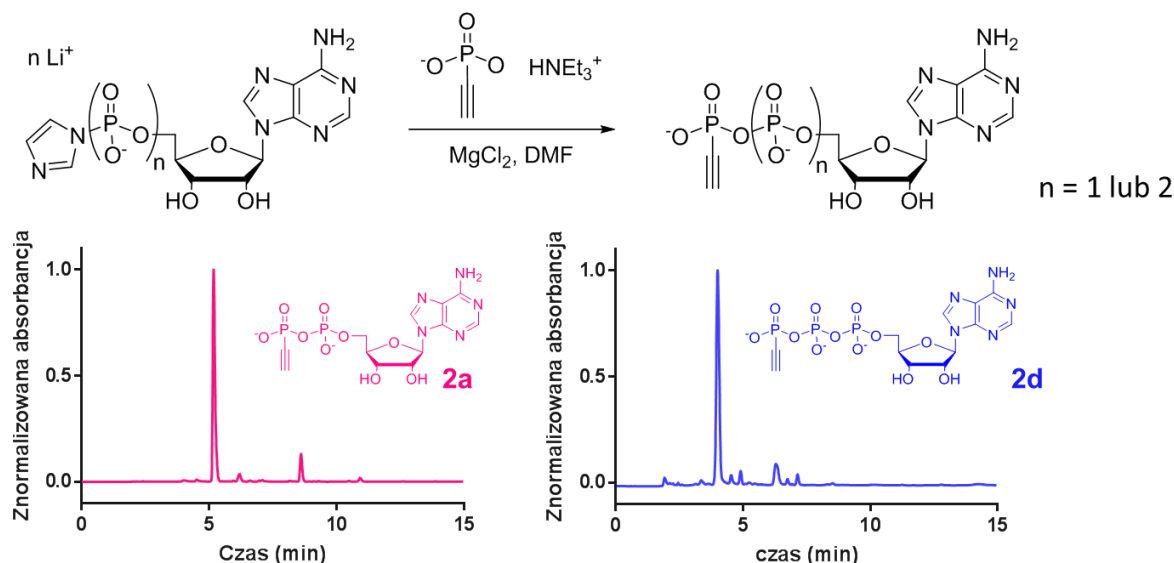


Rys. 68 Schemat syntezy fosforanu propargilu (**1c**)

14.3. Nukleotydy zawierające pojedynczą funkcję alkinową w obrębie reszty oligofosforanu

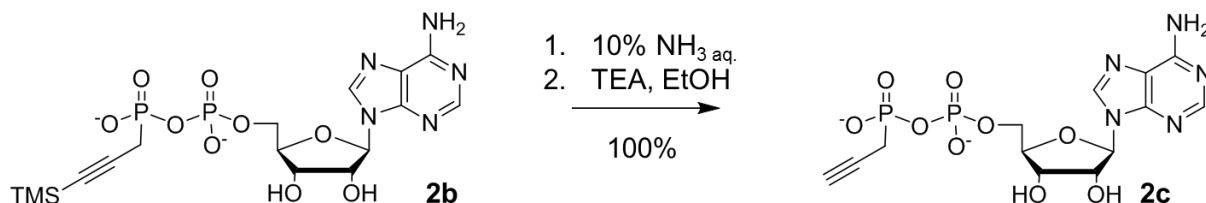
Otrzymane C-fosfoniany zostały użyte w reakcji sprzęgania z aktywnymi *P*-imidazolidami mono- i difosforanów nukleozydów (por. rozdział 10.2). Reakcja ta była prowadzona w DMF z użyciem 4 – 8-krotnego molowego nadmiaru chlorku magnezu. Postęp reakcji monitorowany był za pomocą RP HPLC i zwykle po 45 – 60 minutach można było zaobserwować całkowity zanik substratu nukleotydowego i jego konwersję do oczekiwanego produktu. Po tym czasie reakcja była rozcieńczana wodą i oczyszczana za pomocą chromatografii jonowymiennej na anionicie Sephadex w gradiencie buforu węglanu trietyloaminy. W przypadku nieskutecznego oczyszczenia produktu z użyciem chromatografii jonowymiennej stosowano dodatkowe oczyszczenie za pomocą preparatywnej chromatografii HPLC w układzie odwróconych

faz. Na Rys. 69 przedstawiono przykładowe chromatogramy po zakończeniu reakcji sprzęgania mono- i difosforanu adenozy z C-fosfonianem etynylowym. W zoptymalizowanych syntezach głównym produktem jest produkt pożądaný, a sygnał na HPLC pochodzący od niego jest głównym sygnałem.



Rys. 69. Przykładowe chromatogramy reakcji sprzęgania *P*-imidazolidów z trietyloamoniową solą C-fosfonianu etynylowego. Dominującym sygnałem w obu przypadkach jest sygnał pochodzący od pożądanego produktu.

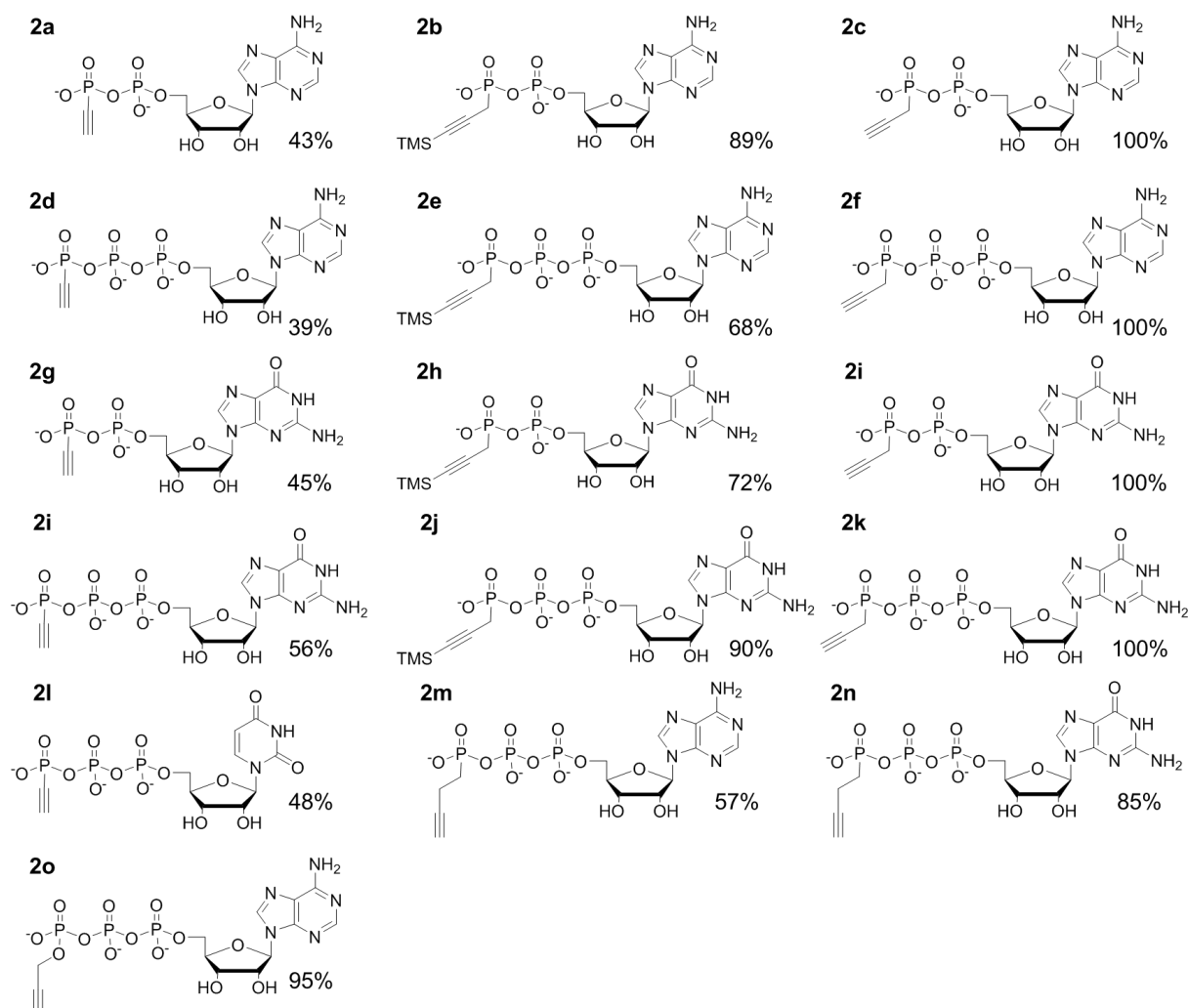
W ramach niniejszej pracy otrzymano wiele różnych nukleotydów, różniących się między sobą użytym C-fosfonianem, długością łańcucha oligofosforanowego, czy zasadą azotową. Na ogół reakcje otrzymywania tych produktów przebiegały z dobrą wydajnością, która mieściła się w granicach od 40 do 90%. W przypadku nukleotydów otrzymanych poprzez przyłączenie C-fosfonianu 1-TMS-2-propargilowego, grupa TMS była usuwana poprzez reakcję nukleotydu z 10% wodnym roztworem amoniaku. (Rys. 70) Zwykle po 10 minutach w takich warunkach reakcja zachodziła całkowicie, a pożądaný nukleotyd uzyskiwało się ilościowo poprzez zamrożenie mieszaniny reakcyjnej i liofilizację. Po zastosowaniu takiej procedury otrzymuje się amonową sól nukleotydu. Można ją jednak łatwo przekształcić w sól trietyloamoniową rozpuszczając nukleotyd w roztworze etanolowym z dodatkiem trietyloaminy i następnie odparowując go do sucha.



Rys. 70 Procedura usuwania grupy trimetylosililowej z reszty C-fosfonianu propargilu w nukleotydzie na przykładzie nukleotydu **2b**

Otrzymane nukleotydy monoalkinowe zostały przedstawione na poniższym schemacie. Opracowana procedura była na tyle uniwersalna, że umożliwiła również

syntezę także analogów innych nukleotydów – guaninowych oraz urydynowych. Nukleotydy **2m** oraz **2n** to produkty sprzęgania z C-fosfonianem 3-butyntylowym, którego został otrzymany według wcześniej opisanej procedury.²⁰¹



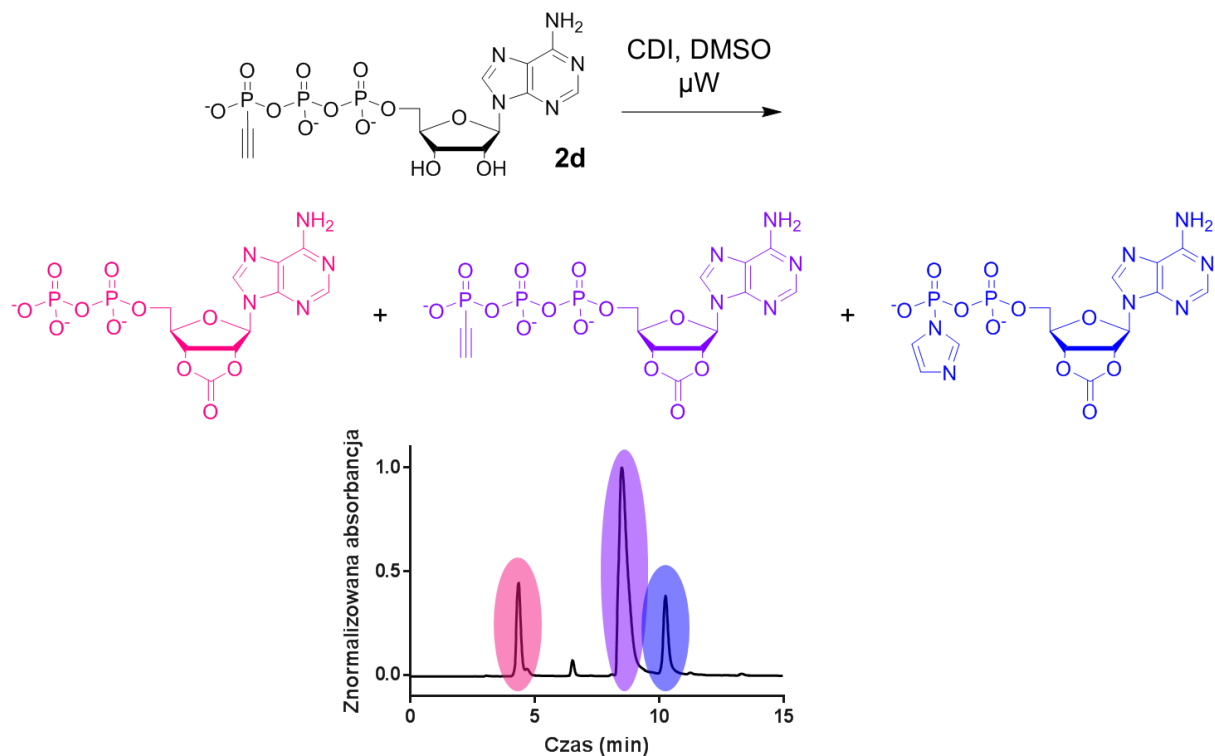
Rys. 71 Nukleotydy uzyskane za pomocą opisanej procedury. Wydajności preparatywne poszczególnych produktów zostały podane obok ich struktur na schemacie.

Otrzymane nukleotydy zostały wykorzystane w reakcji CuAAC z substratami zawierającymi azydek (barwniki fluorescencyjne, biotyna, azydonukleozydy). Opis tych syntez znajduje się w rozdziale 16.2.

14.4. Synteza analogów nukleotydów zawierających dwie funkcje alkinowe – reakcja CDI z C-fosfonianowym analogiem ATP

Analog ATP (**2d**) został poddany reakcji z CDI (1,1'-karbonyldiimidazol) w DMSO w warunkach promieniowania mikrofalowego. Reakcja ta miała skutkować utworzeniem 2',3'-O,O-węglanu nukleotydu, który następnie mógłby być przekształcony w karbaminian z przyłączonym linkerem propargilowym. W toku eksperymentu okazało się jednak, że CDI doprowadza do degradacji łańcucha

fosforanowego i usunięcia terminalnej grupy fosforanowej. Wydajność otrzymywania pożądanego produktu była niezadowalająca, a w dodatku w reakcji tworzyły się inne pochodne nukleotydów będące produktami degradacji substratu. (Rys. 72) W związku z tym opisana procedura została porzucona, a zamiast niej opracowano nową, uniwersalną i bardziej wydajną.

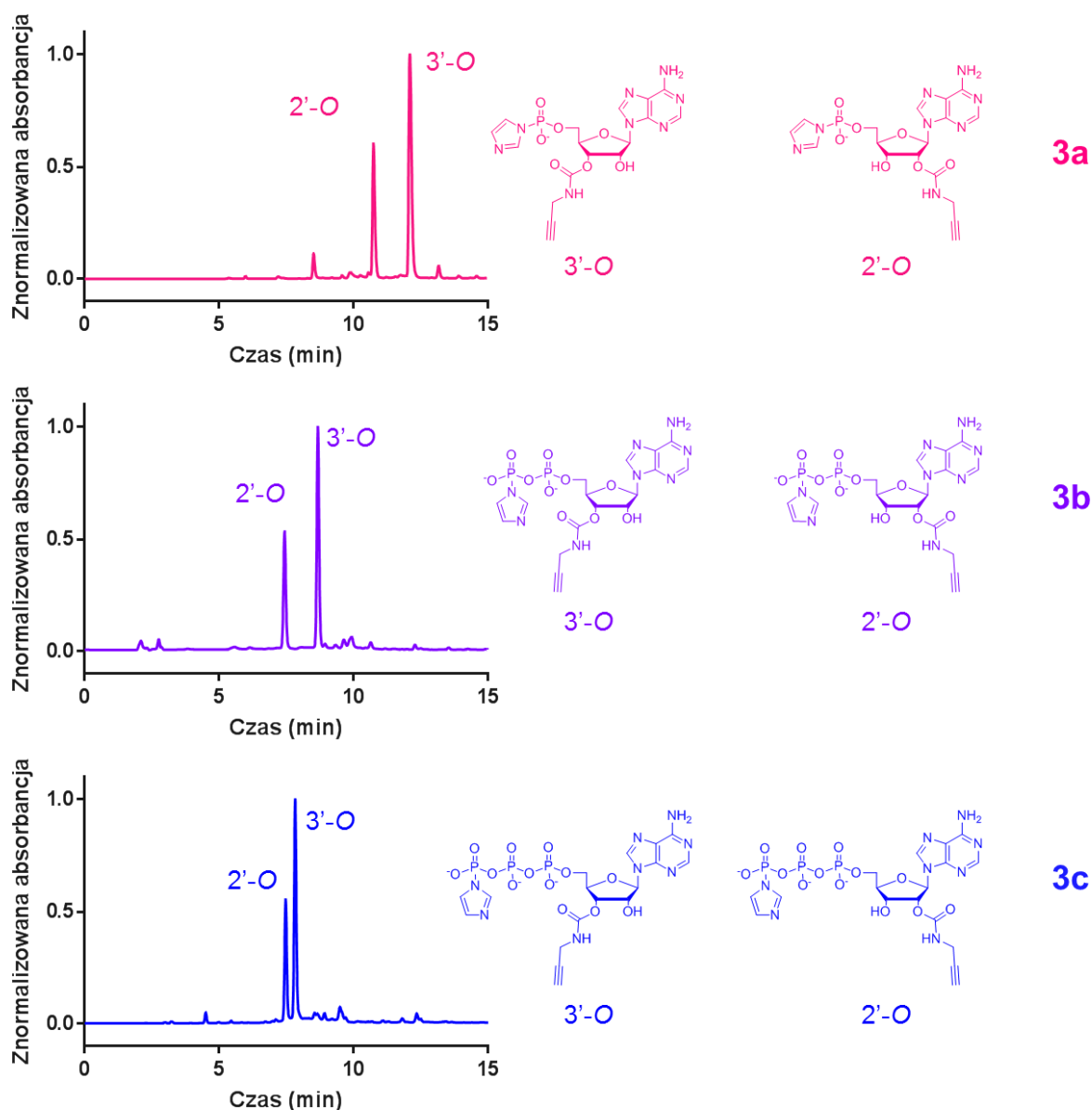


Rys. 72 Produkty reakcji analogu **2d** z CDI. W toku eksperymentów zaobserwowano zdolność CDI do degradacji zmodyfikowanego łańcucha oligofosforanowego poprzez odłączenie terminalnego C-fosfonianu

14.5. Synteza analogów ATP zawierających dwie funkcje alkinowe – reakcja CDI z oligofosforanem adenozyiny

Wobec wyniku powyższego eksperymentu przeprowadzono reakcję ADP z 10-krotnym nadmiarem CDI w DMSO, w warunkach promieniowania mikrofalowego. Reakcja ta była prowadzona przez 20 minut, po których oczekiwany produkt był jedyną pochodną nukleotydu obecną w mieszaninie. W kolejnym kroku nadmiar CDI został usunięty przez dodanie 25 równoważników molowych wody. Następnie do reakcji zostało dodane DBU oraz propargiloamina. (Rys. 74 ścieżka **A**) Ze względu na przewagę szybkości reakcji tworzenia karbaminianu nad reakcją podstawienia imidazolu możliwe jest zatrzymanie reakcji w takim momencie, by wyizolować produkt zawierający ugrupowanie karbaminianowe oraz *P*-imidazolid. Reakcja była zatrzymywana przez zastosowanie roztworu nadchloranu (VII) litu w acetonitrylu, a uzyskany produkt był solą litową rozpuszczalną w DMF i odpowiednią do przeprowadzenia kolejnych reakcji sprzęgania. Reakcja ta została przeprowadzona zarówno dla di-, jak i mono-, oraz trifosforanu adenozyiny. We wszystkich przypadkach

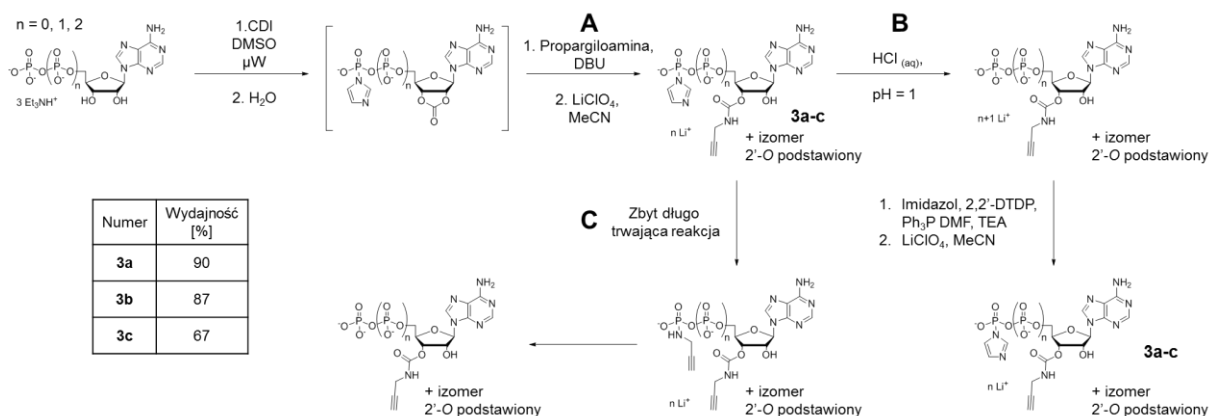
odniosła oczekiwany skutek i głównymi produktami były pożądane nukleotydy. (Rys. 73)



Rys. 73 Reprezentatywne profile HPLC reakcji syntezy *P*-imidazolidów nukleotydów zawierających grupę 2'(3')-O-karbamoilo-(*N*-propargilową)

W ramach niniejszej pracy wykorzystano także inne podejście do syntezy aktywnych analogów nukleotydów. Zakłada ono wprowadzenie dodatkowego kroku hydrolizy *P*-imidazolidu, po reakcji z propargiloaminą i DBU. W takim podejściu reakcję z propargiloaminą można prowadzić przez dłuższy czas. Ewentualne podstawienie reszty imidazolu propargiloaminą nie ma znaczenia, gdyż po utworzeniu karbaminianu mieszaninę reakcyjną doprowadza się do pH = 1 za pomocą wodnego roztworu kwasu solnego. (Rys. 74 ścieżka **B**) w ten sposób uzyskuje się odpowiedni oligofosforan nukleozydu, który może zostać poddany oczyszczaniu za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie ponownej aktywacji. W tym podejściu synteza wydłużona jest o dodatkowe kroki i oczyszczanie, ale dzięki temu uzyskuje się pewność, że

pożądany nukleotyd nie jest zanieczyszczony pochodną zawierającą resztę fosforanu *N*-propargilowego. (Rys. 74 ścieżka **C**) Jest ona nietrwała i może skutkować odtworzeniem substratu – związku trudnego do odizolowania w dalszych etapach syntezy, ze względu na identyczny ładunek sumaryczny, co produkt oraz identyczny czas retencji w systemie RP HPLC. Jedynym sposobem wykrycia jej obecności jest zastosowanie spektrometrii mas. Związek ten jest szczególnie niepożądany w przypadku syntezy wykorzystującej efekt sekwencyjnej reakcji CuAAC. (por. rozdz. 16.4) Omówiona powyżej synteza została przedstawiona na rysunku Rys. 74.



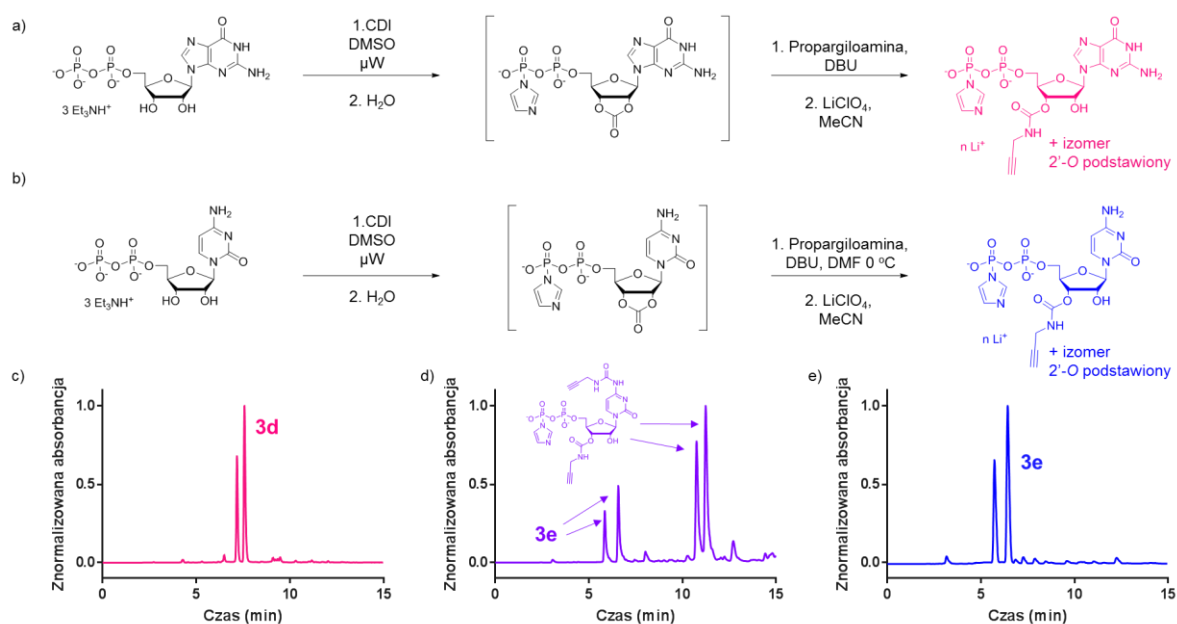
Rys. 74 Synteza *P*-imidazolidów nukleotydów zawierających 2'(3')-*O*-(*N*-propargilo)karbaminian na przykładzie analogów AMP, ADP i ATP.

W przypadku każdej syntezy powstawały izomery podstawione resztą *N*-propargilowego karbaminianu w pozycji atomu tlenu 2'-*O*, bądź w pozycji atomu tlenu 3'-*O*. Różny stosunek ilości powstających w tej reakcji izomerów, wynoszący zwykle około 2:3, może wynikać z przebiegu reakcji tworzenia reszty karbaminianu, podczas której 2',3'-*O*,*O*-węglan nukleotydu otwiera się preferencyjnie poprzez utworzenie bardziej trwałego jonu 2'-*O* alkoksylowego, co zwiększa udział izomeru 3'-*O* podstawionego.¹⁸⁶ Stosunek izomerów między 2'(3')-*O*-karbaminianami nukleotydów jest stały. Możliwe jest wyizolowanie pojedynczych izomerów, jednak w czasie przechowywania (nawet w postaci bezwodnych soli) mają one tendencję do izomeryzacji z przywróceniem zawartości ze stanu równowagi. Reakcję tę znacząco przyspiesza zasadowe środowisko reakcji; przedłużająca się ekspozycja analogu nukleotydu na wysokie pH może również prowadzić do usunięcia reszty karbaminianu i pozostawienia wolnych grup hydroksylowych 2' i 3'.

Opisaną metodę syntezy zastosowałem także do funkcjonalizacji nukleotydów innych niż adeninowe. Dokonałem tego poddając reakcji difosforany guanozyny oraz cytydyny. O ile w przypadku 5'-difosforanu guanozyny reakcja zaszła z wydajnością porównywalną do nukleotydu adeninowego (97%, stosunek izomerów 35:65 2'-*O*-podstawiony:3'-*O*-podstawiony, (Rys. 75 a,c), o tyle w przypadku 5'-difosforanu cytydyny warunki te doprowadziły do powstania izomerów zawierających dodatkowe ugrupowanie *N*-propargilomocznikowe w obrębie zasady azotowej. (Rys. 75 d) Prawdopodobnie wynika to z faktu, że aminowa grupa egzocykliczna cytozyny jest silniejszym nukleofilem, niż analogiczne grupy aminowe w adeninie czy guaninie. W

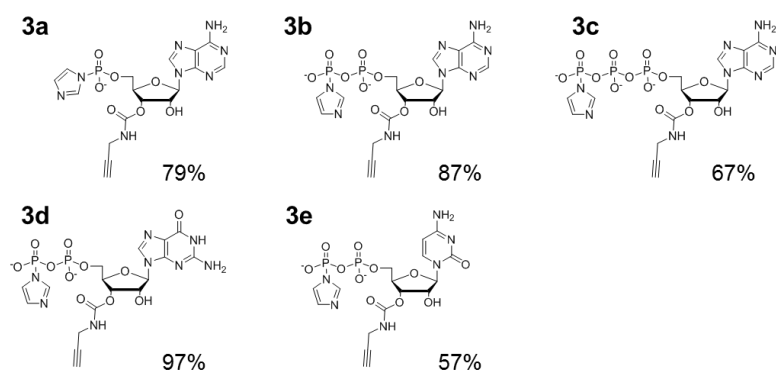
toku badań, okazało się, że jako pierwszy powstaje pożądany produkt, a podstawienie grupy egzocyklicznej zachodzi dopiero po dłuższym czasie trwania reakcji. Reakcja ta biegła jednak zbyt szybko, by możliwe było zbadanie, w którym momencie najkorzystniej jest ją zakończyć, by uzyskać możliwie wysoki stopień konwersji, przy jednoczesnym zminimalizowaniu ilości niepożądanego produktu.

Rozwiązaniem tego problemu okazało się dwukrotne rozcieńczenie reakcji za pomocą DMF i schłodzenie jej do 0 °C. W ten sposób przebieg reakcji niepożądanego został znacząco spowolniony, co pozwoliło ustalić moment, po którym zaczyna powstawać niepożądany produkt i zakończyć reakcję. Zastosowanie tej modyfikacji pozwoliło uzyskać oczekiwany produkt z wydajnością 57%. (Rys. 75 b, e)



Rys. 75 Synteza analogów GDP i CDP z wykorzystaniem opracowanej metody aktywacji nukleotydów

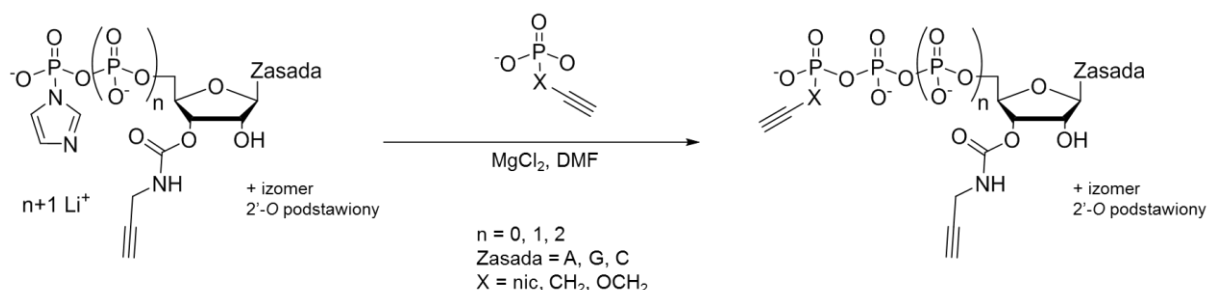
Wszystkie *P*-imidazolidy nukleotydów zawierających 2',3'-O,O-karbaminian zostały ukazane na rysunku poniżej.



Rys. 76 Struktury i wydajności preparatywne osiągnięte w syntezie *P*-imidazolidów nukleotydów z karbaminianem. Nukleotydy zostały przedstawione jako izomery 3', jednak w rzeczywistości występują jako mieszanina izomerów 2' i 3'.

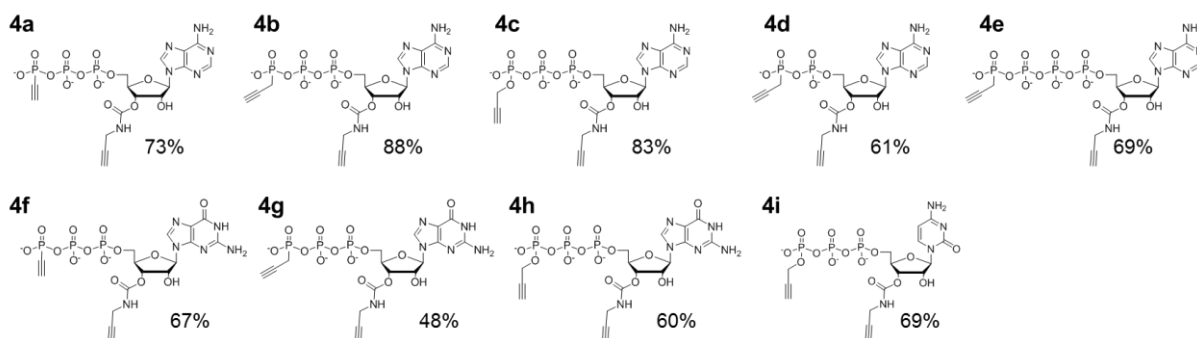
14.6. Synteza nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe w strukturze

Aktywne *P*-imidazolidy nukleotydów mogą być poddawane reakcji sprzęgania z różnymi czynnikami nukleofilowymi (por. rozdział 10.3). W mojej pracy reakcja ta wykorzystywana była w celu uzyskiwania nukleotydów zawierających dwa ugrupowania alkinowe – jedno w obrębie nukleozydu, a drugie w obrębie zasady azotowej. Aktywowany nukleotyd w formie soli litowej oraz odpowiedni C-fosfonian, bądź fosforan propargilu, w postaci soli trietyloamoniowej były rozpuszczane w DMF. Następnie do reakcji dodawany był chlorek magnezu, zwykle w nadmiarze 4 – 8-krotnym w stosunku do substratu nukleotydowego. (Rys. 77) Zazwyczaj czas reakcji nie przekraczał jednej godziny, a oczekiwany produkt był głównym produktem obserwowanym w mieszaninie. Warunki opracowane dla nukleotydu adeninowego z powodzeniem sprawdzały się także w przypadku nukleotydów guanozynowego oraz cytydynowego.



Rys. 77 Uogólniony schemat reakcji sprzęgania aktywowanych nukleotydów z C-fosfonianami oraz fosforanem propargilu. Opracowane warunki były skuteczne dla różnych wariantów zasad azotowych, długości łańcucha oligofosforanowego oraz różnych podjednostek fosforanowych.

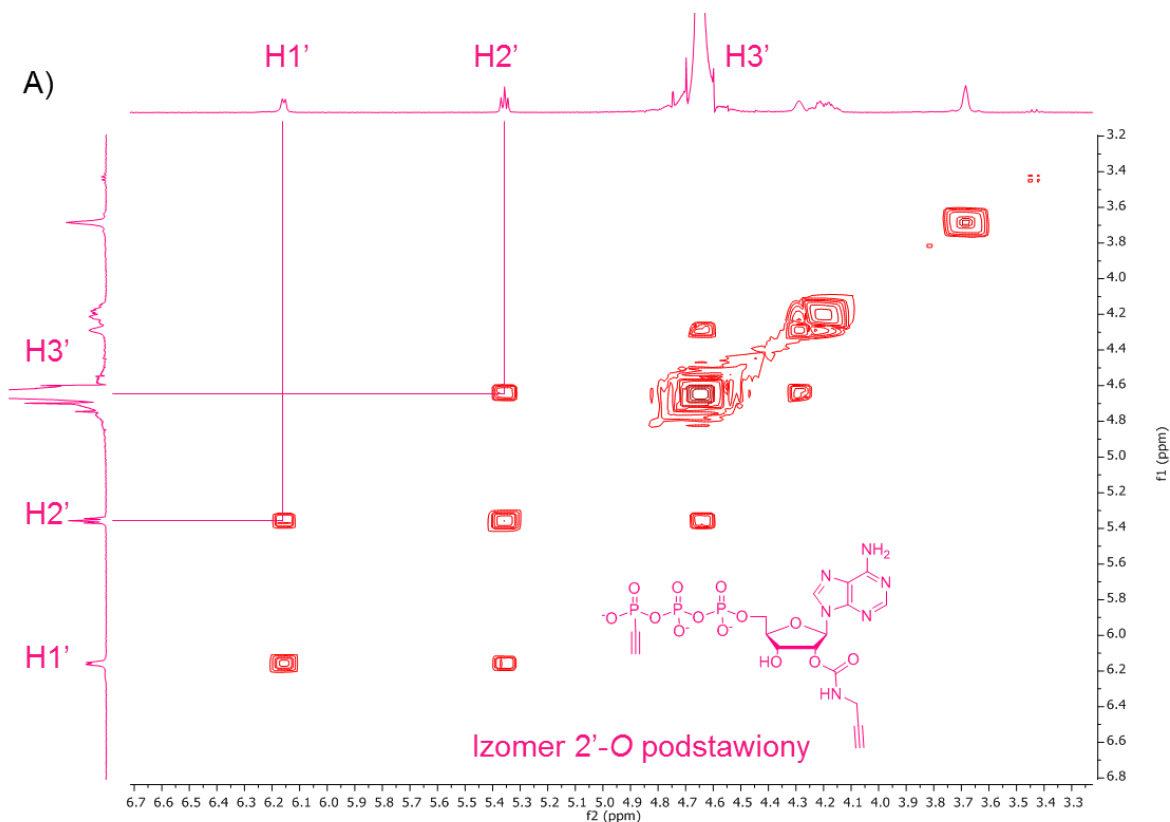
Metoda ta umożliwia więc syntezę nukleotydów o różnych zasadach azotowych. Poniżej zostały przedstawione struktury uzyskanych analogów wraz z wydajnościami preparatywnymi związków.

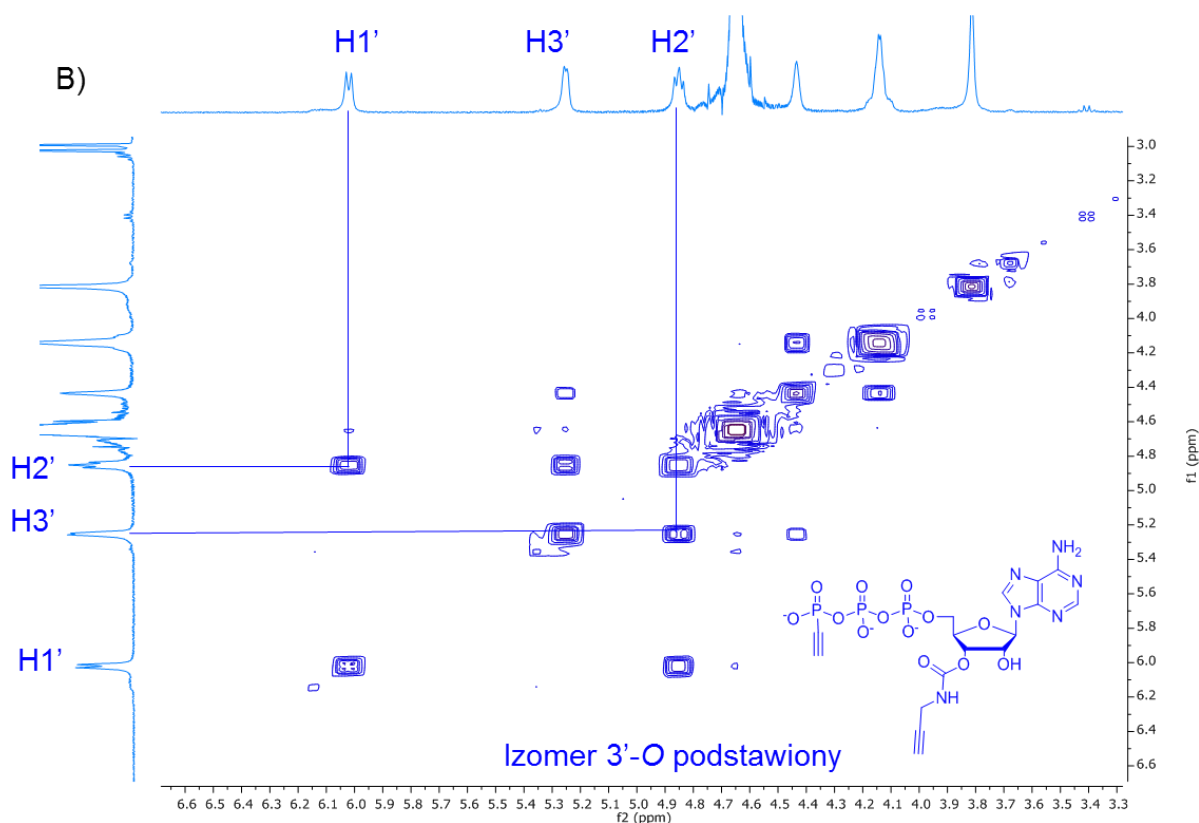


Rys. 78 Struktury związków otrzymanych z użyciem metody opisanej w niniejszym rozdziale. Nukleotydy zostały przedstawione jako izomery 3', jednak w rzeczywistości występują jako mieszanina izomerów 2' i 3'.

W celu ustalenia, który z sygnałów na HPLC odpowiada któremu izomerowi nukleotydu, mieszanina izomerów analogu ATP **4a** została rozdzielona, a następnie dla każdego izomeru nagrano protonowe widmo COSY. (Rys. 79)

Obecność grupy karbaminianowej w pozycji 2'-O lub 3'-O nukleotydu powoduje przesunięcie sygnału odpowiednio 2'H lub 3'H protonu w dół pola. W przypadku izomeru podstawionego w pozycji 3'-O możliwe jest nawet tak mocne przesunięcie sygnału H3', że występuje on w nietypowy dla nukleotydów sposób pomiędzy sygnałami H1' oraz H2' (Rys. 79B). W ten sposób możliwa jest identyfikacja i przyporządkowanie poszczególnych izomerów – izomer o niższym czasie retencji to izomer 2'-O podstawiony, (Rys. 79 A) natomiast ten o dłuższym czasie retencji jest nukleotydem podstawionym w pozycji 3'-O. (Rys. 79 B)

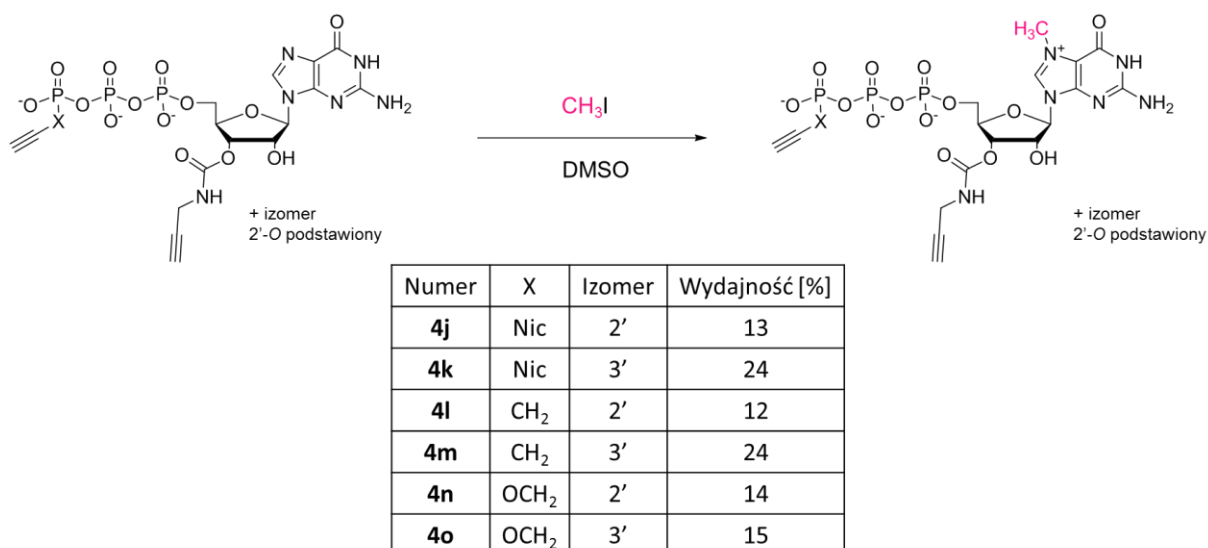




Rys. 79 Porównanie ^1H - ^1H widm COSY izomerów analogu **4a**, 2'-O (A) oraz 3'-O podstawionego (B). W przypadku obecności grupy karbaminianowej w pozycji 3'-O można zaobserwować przesunięcie sygnału od protonu 3'H pomiędzy sygnały pochodzące od protonów 1'H oraz 2'H.

14.7. Dalsze modyfikacje analogów nukleotydów zawierających dwa ugrupowania alkinowe

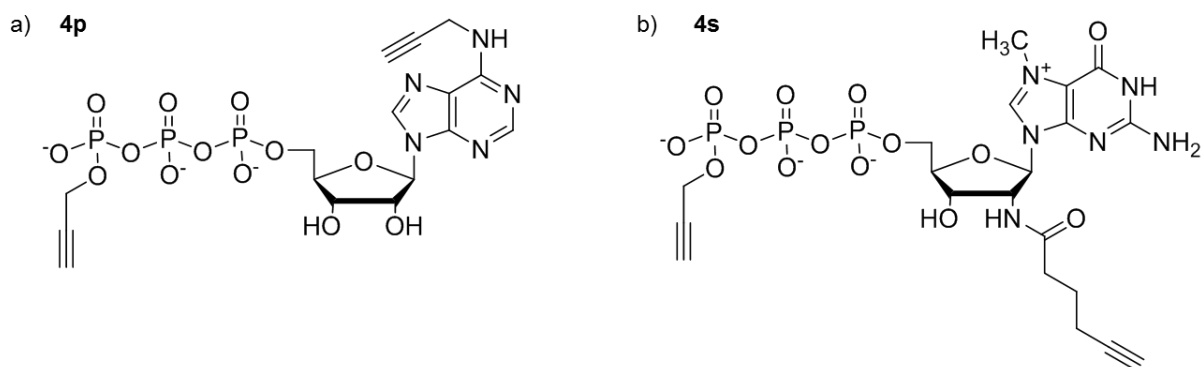
Związki opisane w rozdziale 14.6 są trwałe i mogą być poddawane dalszym modyfikacjom. Przykładem takiej modyfikacji może być reakcja metylowania przeprowadzona na analogu zawierającym zasadę guaninową. Reakcja ta jest prowadzona w DMSO z użyciem 8-krotnego nadmiaru jodku metylu. (Rys. 80) Z uwagi na silną nukleofilowość atomu azotu w pozycji N7 guaniny, w reakcji powstaje jedynie pochodna 7-metyloguaninowa. Ze względu na obecność zmodyfikowanej terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego, nie istnieje ryzyko tzw. „przemetylowania”, czyli przyłączenia grupy metylowej do atomu tlenu jednego z fosforanów. Dzięki temu reakcja może być prowadzona aż do całkowitej konwersji substratu, co maksymalizuje wydajność i ułatwia oczyszczanie produktu. Otrzymane w ten sposób analogi $m^7\text{GTP}$ zostały wykorzystane w syntezie sond przydatnych w badaniu aktywności enzymu DcpS.



Rys. 80 Uogólniony schemat reakcji metylowania analogu GTP.
Otrzymane analogi posłużyły do otrzymania nukleotydowych sond fluorescencyjnych przydatnych w monitorowaniu aktywności enzymu DcpS

14.8. Synteza innych nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe

W toku eksperymentów konieczne okazało się otrzymanie i sprawdzenie reaktywności w reakcji CuAAC nukleotydów, w których grupy alkinowe w obrębie reszty nukleozydu przyłączone są w inny sposób niż za pomocą reszty karbaminianowej. Ze względu na preferencję enzymów, do badania których miały być użyte sondy nukleotydowe, zdecydowano się na nukleotyd zawierający grupę propargilową przyłączoną w pozycji 6 zasady adeninowej, oraz na analog zawierający 7-metyloguaninę, który zawiera grupę aminową zamiast hydroksylowej w pozycji 2', połączoną z resztą 5-heksynową za pomocą wiązania amidowego. (Rys. 81)

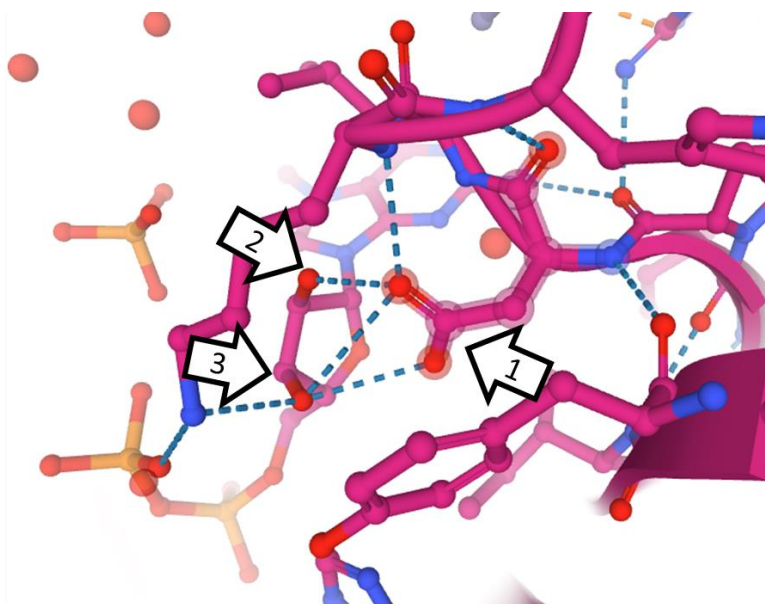


Rys. 81 Struktury dwóch analogów nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe.
a) analog ATP przeznaczony do badań białka FHIT (**4p**),
b) analog m⁷GTP przeznaczony do badań enzymu DcpS (**4s**)

W przypadku sondy przeznaczonej do badania białka FHIT konieczne było zastosowanie nukleotydu z wolnymi grupami hydroksylowymi w pozycji 2'/3'.

Spowodowane jest to sposobem ułożenia nukleotydu w kieszeni wiążącej – wprowadzenie jakiegokolwiek grupy w tej pozycji uniemożliwia rozpoznanie nukleotydu przez enzym. (por. rozdział. 11.2)

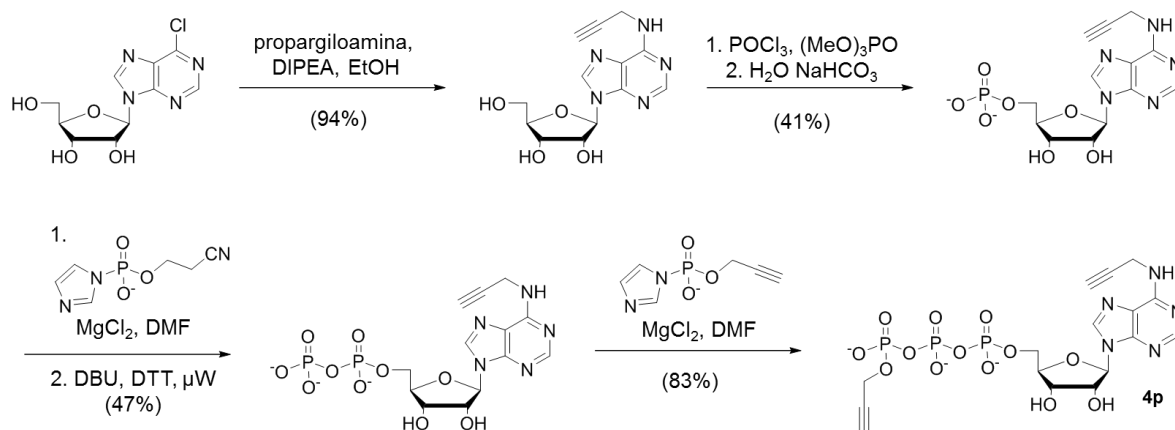
Drugi z opisywanych nukleotydów miał posłużyć jako substrat w syntezie sond do badania enzymu DcpS. Sondy zaproponowane do tej pory (**8h**, **8i**) nie były rozpoznawane przez enzym z powodu braku protonu przy grupie hydroksylowej 2'. Struktura poniżej (Rys. 82) wyjaśnia sposób wiązania nukleotydu do białka. W celu zaistnienia takiego wiązania konieczne jest oddziaływanie wiązaniami wodorowymi pomiędzy grupami hydroksylowymi nukleotydu (na rysunku strzałki 2 i 3), a kwasem asparaginowym [Asp 210] w kieszeni wiążącej (na rysunku strzałka 1).²⁰² Zaproponowane poprzednio struktury nie posiadały protonu hydroksylowego w pozycji 2' lub 3', który był zastąpiony grupą karbaminianową. W celu obejścia tego problemu zaproponowano syntezę nukleotydu zawierającego atom azotu zamiast tlenu w pozycji 2'. W ten sposób możliwe było przyłączenie linkera, bez pozbawienia nukleotydu możliwości utworzenia kluczowego dla oddziaływania wiązania wodorowego.



Rys. 82 Sposób ułożenia nukleotydu w kieszeni wiążącej DcpS i oddziaływanie grup 2' oraz 3' z resztą kwasu asparaginowego [Asp 210]. Struktura zaczerpnięta Chen et al.²⁰² powielone za zgodą wydawcy (nr licencji 4915400154785)

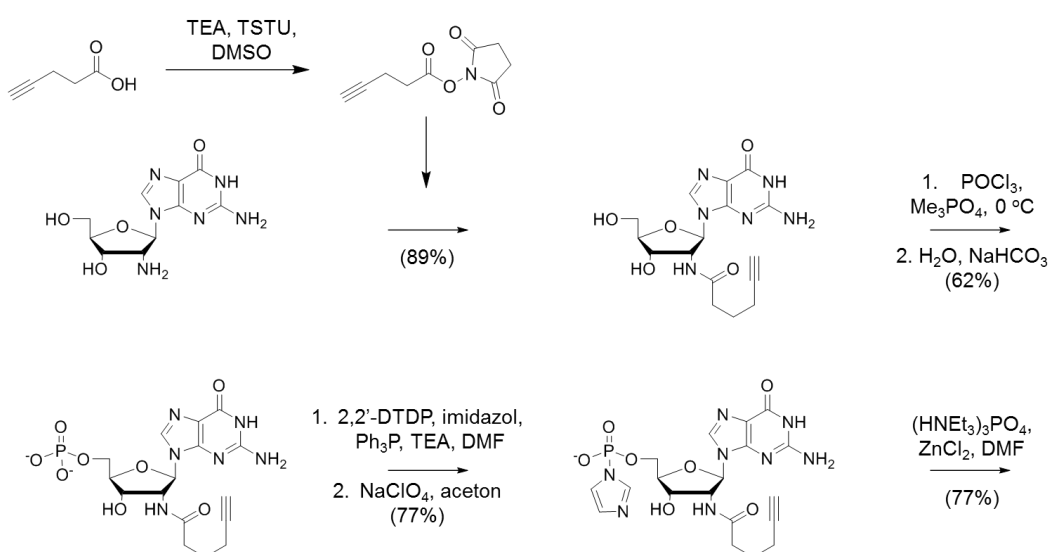
Nukleotyd 6*N*-propargiloadenozynowy otrzymano wychodząc z 6-chloropurynorybozydu. (Rys. 83) Związek ten był poddany reakcji z propargiloaminą w obecności diizopropyletyloaminy (DIPEA) we wrzącym etanolu. 6*N*-propargiloadenozynę uzyskano z wysoką wydajnością, a następnie została ona poddana reakcji fosforylacji Yoshikawy. Synteza difosforanu została wykonana z wykorzystaniem aktywnego *P*-imidazolidu 2-cyanoetylofosforanu¹⁷⁴ w reakcji katalizowanej jonami magnezu w DMF. W ten sposób ominięty został etap aktywacji nukleotydu, co pozwoliło na skrócenie liniowej ścieżki syntezy i podwyższenie ostatecznej wydajności całego procesu. Grupa cyanoetylowa została usunięta bezpośrednio po reakcji sprzęgania z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego, zasady DBU oraz DTT jako *scavengera* eliminowanego akrylonitrylu. Po oczyszczeniu

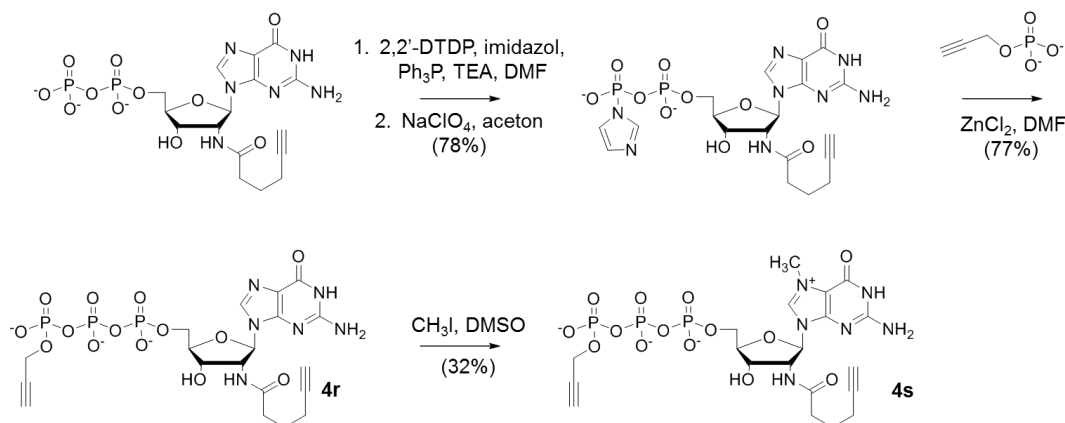
otrzymanego związku za pomocą chromatografii jonowymiennej, wykonano kolejne sprzęganie. Nukleotyd poddany był reakcji z *P*-imidazolidem 2-propargilofosforanu w DMF, w obecności chlorku magnezu jako katalizatora reakcji. Ostatecznie otrzymano pożądany produkt zawierający dwie grupy alkinowe – jedną w pozycji N6 zasady azotowej, a drugą w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego.



Rys. 83 Schemat syntezy analogu ATP **4p**

W przypadku nukleotydu zawierającego 7-metyloguaninę substratem wyjściowym była 2'-amino-2'-deoksyguanozyna. Została ona poddana reakcji z aktywowanym kwasem 5-heksynowym, a następnie fosforylowana metodą Yoshikawy. Otrzymany nukleotyd aktywowano otrzymując *P*-imidazolid, który następnie został poddany sprzęganiu z fosforanem trietyloaminy w reakcji katalizowanej chlorkiem cynku. Po ponownej aktywacji, do nukleotydu przyłączono fosforan propargilu. Produkt końcowy uzyskano poprzez metylowanie analogu GTP za pomocą jodku metylu. (Rys. 84)





Rys. 84 Schemat syntezy analogu **4r** oraz **4s**.

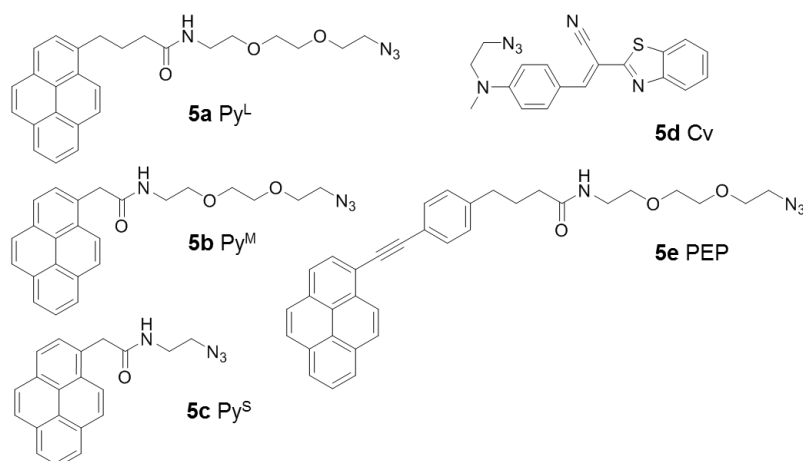
14.9. Podsumowanie rozdziału

W rozdziale 14 zostały przedstawione różnorodne strategie syntezy analogów nukleotydów wykorzystane w niniejszym projekcie doktorskim. Opracowane metody miały na celu doprowadzić do uzyskania pożądaných analogów nukleotydów zawierających dwie funkcje alkinowe w sposób szybki, wydajny i w jak najmniejszej ilości kroków. Postawiony cel został osiągnięty, otrzymano 18 różnych analogów nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe. Wydajności reakcji mieściły się w zakresie 10% – 90%, przy czym najniższe wydajności zostały zaobserwowane w reakcji metylowania nukleotydów guaninowych. W przypadku pozostałych nukleotydów, których nie poddano reakcji metylowania wydajności były znacząco wyższe (min. 48% dla analogu guaninowego, maks. 88% dla analogu adeninowego).

15. Barwniki zawierające azydek

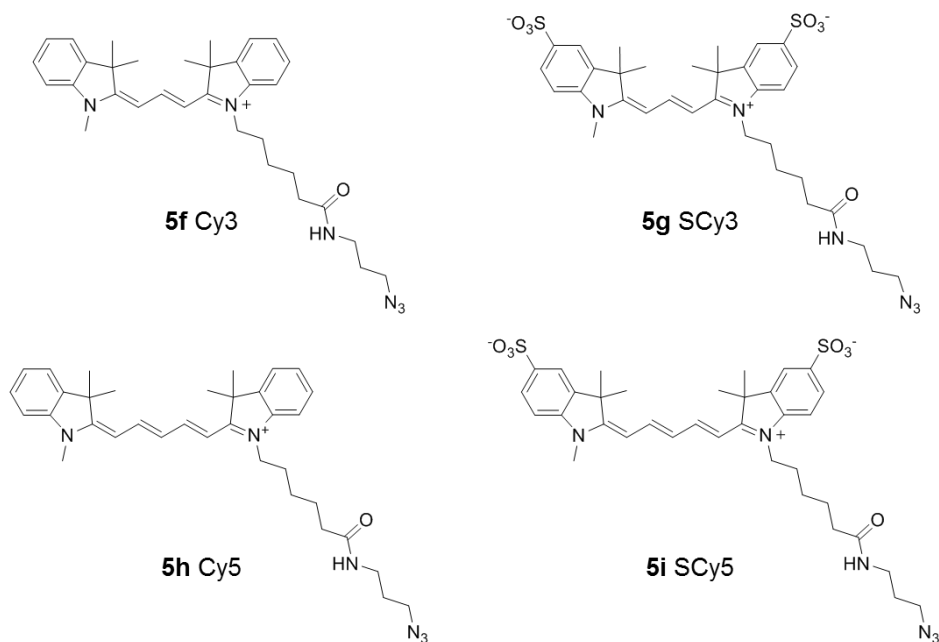
15.1. Wprowadzenie

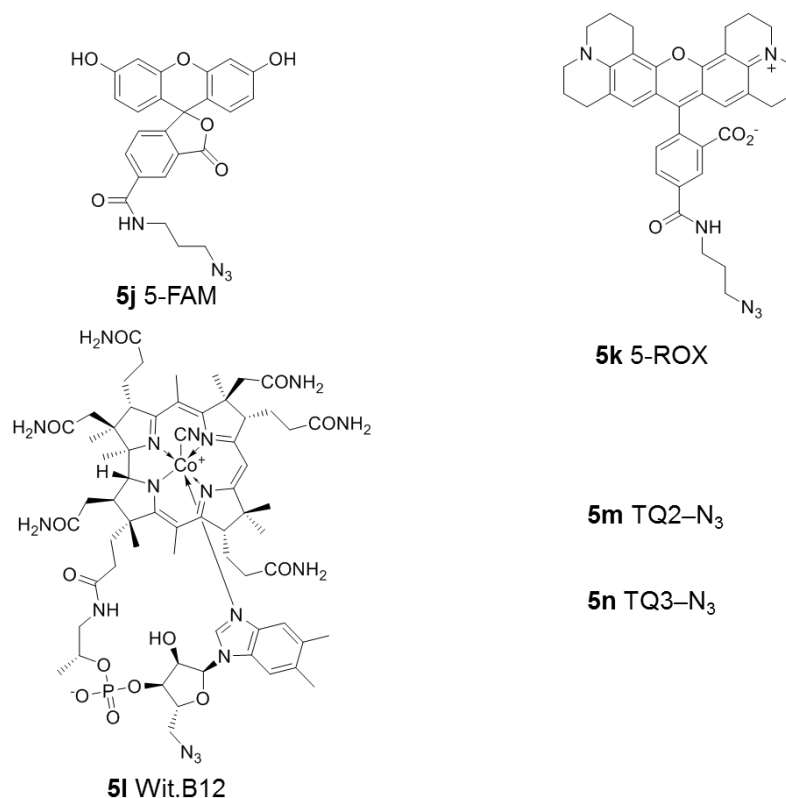
W niniejszej pracy analogi nukleotydów zawierają dwie grupy alkinowe potencjalnie reaktywne w reakcji CuAAC. Drugim substratem niezbędnym do przeprowadzenia tych reakcji są odpowiednie barwniki zawierające azydek. W większości przypadków fluorofory te są dostępne handlowo.



Rys. 85 Barwniki fluorescencyjne użyte w syntezie sond ekscymerowych

W ramach niniejszej pracy konieczne okazało się otrzymanie dwóch fluoroforów wykazujących fluorescencję ekscymerową. Były to *N*-(2-azydoetylo)-2-pirenoacetamid oraz azydkowa pochodna barwnika cyjanowinylenowego.¹¹¹ Wszystkie barwniki fluorescencyjne użyte w ramach niniejszej pracy przedstawiono na Rys. 85 (ekscymerowe) oraz na Rys. 86 (FRET). Struktury wygaszaczy z serii Tide Quencher nie są ujawnione przez firmę, która je wytwarza (znane są jedynie ich wzory sumaryczne).

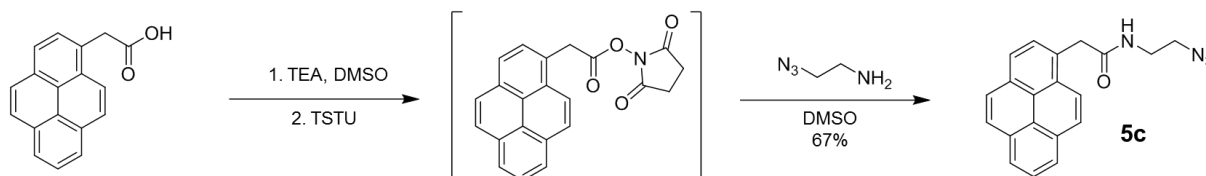




Rys. 86 Barwniki użyte w syntezie sond FRET.

15.2. Pochodna pirenu zawierająca grupę etyloazydkową

Barwnik pirenowy z relatywnie krótkim linkerem był niezbędny do syntezy sond ekscymerowych, umożliwiających zbadanie wpływu odległości pary ekscymerowej od zasady azotowej na intensywność fluorescencji. W tym przypadku wyjściowym substratem był kwas 2-pirenooctowy. Związek ten był optymalny, gdyż linker długości jednej grupy metylenowej ma minimalną długość, a przy tym nie dochodzi do sprzężenia układu π elektronów pirenu z elektronami z grupy kwasowej, co mogłoby znacząco zmieniać właściwości spektralne związku. Kwas 2-pirenooctowy został zaktywowany z użyciem metody NHS. (Rys. 87) Aktywny produkt pośredni bez wydzielania poddano reakcji z 2-azydoetyloaminą. Ostatecznie produkt wyizolowano za pomocą chromatografii silikażelowej, uzyskując wydajność 67%.

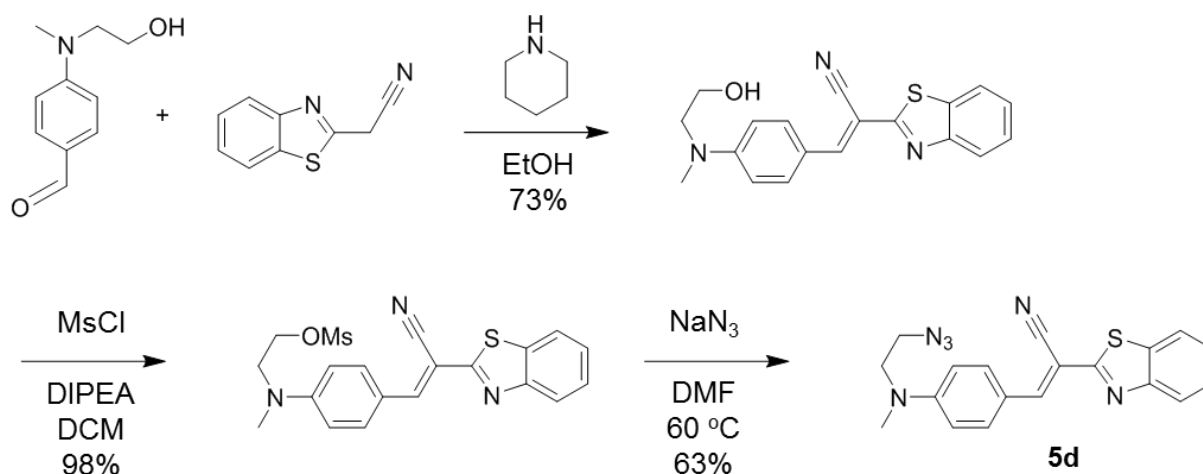


Rys. 87 Schemat syntezy azydkowej pochodnej barwnika pirenowego (**5c**)

15.3. Pochodna barwnika cyjanowinylenowego zawierająca grupę azydkową

Synteza barwnika opisanego w pracy Gao *et al.*¹¹¹ (por. rozdział 7.2) została zmodyfikowana przez zastosowanie substratu aldehydowego z dodatkową grupą *N*-etylohydroksylową zamiast zastosowanego przez autorów 4-(dimetyloamino)-benzaldehydu. (Rys. 88) Reakcja ta była katalizowana piperydyną w etanolu. Trwała 8 godzin, a powstający produkt ulegał wytrąceniu, dzięki czemu możliwe było jego szybkie oczyszczenie przez wirowanie i odmywanie zanieczyszczeń zimnym etanolem. Pomimo obecności dodatkowego linkera, produkt reakcji nie odbiegał właściwościami od tego opisanego w publikacji, co pozwoliło na otrzymanie go podobnymi metodami i z porównywalną do opisanej wydajnością 73%.

Otrzymany barwnik został przekształcony w odpowiedni mesylan. Związek ten został wyekstrahowany z mieszaniny i poddany reakcji z azydkiem sodu w DMF w podwyższonej temperaturze. Ostateczny produkt został wyizolowany technikami chromatograficznymi i przeznaczony do reakcji z analogami nukleotydów.



Rys. 88 Schemat zmodyfikowanej syntezy barwnika cyjanowinylenowego (**5d**)

16. Reakcja CuAAC w procesie otrzymywania sond nukleotydowych

16.1. Wprowadzenie

Wszystkie otrzymane nukleotydy zawierają grupy alkinowe, natomiast opisane barwniki zawierają ugrupowanie azydkowe. Podstawą syntez sond nukleotydowych opisanych w niniejszej pracy jest reakcja CuAAC (por. rozdział 9.2). Reakcja ta została wybrana ze względu na jej właściwości. Po pierwsze jest to reakcja ortogonalna wobec

wielu grup funkcyjnych występujących w nukleotydach i barwnikach fluorescencyjnych. Jest to szczególnie istotne, gdyż w samym nukleotydzie występują grupy funkcyjne o różnej reaktywności – grupy aminowe, karbonylowe, hydroksylowe, czy fosforanowe. Również różnorodność stosowanych fluoroforów przekłada się na mnogość grup funkcyjnych, które mogą one zawierać. Z tego względu wybór pary alkin terminalny – azydek, która nie występuje w związkach naturalnych, wydaje się trafny. Po drugie, reakcja ta jest możliwa do przeprowadzenia w wodzie, w szczególności woda nie przeszkadza w przebiegu tej reakcji. Dla nukleotydów, które są cząsteczkami bardzo hydrofilowymi jest to więc bardzo dobry wybór. Opisywane w poprzednim rozdziale (por. rozdz. 14) syntezy były prowadzone w rozpuszczalnikach organicznych, a nukleotydy musiały w nich występować w formie soli trietyloamoniowej – jednej z nielicznych soli, które są rozpuszczalne w takim środowisku reakcji. Przeprowadzenie reakcji w wodzie to znaczące ułatwienie syntezy i brak konieczności wymiany kationu nukleotydu. Kolejnym aspektem jest wydajność. Produkty reakcji CuAAC powstają zazwyczaj z bardzo wysoką wydajnością, co jest szczególnie istotne ze względu na koszt otrzymania modyfikowanych nukleotydów, czy też fluoroforów. Ponadto, w reakcji tej powstaje zawsze jeden i ten sam izomer produktu (zawierający podstawione ugrupowanie 1,4-triazolowe). Przekłada się to na zwiększenie wydajności i brak konieczności pracochłonnego oczyszczania bardzo podobnych chemicznie produktów.

W pierwszym podejściu reakcja CuAAC została opracowana dla nukleotydów zawierających jedną grupę alkinową, doświadczenia wynikające z tych eksperymentów zostały później zastosowane w syntezie nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe.

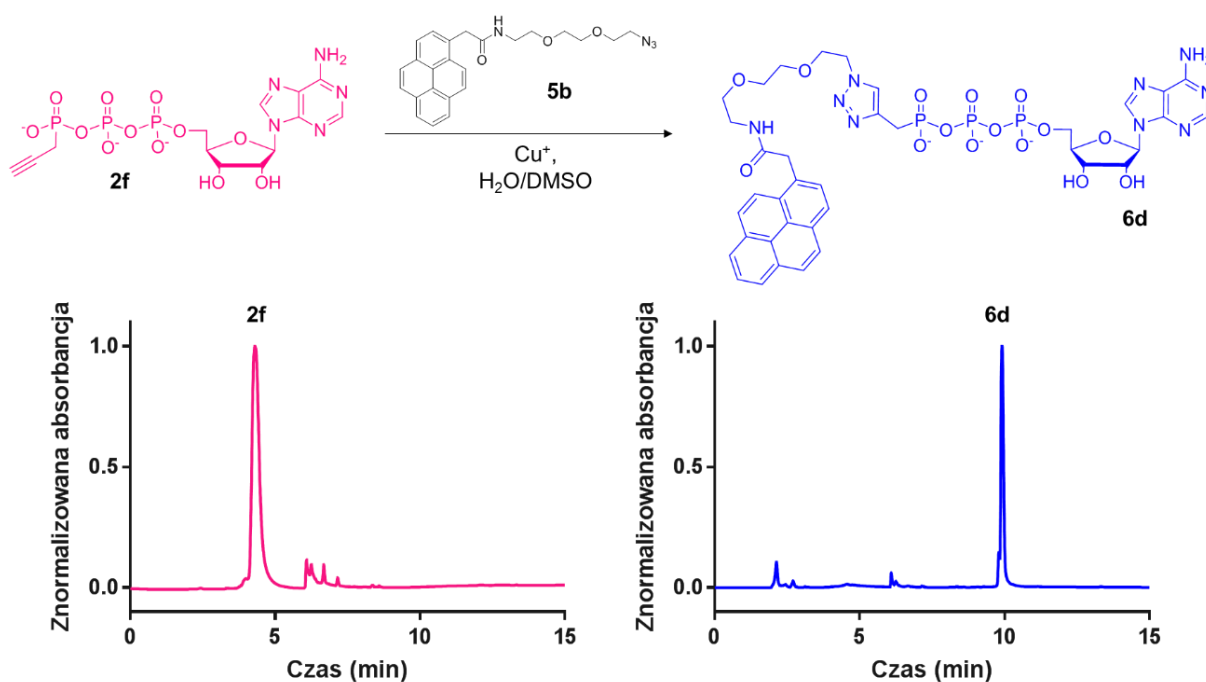
16.2. Nukleotydy z pojedynczą grupą alkinową w reakcji CuAAC

W pierwszym podejściu zoptymalizowane zostały warunki reakcji nukleotydów zawierających grupę alkinową w obrębie terminalnej reszty fosforanowej. W skalach reakcji stosowanych w ramach niniejszej pracy najlepsze efekty uzyskiwano poprzez sporządzanie roztworów substratów i używanie ich do reakcji. Roztwory nukleotydów sporządzano w wodzie, natomiast reagentów azydkowych w rozpuszczalnikach organicznych. W zależności od reakcji były to *tert*-butanol, DMF lub DMSO. Przedział stężeń roztworów wyjściowych nukleotydów i substratów azydkowych wahał się w zależności od reakcji między 0,4 M i 1,0 M. Stosunek substratu azydkowego do nukleotydu wynosił między 1 a 1,5 równoważnika molowego.

W reakcjach CuAAC katalizator otrzymywano *in situ* na drodze redukcji jonu $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$. Redukcji tej dokonywano poprzez połączenie wodnych roztworów siarczanu (VI) miedzi (II) oraz askorbinianu sodu. W tym przypadku stężenia wyjściowych soli wynosiły od 1,0 M do 2,0 M, w zależności od reakcji.

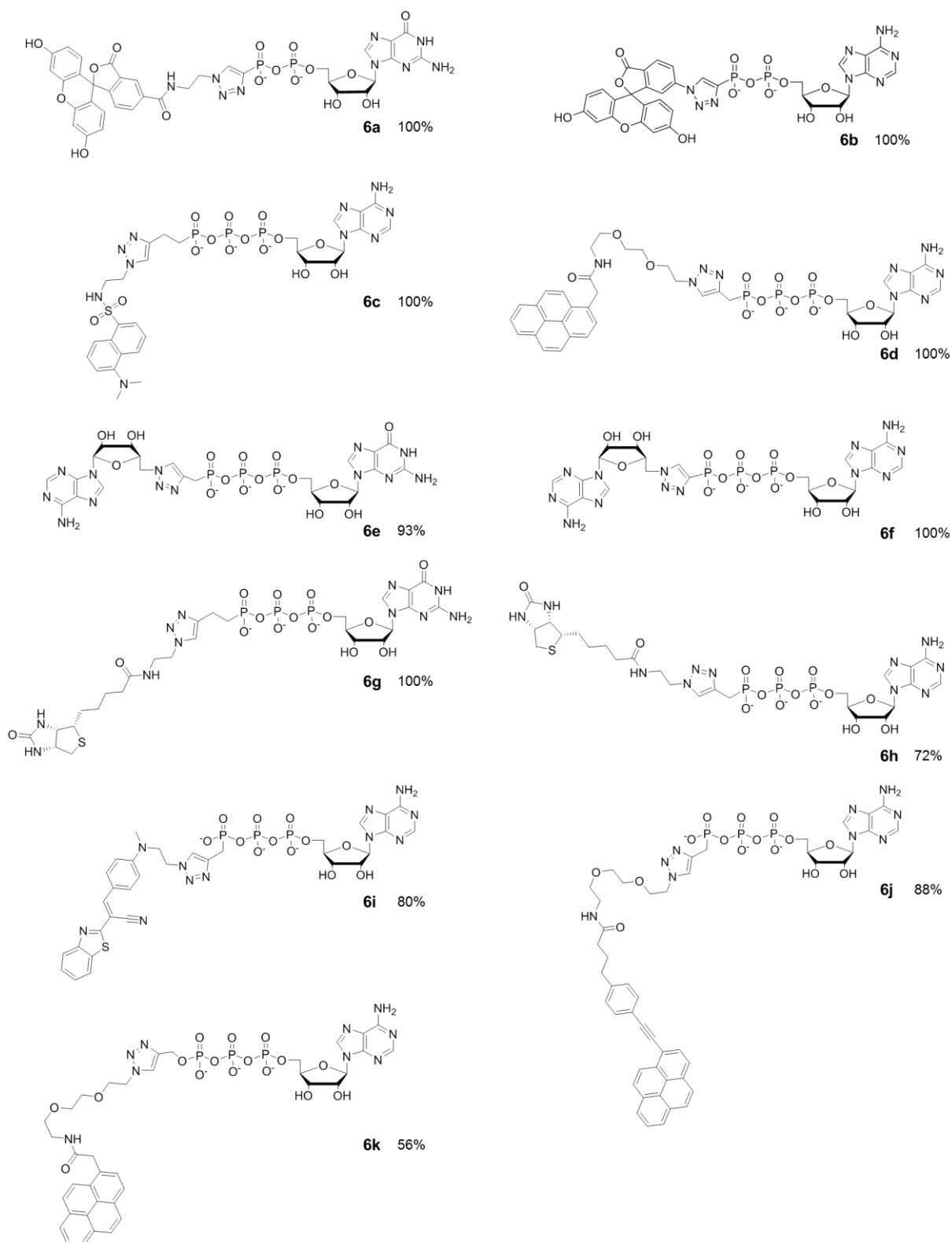
Opracowana procedura zakładała połączenie roztworów nukleotydu i substratu azydkowego, wprowadzenie roztworu siarczanu miedzi, a następnie rozpoczęcie

reakcji poprzez dodanie roztworu askorbinianu sodu. Przy połączeniu roztworu reagentów azydkowego i alkinowego możliwe jest zaobserwowanie czy wodny roztwór nukleotydu nie powoduje wytrącenia się zwykle bardziej lipofilowego substratu azydkowego. Jeśli po zmieszaniu nie obserwuje się żadnego osadu, możliwe jest dodanie roztworu siarczanu miedzi. W tym przypadku również może dojść do wytrącenia reagentu azydkowego, co na tym etapie może zostać jeszcze naprawione przez rozcieńczenie mieszaniny za pomocą rozpuszczalnika organicznego. Reakcja zostaje rozpoczęta poprzez dodanie roztworu askorbinianu sodu. Takie podejście minimalizuje ekspozycję podatnego na utlenienie jonu miedzi (I) na tlen atmosferyczny. Dodatkowym zabezpieczeniem może być prowadzenie reakcji w atmosferze argonu. Zwykle reakcja przeprowadzona w tych warunkach trwała 45 – 60 minut, skutkując 100% konwersją. Reprezentatywny chromatogram obrazujący stan reakcji przed jej rozpoczęciem i po jej zakończeniu został przedstawiony poniżej. (Rys. 89) Dominującym produktem obecnym w mieszaninie reakcyjnej zawsze był produkt oczekiwany.



Rys. 89 Chromatogram reakcji azydkowej pochodnej pirenu z analogiem nukleotydu zawierającym C-fosfonian etynyłowy w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego. W toku reakcji cały substrat nukleotydowy ulegał konwersji do produktu. Po reakcji pożądany produkt był dominującym produktem w mieszaninie reakcyjnej.

Poniżej zaprezentowano wybrane znakowane nukleotydy i inne addukty otrzymane z użyciem opisanej metody.



Rys. 90 Struktury niektórych nukleotydów pojedynczo znakowanych otrzymanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Przedstawione struktury koniugatów zostały otrzymane jako dowód przydatności opracowanej metody. Z uwagi na interesujące właściwości sond zawierających dwa znaczniki oddziałujące ze sobą na sposób FRET, bądź też tworzące ekscymery, nukleotydy pojedynczo znakowane nie były badane w eksperymentach biologicznych.

Niemniej jednak opracowane metody syntezy, a także związki otrzymane w ramach niniejszej pracy zostały wykorzystane w innych projektach. Były to m. in. projekt dotyczący opracowania szybkiej metody syntezy nowych analogów 5' końca mRNA (kapu) przedstawiony w pracach Walczak et al.^{203, 204} W pracach tych wykorzystano różne analogi zawierające grupę alkinową w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego. Zastosowanie reakcji CuAAC umożliwiło syntezę bardzo dużej liczby analogów kapu zawierających triazol wewnątrz łańcucha oligonukleotydowego w krótkim czasie i z wysokimi wydajnościami, co przy wcześniejszym podejściu zakładającym sprzęganie ze sobą dwóch nukleotydów nie byłoby możliwe.

Innym przykładem zastosowania przedstawionych tutaj związków jest praca Kozarski et al.,²⁰⁵ w której wykorzystano przedstawione C-fosfoniany w celu syntezy analogów nukleotydów zawierających triazol pomiędzy nukleozydem, a analogiem 5' fosforanu. W ten sposób możliwe było uzyskanie pierwszego małowcząsteczkowego inhibitora białka cNIIIB. Ponadto, w badaniu powinowactwa otrzymanych inhibitorów do białka cNIIIB wykorzystano sondę-koniugat analogu 5'-difosforanu 7-metyloguanozyny z fluoresceiną, otrzymaną z wykorzystaniem metody opracowanej w ramach niniejszej pracy.

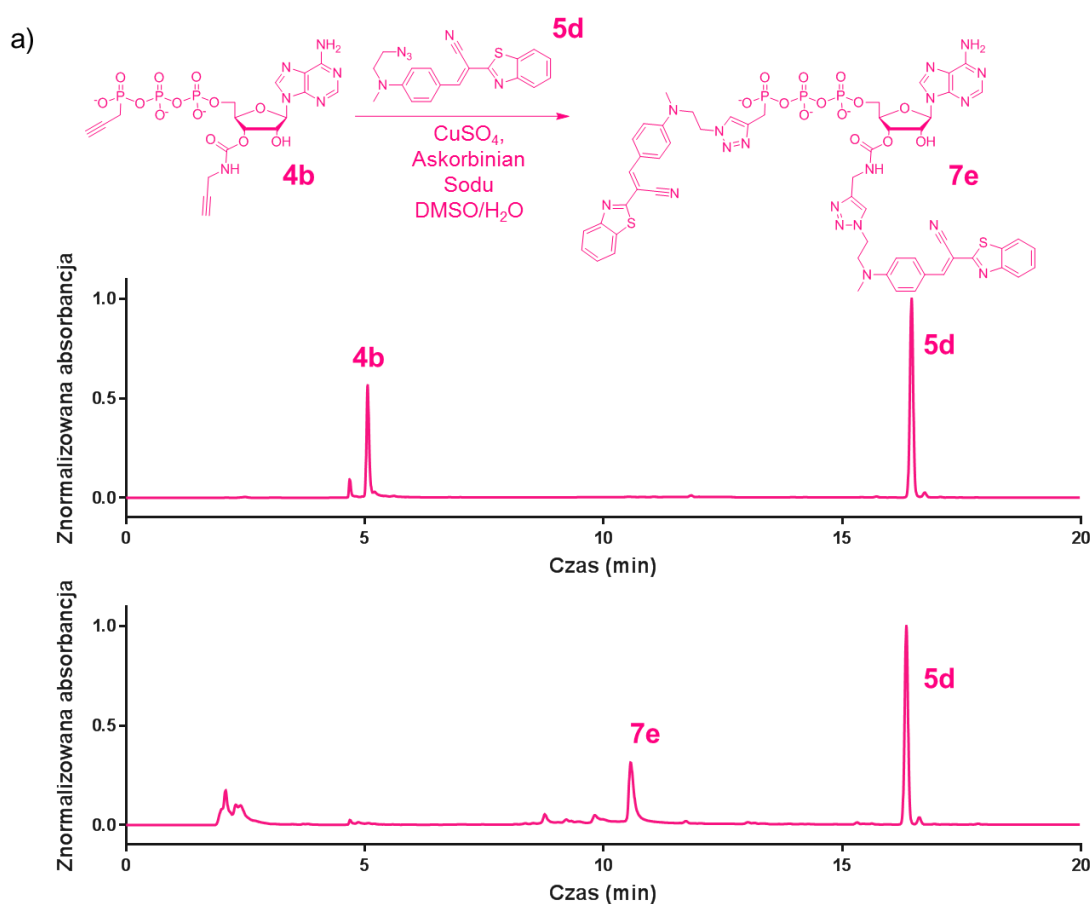
Metoda syntezy analogów nukleotydów znakowanych w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego została też wykorzystana do syntezy sond fluorescencyjnych ukazanej w pracy Kasprzyk et al.²⁰⁶ W pracy tej wykorzystano analog trifosforanu 7-metyloguanozyny znakowany pirenem w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego. Sonda taka wykazywała ponad 30-krotne zwiększenie emisji fluorescencji pirenu pod wpływem wiązania z enzymem DcpS, w porównaniu do emisji fluorescencji sondy niezwiązanej. Dzięki tej właściwości mogła posłużyć do pomiaru aktywności enzymu DcpS w czasie, a także do szybkiego wyznaczania wartości IC₅₀ różnych inhibitorów tego białka.

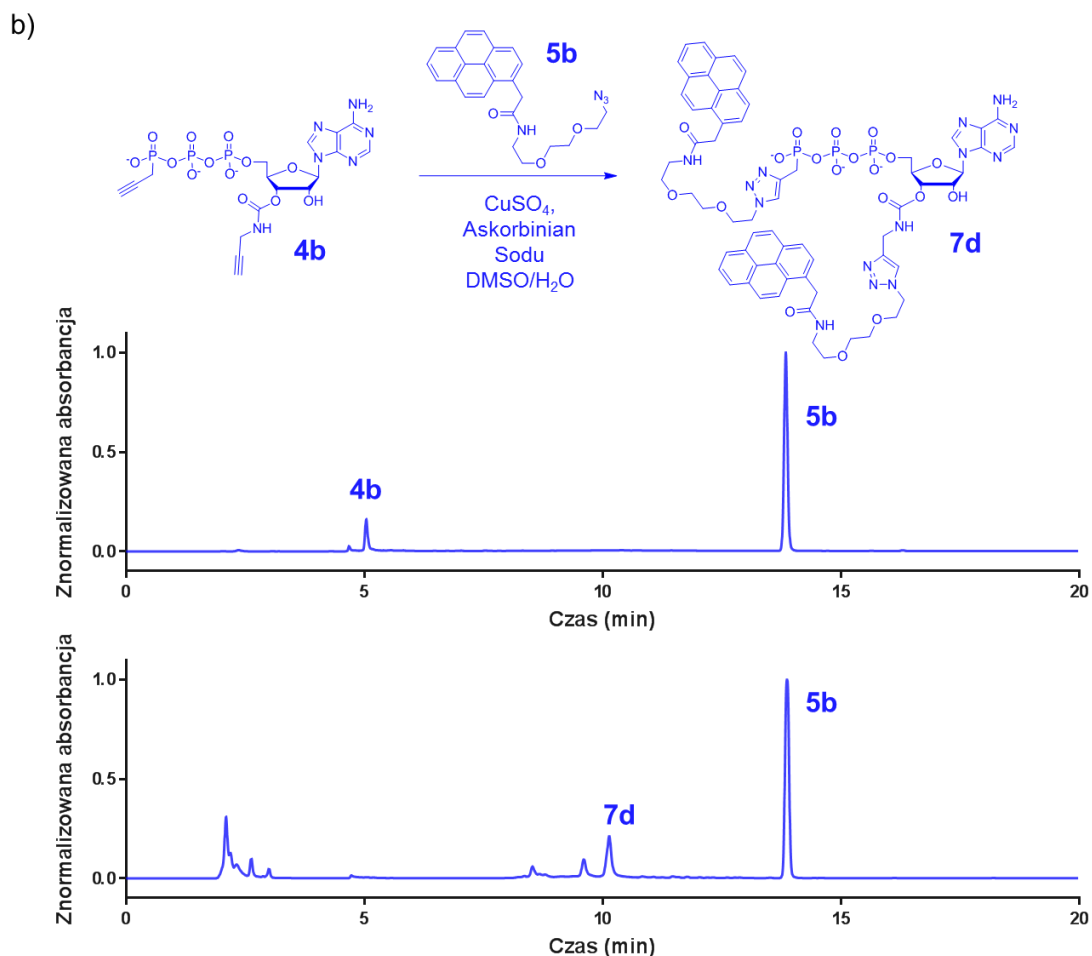
16.3. Nukleotydy z dwiema grupami alkinowymi w reakcji z dwoma jednakowymi reagentami azydkowymi – synteza sond ekscymerowych

Nukleotydowe sondy ekscymerowe to analogi nukleotydów, do których przyłączono dwa identyczne barwniki wykazujące fluorescencję ekscymerową. Do ich syntezy zostały wykorzystane nukleotydy zawierające dwie grupy alkinowe (**4a-o**) – jedną w obrębie rybozy, druga natomiast w obrębie terminalnej reszty fosforanu. W zastosowanym podejściu nukleotydy te zostały poddane podwójnej reakcji CuAAC z nadmiarem barwnika fluorescencyjnego zawierającego grupę azydkową. Podejście takie znacząco uprościło syntezę i umożliwiło otrzymanie pożądaných sond w jednej reakcji CuAAC.

Nukleotydy adenozynowy, cytydynowy, oraz guanozynowy były używane w reakcji CuAAC jako mieszanina izomerów 2',3'. Nukleotydy zawierające 7-metyloguanozynę były rozdzielane na poszczególne izomery 2' i 3' oraz poddawane reakcji CuAAC jako czyste izomery.

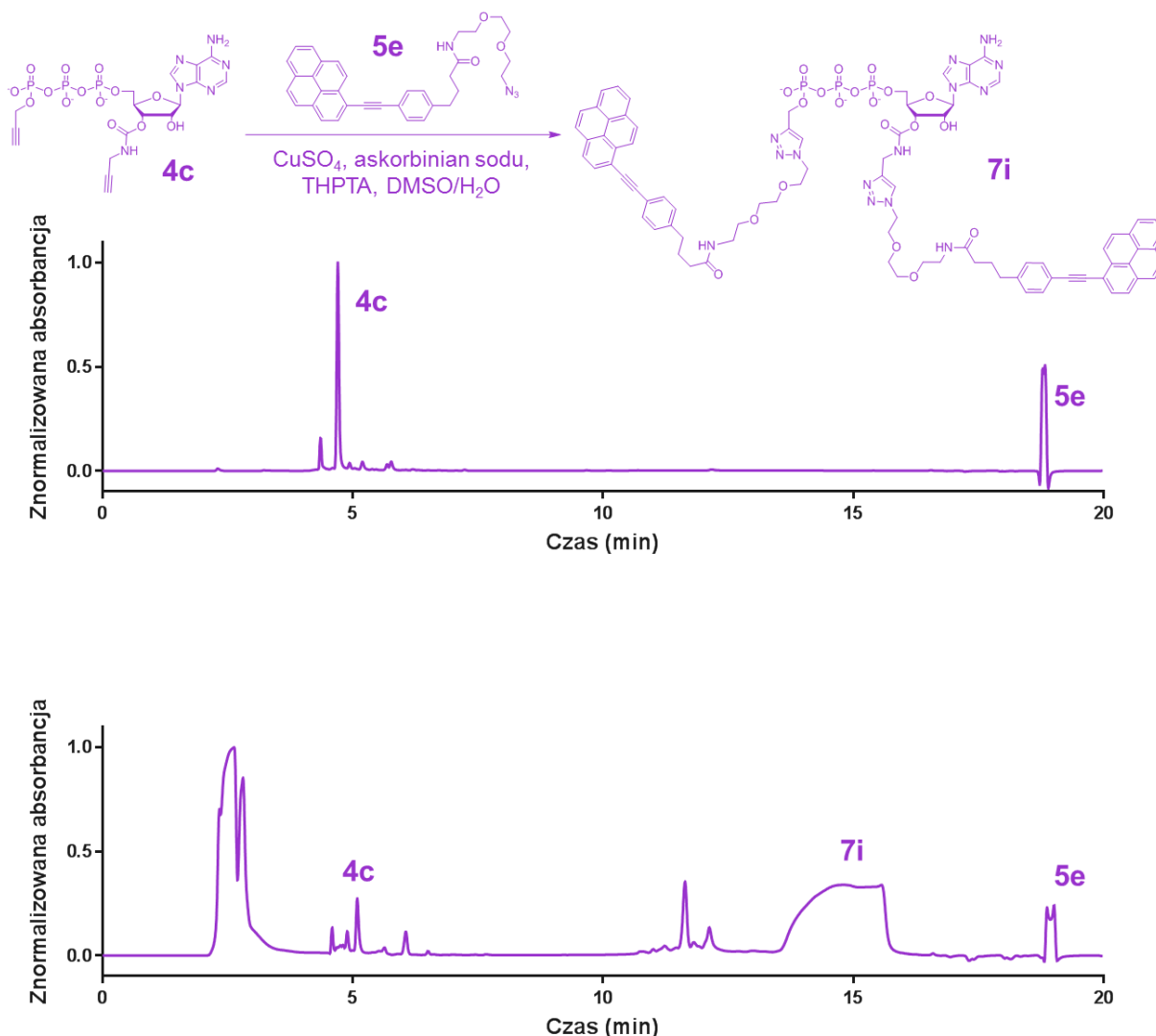
Doświadczenia zdobyte w syntezie nukleotydów pojedynczo znakowanych znacząco ułatwiły opracowanie skutecznej syntezy sond ekscymerowych. Z uwagi na hydrofobowość fluoroforów ekscymerowych, proporcja rozpuszczalników została zmieniona znacząco na korzyść rozpuszczalnika organicznego (DMSO) i oscylowała w granicach od około 22% wody (dla najbardziej hydrofilowego barwnika cyjanowinylowego (**5d**)) do około 12% wody (dla najbardziej hydrofobowego fenyloetynylopirenu (**5e**)). Nadmiar barwnika w stosunku do analogu nukleotydu ustalono na 3-krotnie wyższy. Katalizator – jon miedzi (I) generowany był *in situ* poprzez dodanie kolejno wodnych roztworów siarczanu miedzi oraz askorbinianu sodu do mieszaniny substratów. Reakcja trwająca między 1 – 3 h pozwoliła otrzymać z sondy zawierające barwniki pirenowe i cyjanowinylowe z wydajnościami w granicach 30 – 99%. (Rys. 91)





Rys. 91 Przykładowe chromatogramy z reakcji otrzymywania sond ekscymerowych z barwnikiem cyjanowinylowym (a), oraz z pirenem (b). Sygnał pochodzący od pożądanej sondy jest sygnałem dominującym w obrazie reakcji (nie licząc sygnału nadmiaru barwnika)
Sygnał o czasie retencji $t_R = 2,5$ min pochodzi od kompleksów miedziowych z EDTA.

Reakcje nukleotydów z barwnikiem fenyloetynylopirenowym w opisanych warunkach skutkowały jedynie pojedynczo podstawionym nukleotydem – badanie za pomocą spektrometrii mas pozwoliło dowieść, że jest to produkt podstawiony w obrębie grupy alkinowej przyłączonej do reszty terminalnego fosforanu. Aby możliwe było pełne przereagowanie substratu, konieczna była zmiana warunków reakcji. Po pierwsze, nadmiar barwnika ustalono na 5-krotny wobec stężenia analogu nukleotydu. Kolejną modyfikacją było zastosowanie 4-krotnie wyższego stężenia jonów miedzi oraz askorbinianu sodu w odniesieniu do standardowych warunków reakcji. Ponadto do reakcji wprowadzono ligand THPTA (por. rozdz. 9). W ten sposób możliwe było uzyskanie sond zawierających dwie reszty fenyloetynylopirenowe z wydajnościami w granicach 85 – 95%. (Rys. 92)



Rys. 92 Chromatogramy mieszaniny reakcyjnej przed i po reakcji nukleotydu z fenyletynylopirenem. Kształty sygnałów barwnika oraz sondy, która go zawiera obrazują, że jest on bardzo hydrofobowy i badanie tych reakcji w układzie odwróconych faz może być utrudnione. Duży sygnał o czasie retencji $t_R = 2,5$ min pochodzi od kompleksów miedziowych z EDTA.

Opracowana metoda okazała się uniwersalna w kontekście nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe. Została ona wykorzystana w syntezie 19 nowych sond nukleotydowych, zawierających różne reszty C-fosfonianu, bądź fosforanu propargilu w terminalnej pozycji reszty fosforanu, różne zasady azotowe i różne barwniki. Poniżej zaprezentowano związki otrzymane za pomocą opisywanej metody (Tabela 1). Sondy zawierające 7-metyloguaninę (**7j-r**) zostały otrzymane przez mgr. Michała Kopciała z Laboratorium Chemii Bioorganicznej UW. Zostały one tutaj pokazane, aby dowieść, że warunki reakcji opracowane w ramach niniejszej pracy są odpowiednie dla nukleotydów zawierających różne zasady azotowe.

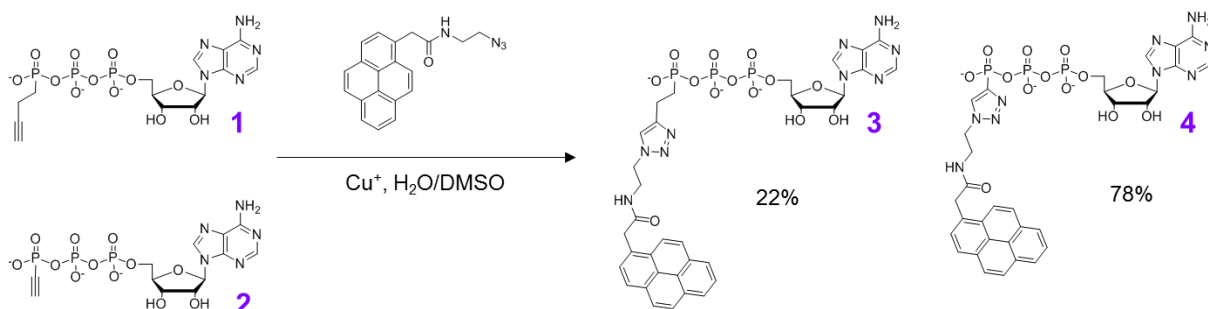
Tabela 1

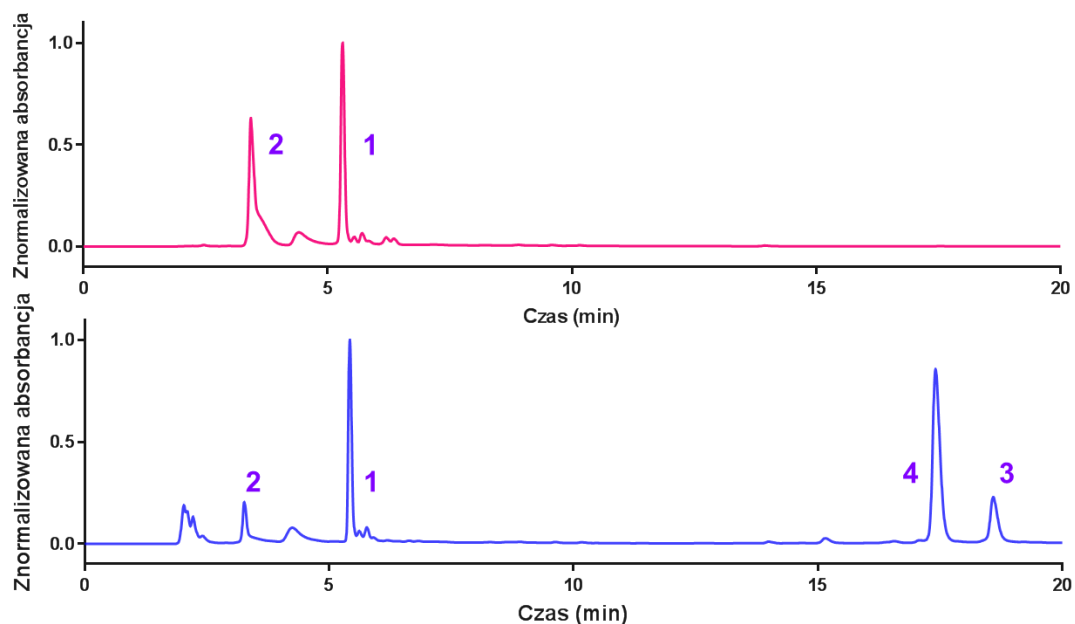
R = Py^L Cv Py^M PEP Py^S											
Numer	Zasada	X	R	Izomer	Wydajność [%]	Numer	Zasada	X	R	Izomer	Wydajność [%]
7a	Ade	nic	Py ^M	2'+3'	77	7k	m ⁷ Gua	nic	Py ^M	3'	60
7b	Ade	nic	Cv	2'+3'	63	7l	m ⁷ Gua	CH ₂	Py ^M	2'	28
7c	Ade	CH ₂	Py ^M	2'+3'	73	7m	m ⁷ Gua	CH ₂	Py ^M	3'	89
7d	Ade	CH ₂	PEP	2'+3'	91	7n	m ⁷ Gua	OCH ₂	Py ^M	2'	53
7e	Ade	CH ₂	Cv	2'+3'	78	7o	m ⁷ Gua	OCH ₂	Py ^M	3'	72
7f	Ade	OCH ₂	Py ^M	2'+3'	75	7p	m ⁷ Gua	OCH ₂	Py ^L	2'	72
7g	Ade	OCH ₂	Py ^S	2'+3'	61	7r	m ⁷ Gua	OCH ₂	PEP	2'	95
7h	Ade	OCH ₂	Py ^L	2'+3'	69	7s	Cyt	OCH ₂	Py ^M	2'+3'	52
7i	Ade	OCH ₂	PEP	2'+3'	85	7t	Gua	OCH ₂	Py ^M	2'+3'	26
7j	m ⁷ Gua	nic	Py ^M	2'	100						

16.4. Różnica reaktywności grup alkinowych pozostających w różnym otoczeniu chemicznym i synteza sond zawierających dwa różne fluorofory

Nietypowy alkin jakim jest C-fosfonian etynylowy charakteryzuje się bezpośrednim sąsiedztwem potrójnego wiązania i reszty fosforylowej. Z powodu obecności grupy wyciągającej elektrony, alkin ten jest ubogi w elektrony, przez co łatwiej może ulegać deprotonacji i tworzyć sole z jonem miedzi (I). Sprzyja to jego reaktywności w reakcji CuAAC. Aby sprawdzić słuszność tego rozumowania przeprowadzono eksperyment kompetycyjny w reakcji CuAAC dwóch nukleotydów z jednym barwnikiem azydkowym w stosunku 1:1:1. Nukleotydy te były C-fosfonianowymi analogami ATP, różniącymi się między sobą resztą C-fosfonianową w obrębie terminalnego fosforanu. Pierwszy zawierał C-fosfonian etynylowy, drugi natomiast C-fosfonian 3-butynylowy, który pomiędzy resztą fosforylu i grupą alkinową zawiera dwie grupy metylenowe. Testowym substratem azydkowym był *N*-(2-azydoetylo)-2-pirenoacetamid (por. rozdz. 15.2). Związek ten został wybrany ze względu na swoją znaczącą hydrofobowość, dzięki której produkty można było łatwo oddzielić od substratów, a także od siebie nawzajem.

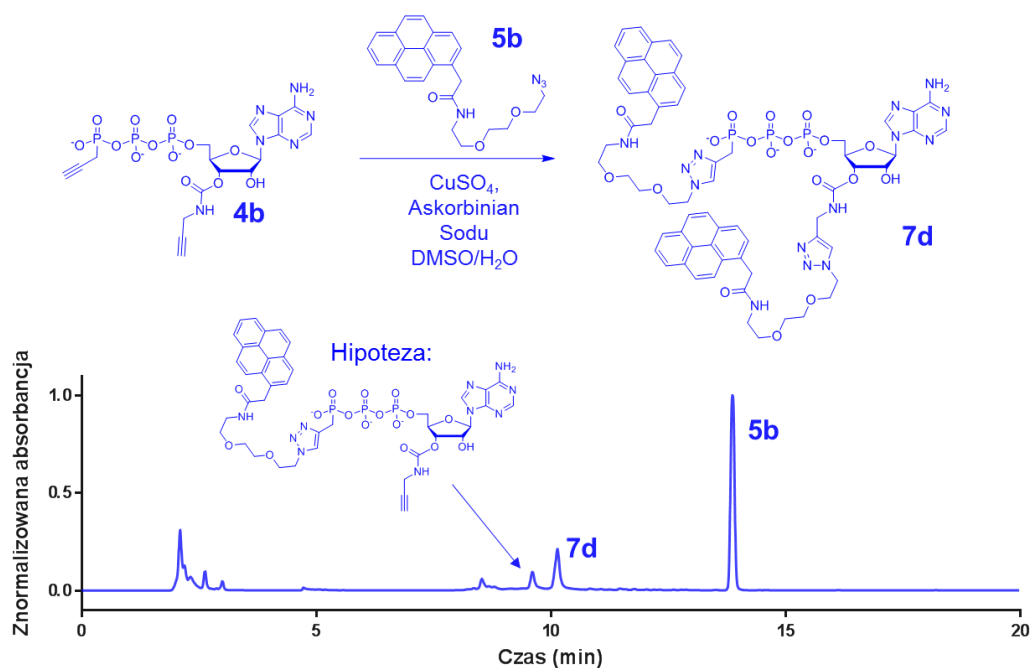
Reakcję prowadzono przez 1 godzinę przy zastosowaniu standardowych warunków reakcji CuAAC (0,1 równoważnika molowy CuSO_4 i 0,4 równoważnika molowego askorbinianu sodu) w mieszaninie DMSO i wody (odpowiednio 74/26). Po tym czasie mieszanina reakcyjna została zbadana. Stwierdzono, że produkt powstały z nukleotydu zawierającego C-fosfonian etynylowy to 78% produktów, podczas gdy produkt powstały z nukleotydu zawierającego C-fosfonian 3-butynylowy to tylko 22% sumy produktów. (Rys. 93) Potwierdziło to hipotezę, że grupa alkinowa będąca w bezpośrednim sąsiedztwie łańcucha oligofosforanowego ma zwiększoną reaktywność w reakcji CuAAC w stosunku do grup alkinowych niezawierających grup wyciągających elektrony w swoim sąsiedztwie

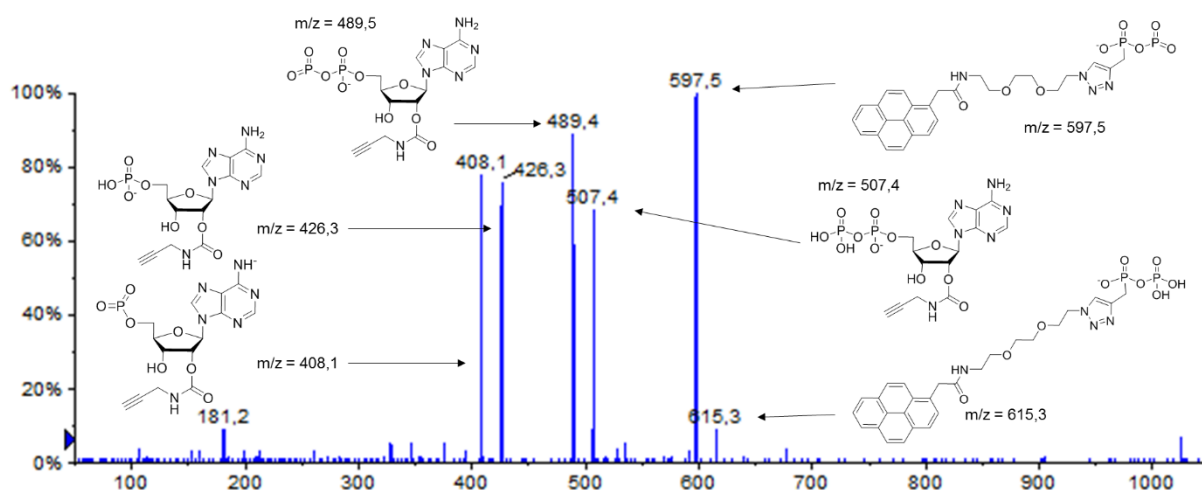




Rys. 93 Eksperyment porównujący reaktywność C-fosfonianów zawierających alkiny – 3-butynylowy oraz etynylowy w reakcji CuAAC.

Doświadczenia z syntezą sond ekscymerowych pokazały różnicę reaktywności między grupą alkinową znajdującą się w obrębie łańcucha oligofosforanowego oraz tą przyłączoną do reszty rybozy. Po bardziej wnikliwej analizie wszystkich produktów występujących w mieszaninie reakcyjnej, w której nie wystąpiła 100% konwersja widać jedynie nukleotyd z resztą pirenu przyłączoną do alkinu sąsiadującego z resztą fosforanu, nie ma natomiast produktu, w którym przereagowałaby tylko reszta alkinowa w obrębie rybozy, co ustalono za pomocą analizy metodą tandemowej spektrometrii mas (Rys. 94).²⁰⁷

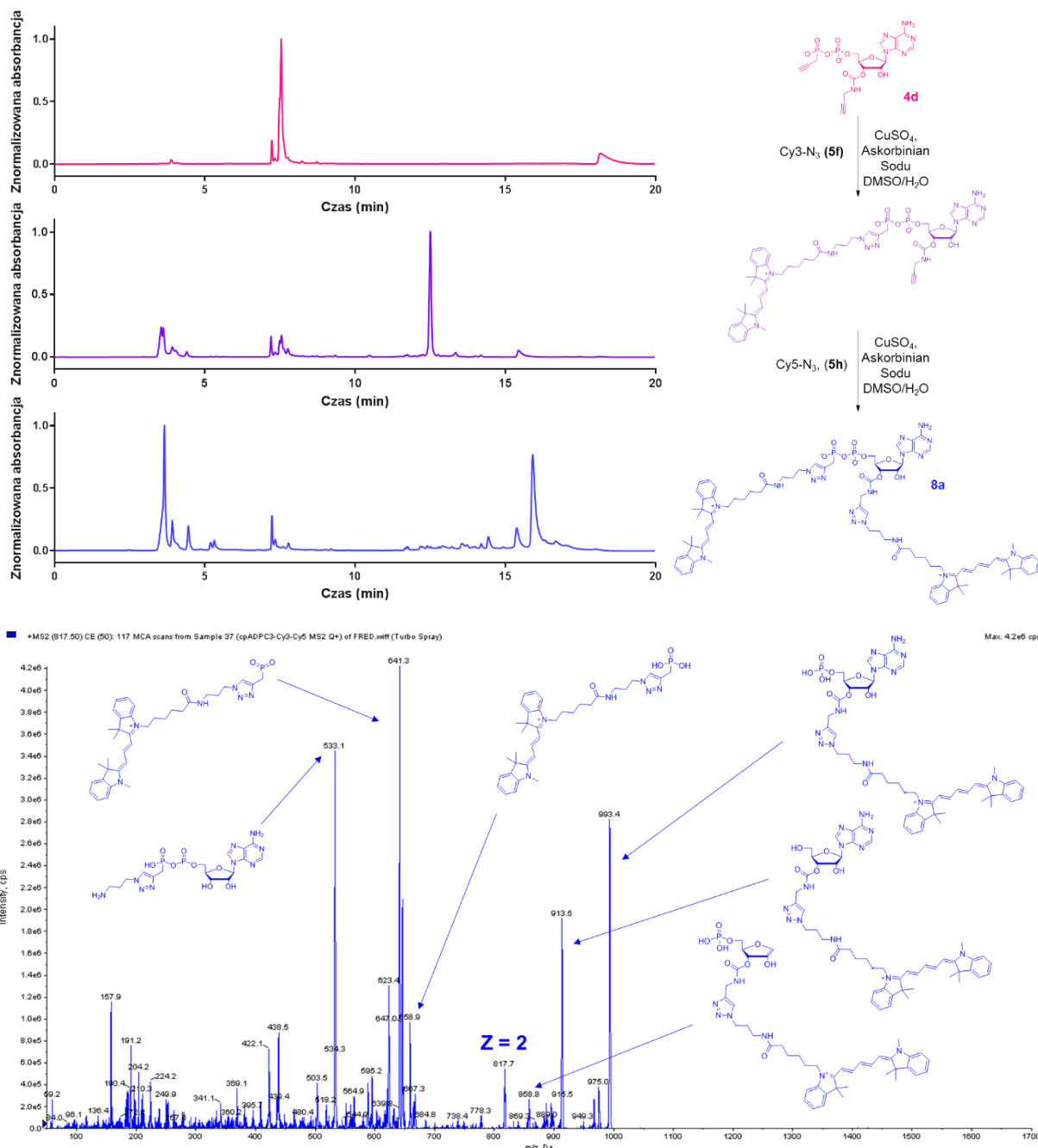




Rys. 94 Analiza nieznanego sygnału o niższym czasie retencji niż sonda ekscymerowa. Analiza fragmentacyjna wskazała, że jest to nukleotyd z pirenem przyłączonym do grupy alkinowej obecnej w obrębie reszty oligofosforanu. Wartość żadnego z sygnałów nie odpowiadała żadnemu fragmentowi analogu z barwnikiem pirenowym przyłączonym do grupy *N*-propargilokarbaminianowej.

Wyniki sugerowały, że jest możliwe takie dobranie warunków, by selektywnie przeprowadzić reakcję z jednym barwnikiem azydkowym tylko w obrębie grupy alkinowej przyłączonej do reszty fosforanu, a następnie kolejną reakcję, już z innym barwnikiem, w obrębie grupy alkinowej przyłączonej do reszty rybozy. Obserwowana różnica reaktywności może być wykorzystana do otrzymania sond nukleotydowych zawierających dwa różne barwniki, które mogłyby ze sobą oddziaływać, np. przez bezpromienisty transfer energii (FRET).

Pilotażowy eksperyment mający potwierdzić te przypuszczenia został przeprowadzony z użyciem analogu ADP zawierającego C-fosfonian 2-propargilowy w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego. Wodny roztwór nukleotydu i cyjaniny 3 zawierającej ugrupowanie azydkowe w DMSO w stosunku molowym 1:1 zmieszano i dodano do niego wodny roztwór siarczuanu miedzi (0,4 równoważnika molowego) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (4 równoważniki molowe). Reakcja po godzinie dała niemal wyłącznie jeden związek zawierający nukleotyd z cyjaniną 3 przyłączoną wyłącznie w obrębie reszty C-fosfonianu. Następnie do reakcji dodano roztwór azydkowej pochodnej cyjaniny 5 w DMSO (1 równoważnik molowy) oraz roztwory siarczuanu miedzi (0,4 równoważnika) oraz askorbinianu sodu (4 równoważniki molowe). W efekcie po godzinie zaobserwowano zanik wcześniej zidentyfikowanego adduktu i pojawienie się nowego sygnału, który po zbadaniu za pomocą spektrometrii mas okazał się oczekiwanym nukleotydem zawierającym parę Cy3-Cy5. (Rys. 95)



Rys. 95 Sekwencyjna reakcja CuAAC z analogiem ADP. W każdym etapie, oczekiwany produkt był dominującym składnikiem mieszaniny. Sygnały o czasie retencji około 2,5 minuty pochodzą od kompleksu Cu-EDTA. Produkt uzyskany w sekwencyjnej reakcji CuAAC poddano analizie MS/MS. Dopasowane sygnały od jonów fragmentacyjnych, które świadczą o otrzymaniu oczekiwanego izomeru zostały naniesione na wykres. Żaden z sygnałów MS nie pasował do jonu, który mógłby pochodzić od odwrotnie podstawionego izomeru.

Przeprowadzone eksperymenty były podstawą opracowania nowej metody syntezy sond zawierających dwa różne fluorofory. W toku badań, okazało się, że dla regioselektywności i maksymalizacji wydajności reakcji musi być spełnione kilka warunków:

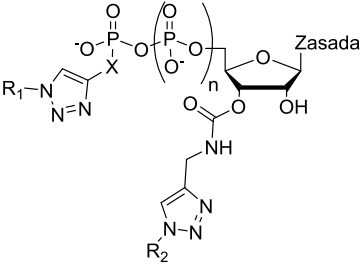
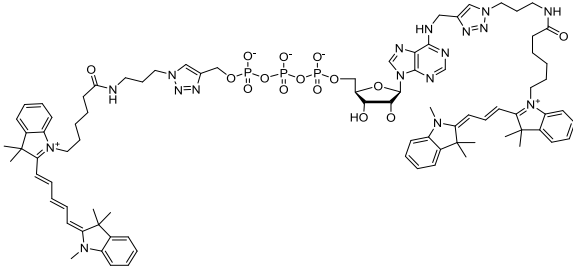
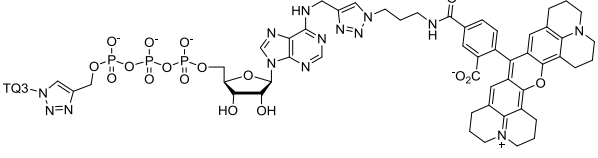
- Reagent azydkowy (który zwykle jest bardziej hydrofobowy) powinien być rozpuszczony w mieszaninie reakcyjnej. Ma to szczególne znaczenie w przypadku

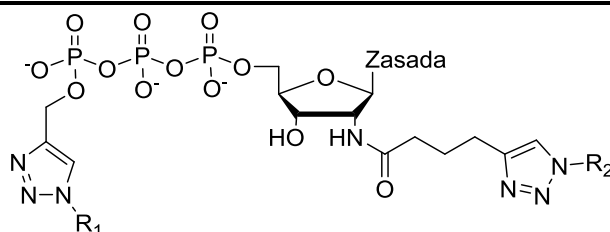
bardzo hydrofobowych barwników (m. in. wygaszacze fluorescencji z serii Tide Quencher). W celu uzyskania jak najlepszych wyników zawartość wody powinna stanowić maksymalnie 10% objętościowych mieszaniny reakcyjnej.

- Mieszanina reakcyjna powinna być jak najbardziej stężona. W pierwszym etapie reakcji stężenie reagentów alkinowego i azydkowego powinno mieścić się w przedziale 13 – 16 mM, w drugim etapie stężenia te powinny mieścić się w przedziale 9 – 11 mM. Przy tym powinien być zachowany warunek pierwszy.
- Istotna jest forma w jakiej występuje jon miedzi. Sekwencyjność reakcji może wynikać z kompleksowania jonu miedzi przez łańcuch oligofosforanowy, co ułatwia reakcję z pobliską grupą alkinową (argumenty przemawiające za tą hipotezą przedstawiono w rozdz. 16.5). Implikuje to konieczność użycia jonu miedzi pozbawionego czynników kompleksujących takich jak THPTA, czy TBTA w pierwszym etapie reakcji. Z kolei w drugim kroku reakcji sekwencyjnej ligand taki może być pomocny w przeprowadzeniu kolejnej reakcji CuAAC z grupą alkinową, która nie jest przyłączona do łańcucha fosforanowego.
- Askorbinian sodu powinien zostać użyty w odpowiednim nadmiarze (zwykle molowo 4 – 10-krotność wobec zastosowanego stężenia jonów miedzi). Pozwala to na wytworzenie katalizatora *in situ*, poprzez redukcję jonu miedzi (II), utrzymanie redukującego środowiska reakcji przeciwdziałając tlenowi rozpuszczonemu w rozpuszczalnikach, a ponadto askorbinian pełni rolę zasady pozwalającej na łatwiejszą deprotonację alkinu w pierwszym kroku reakcji CuAAC.
- Przed rozpoczęciem reakcji, wskazane jest usunięcie tlenu z naczynia reakcyjnego za pomocą strumienia argonu, a także używanie odgazowanych rozpuszczalników.

Opracowana metoda pozwoliła otrzymać szereg sond wykazujących efekt FRET oraz efekt wygaszenia fluorescencji. Otrzymane sondy różniły się między sobą zasadą azotową (adenina, guanina, 7-metyloguanina), długością łańcucha oligofosforanowego (di-, trifosforany nukleozydów), zastosowanymi barwnikami fluorescencyjnymi, oraz umiejscowieniem grupy alkinowej w obrębie reszty nukleozydu (grupa 2'-O/3'-O-karbaminianowa, grupa 2'-aminowa, bądź pozycja 6N adeniny). Opracowana metoda sekwencyjnej reakcji CuAAC okazała się więc uniwersalna wobec nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe, pod warunkiem, że jedna z nich przyłączona jest do terminalnego fosforanu. Tabela 2 ze strukturami otrzymanych związków wraz z wydajnościami reakcji została zaprezentowana poniżej.

Tabela 2

 Struktura ogólna nukleotydów 8a – 8i.							
Numer	Zasada	n	X	R ₁	R ₂	Izomer	Wydajność [%]
8a	Ade	1	CH ₂	Cy3	Cy5	2'+3'	76
8b	Ade	1	CH ₂	Cy5	Cy3	2'+3'	56
8c	Ade	2	OCH ₂	Cy5	Cy3	2'+3'	73
8d	Ade	2	OCH ₂	Cy3	Cy5	2'+3'	72
8e	Ade	2	OCH ₂	TQ2	5-FAM	2'+3'	84
8f	Ade	2	OCH ₂	TQ3	Cy3	2'+3'	48
8g	Ade	2	OCH ₂	Wit. B12	5-FAM	2'+3'	36
8h	m ⁷ Gua	2	OCH ₂	Cy5	Cy3	3'	45
8i	m ⁷ Gua	2	OCH ₂	Cy3	Cy5	2'	43
8j							57
8k							24



Struktura ogólna nukleotydów **8l** – **8s**.

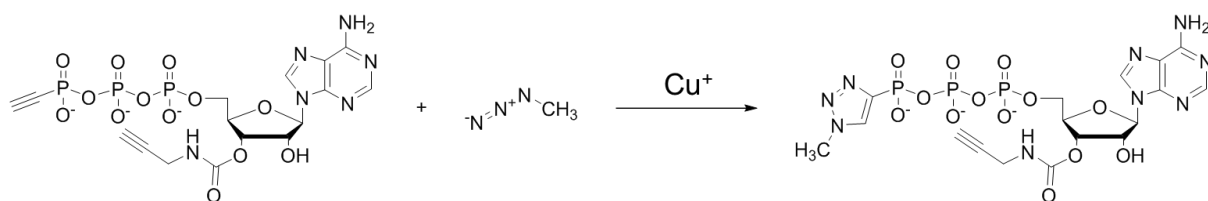
Numer	Zasada	R ₁	R ₂	Wydajność [%]
8l	m ⁷ Gua	Cy5	Cy3	46
8m	m ⁷ Gua	Cy3	Cy5	49
8n	m ⁷ Gua	SCy5	Cy3	45
8o	m ⁷ Gua	Cy3	SCy5	22
8p	m ⁷ Gua	SCy5	SCy3	34
8r	m ⁷ Gua	TQ3	5-ROX	48
8s	Gua	Cy5	Cy3	47

16.5. Wyjaśnienie regioselektywności reakcji CuAAC za pomocą metod obliczeniowych

Różnica reaktywności dwóch grup alkinowych nukleotydów otrzymanych w ramach niniejszej pracy jest tak znaczna, że umożliwia kontrolowanie reakcji i selektywne przyłączanie znaczników w określone pozycje cząsteczki. Jak pokazano w rozdziale 16.4, właściwość tę można wykorzystać w syntezie sond nukleotydowych zawierających dwa różne znaczniki. Aby wyjaśnić efekt wyższej reaktywności grupy alkinowej przyłączonej w obrębie oligofosforanu postawiono dwie hipotezy:

- O reaktywności mógł decydować wpływ grupy fosforylowej, która wyciągając elektrony z reszty alkinowej ułatwia zdeprotonowanie go i rozpoczęcie reakcji CuAAC
- Łańcuch oligofosforanowy kompleksuje jony miedzi, które znajdując się w pobliżu grupy alkinowej łatwiej mogą wejść w reakcję z nią i rozpocząć reakcję CuAAC.

Powyższe hipotezy zostały zweryfikowane za pomocą obliczeń wykonanych przez dr. Marcina Kałka z Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego dla następującej reakcji modelowej:



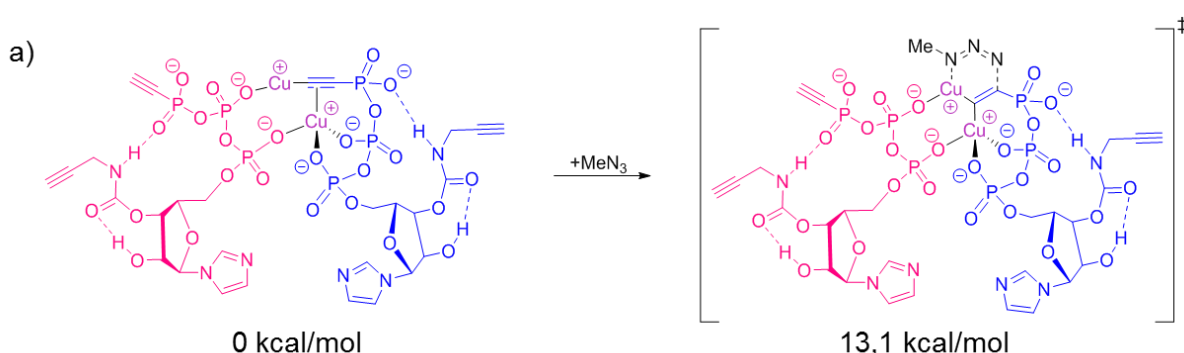
Rys. 96 Schemat reakcji dla której przeprowadzono obliczenia

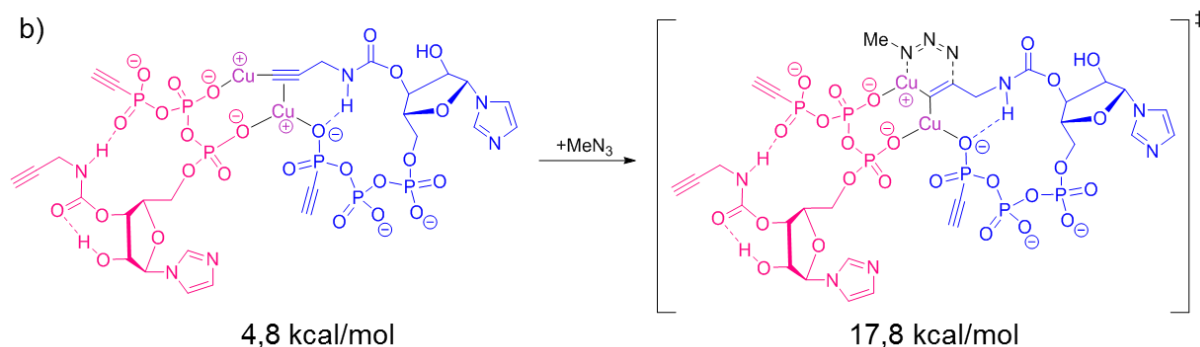
Jako mechanizm reakcji CuAAC przyjęto ten opisany przez Ahlquist *et al.*¹³⁰ Z uwagi na stopień skomplikowania układu i liczbę jego stopni swobody model uproszczono; zasadę azotową zastąpiono resztą imidazolu, nukleotyd jest tylko 3'-O podstawiony, grupa karbaminianowa tworzy wiązanie wodorowe z grupą 2'-OH, a pierścień rybozy przyjmuje konformację 3'-endo.

W toku badań okazało się, że reakcja jest nieodwracalna ze względu na znaczną różnicę energii między substratami i produktem (>60 kcal/mol). Kontrola tej reakcji jest zatem ściśle kinetyczna, zależna od szybkości utworzenia pierwszego wiązania C–N powstającego triazolu.

Pierwsza hipoteza okazała się nie być prawdziwa, gdyż selektywność w małym stopniu zależy od elektronowych właściwości reszty alkinowej. Dużo większy udział ma tutaj kwestia kompleksowania jonu miedzi przez różne indywidua chemiczne obecne w środowisku reakcji. Ze wszystkich zasad Lewisa obecnych w środowisku reakcji, to właśnie reszta oligofosforanową pochodząca z drugiej cząsteczki nukleotydu najtrwalej kompleksuje jon miedzi (taki kompleks ma najniższą energię ze wszystkich kompleksów, które mogą występować w reakcji, tj. anionem siarczanowym, DMSO, wodą, itd.).

Rezultat obliczeń został przedstawiony poniżej wraz z podanymi względnymi energiami powstałych układów. (Rys. 97)





Rys. 97 Obraz stanu przejściowego w reakcji CuAAC w przypadku, gdy pierwszą grupą reagującą jest C-fosfonian etynylowy (a), lub grupa *N*-propargilokarbaminianowa (b)

Z obliczeń wynika, że reakcja CuAAC z resztą C-fosfonianu etynylowego jest o 4,7 kcal/mol faworyzowana w stosunku do reakcji CuAAC z resztą *N*-propargilokarbaminianu. Przekłada się to na około 1000-krotnie większą reaktywność alkinu przyłączonego do C-fosfonianu. Prawdopodobnie różnica ta jest spowodowana liczbą wiązań koordynacyjnych, które może utworzyć reszta oligofosforanu z jonem miedzi (I); im jest ich więcej, tym energia takiego kompleksu jest niższa i tym bardziej jest on faworyzowany.

16.6. Podsumowanie rozdziału

Reakcja CuAAC okazała się przydatna w syntezie nukleotydowych sond fluorescencyjnych. Opracowane warunki reakcji pozwoliły uzyskać szereg różnego rodzaju adduktów nukleotydów z różnymi reagentami azydkowymi, m.in. dinukleotydów zawierających triazol jako analog fosforanu, nukleotydów znakowanych biotyną, czy nukleotydów znakowanych fluorescencyjnie. Zarówno metoda, jak i otrzymane za jej pomocą związki mają potencjał jako inhibitory czy sondy nukleotydowe, co zostało wykazane w pracach wykorzystujących pojedynczo znakowane nukleotydy.^{203, 206}

W przypadku sond zawierających jeden znacznik fluorescencyjny istnieje ryzyko, że jego fluorescencja będzie zależna od rodzaju zasady azotowej występującej w nukleotydzie. Wprowadzenie do struktury dwóch znaczników oddziałujących ze sobą znacząco zmniejsza wpływ zasady azotowej na fluorofory. Dlatego też opracowano warunki wydajnej reakcji CuAAC nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe z dwoma jednakowymi fluoroforami wykazującymi fluorescencję ekscymerową. Podejście takie umożliwia w jednej reakcji uzyskać w szybki i prosty sposób funkcjonalną sondę fluorescencyjną. Opracowana metoda pozwoliła mi otrzymać 11 sond nukleotydowych znakowanych dwoma identycznymi znacznikami fluorescencyjnymi. Związki te różniły się między sobą zasadą azotową (A, G, lub C) zastosowanym znacznikiem oraz rodzajem zastosowanego analogu terminalnego

fosforanu, co pokazało, że opracowana metoda jest uniwersalna i możliwa do zastosowania do wielu różnych analogów nukleotydów.

Przy opracowywaniu optymalnych warunków podwójnej reakcji CuAAC okazało się, że dwie grupy alkinowe obecne w cząsteczce nie są równocenne pod względem reaktywności w CuAAC. W toku eksperymentów stwierdziłem, że grupa alkinowa przyłączona do reszty oligofosforanu jest znacznie bardziej reaktywna niż grupa alkinowa przyłączona w obrębie nukleozydu. Doświadczenia pokazały, że efekt ten jest niezależny od liczby fosforanów, czy też zasady azotowej. Zjawisko to zostało wyjaśnione za pomocą obliczeń, które wykazały, że znaczącą rolę pełni tutaj kompleksowanie jonu miedzi przez łańcuch oligofosforanowy. Sprawia to, że jon miedzi znajduje się w dogodnej pozycji do utworzenia adduktu z grupą alkinową przyłączoną do terminalnego fosforanu i rozpoczęcia reakcji CuAAC.

Opisana powyżej różnica reaktywności została wykorzystana w syntezie sond nukleotydowych wykazujących efekt FRET. Opracowana metoda była uniwersalna, co wykazałem otrzymując 18 sond fluorescencyjnych o zróżnicowanym stopniu złożoności. Warto podkreślić, że metoda ta jest skuteczna nie tylko w przypadku przyłączania prostych znaczników fluorescencyjnych, ale również cząsteczek tak złożonych jak witamina B₁₂.

Opracowana metoda pozwala z jednej ogólnej struktury nukleotydu z dwiema grupami alkinowymi w szybki sposób otrzymać wiele sond z różnymi znacznikami fluorescencyjnymi, w zależności od potrzeb. Rodzaj znacznika może być dostosowany do ograniczeń aparatury, do tego czy sonda ma być użyta w warunkach *in vitro*, czy *in vivo*, w końcu do tego czy znacznik ma pełnić dodatkowe funkcje (np. transport dokomórkowy).

Właściwości fluorescencyjne otrzymanych związków zostały zbadane w badaniach spektroskopowych, które zostaną opisane w kolejnych rozdziałach.

17. Badania spektroskopowe sond nukleotydowych

17.1. Wprowadzenie

W projektowaniu i syntezie fluorescencyjnych sond nukleotydowych istotne jest dobranie znaczników tak, by mogły ze sobą oddziaływać w określony i przewidywalny sposób. W przypadku sond ekscymerowych, dwa znaczniki powinny występować w dość bliskiej odległości od siebie, tak by możliwe było utworzenie wzbudzonego dupleksu. W przypadku sond FRET i sond wygaszeniowych, znaczniki powinny oddziaływać ze sobą, skutkując transferem energii między donorem i akceptorem. Po zaprojektowaniu i otrzymaniu takich układów konieczne jest sprawdzenie, czy związek posiada założone właściwości, a ponadto czy może zostać użyty jako narzędzie do

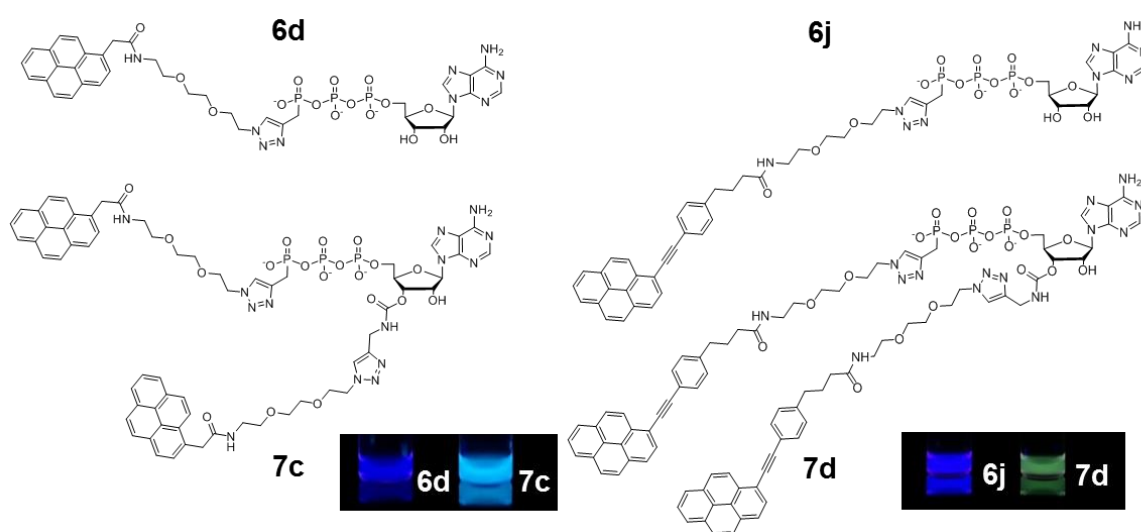
monitorowania założonego procesu biochemicznego. W rozdziale 17 omówione zostaną właściwości spektroskopowe sond fluorescencyjnych.

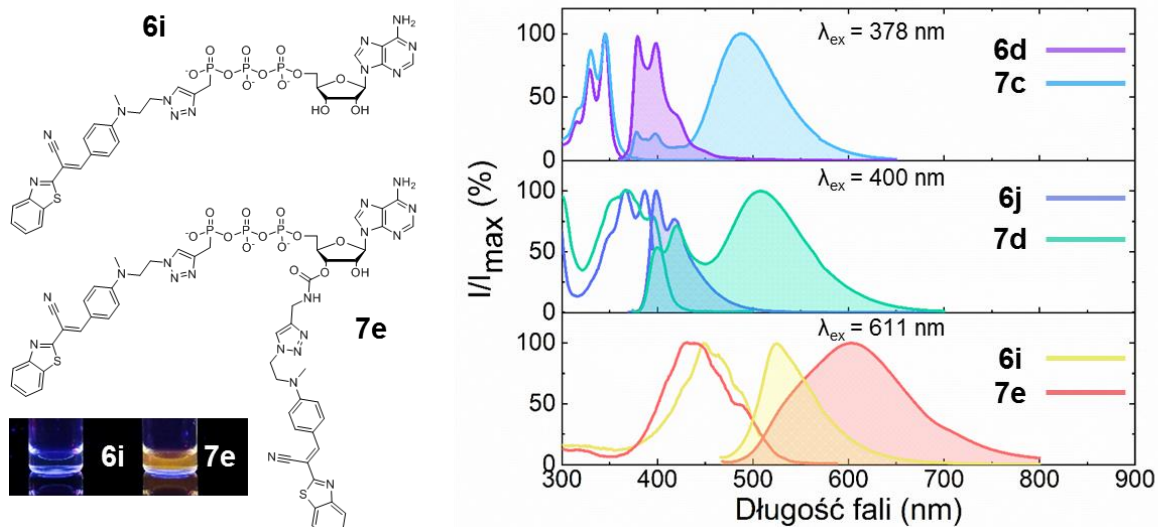
17.2. Właściwości fluorescencyjne sond ekscymerowych

Pojawienie się zjawiska fluorescencji ekscymerowej wymaga bliskiej odległości pomiędzy barwnikami tworzącymi parę ekscymerową (ok. 1 nm, por. rozdz. 7.1). Nukleotydy są stosunkowo dużymi cząsteczkami, dzięki czemu znaczniki przyłączone do reszty terminalnego fosforanu oraz do reszty nukleozydu mogą być przestrzennie odseparowane. Jednak ze względu na elastyczność łańcucha oligofosforanowego, zasady azotowej, jak i linkerów, którymi przyłączone są fluorofory, możliwe jest tworzenie wzbudzonych dupleksów. Dodatkowym czynnikiem wzmacniającym ten efekt, jest środowisko; w polarnym rozpuszczalniku, jakim jest woda, hydrofobowe fragmenty cząsteczki zbliżają się do siebie, co pozwala na obniżenie ich energii.

Eksperymenty przedstawione w tym rozdziale (z wyjątkiem eksperymentu NMR ze związkiem **6i**) zostały wykonane przez mgr Renatę Kasprzyk, natomiast ich interpretacja i analiza zostały wykonane przez autora niniejszej pracy.

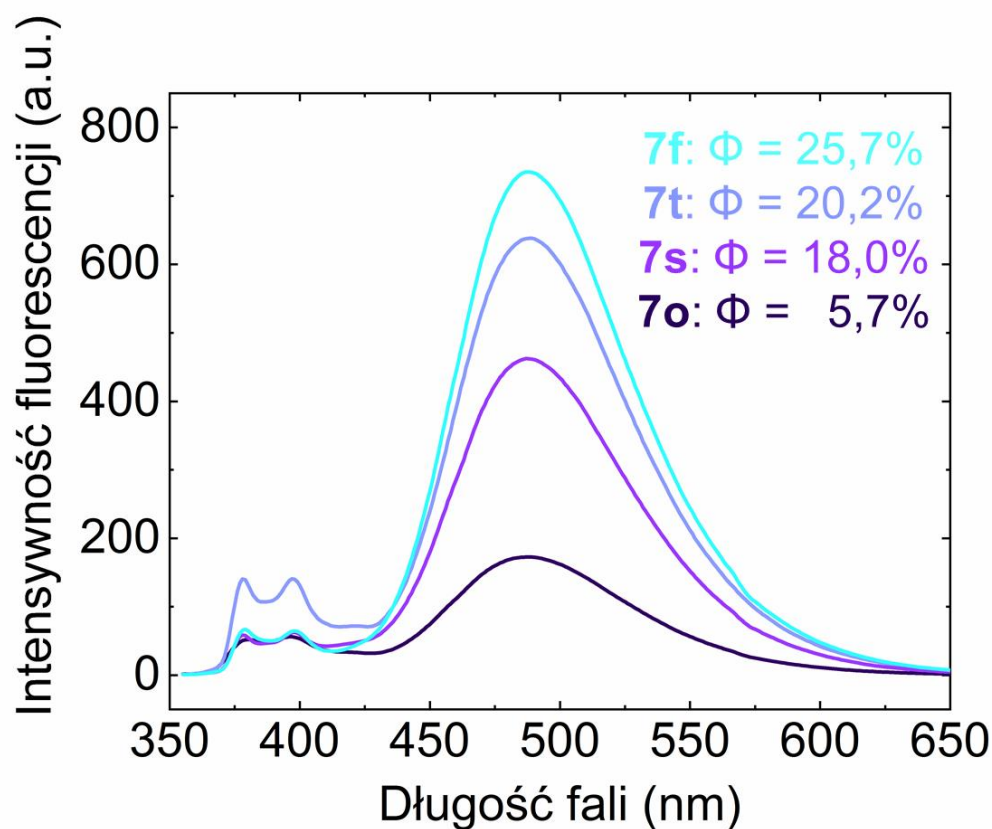
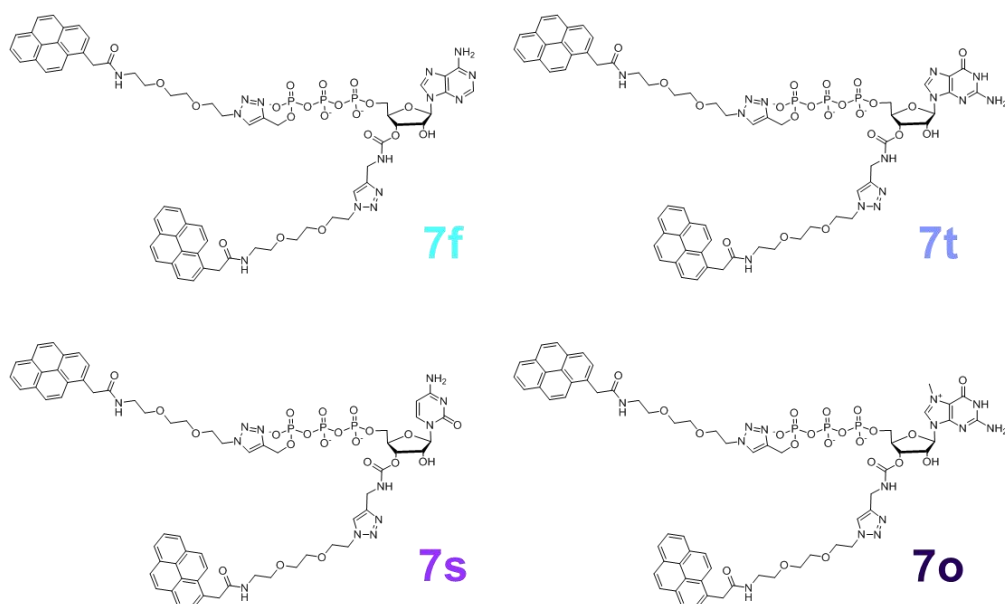
Sonda ekscymerowa wykazuje fluorescencję ekscymerową. Jednak proces ten powinien występować wyłącznie wewnątrzcząsteczkowo, nie może być natomiast następstwem oddziaływań międzycząsteczkowych. Aby to zbadać otrzymano nukleotydy znakowane wyłącznie jednym znacznikiem fluorescencyjnym przyłączonym do reszty terminalnego fosforanu. Następnie porównano parami każdą z sond, z jej monoznakowanym odpowiednikiem przy charakterystycznej dla znacznika długości fali wzbudzenia fluorescencji. (Rys. 98) W przypadku monoznakowanych nukleotydów w badanych stężeniach praktycznie nie występowało pasmo fluorescencji ekscymerowej. Oznacza to, że pasma widoczne dla sond ekscymerowych są efektem oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych między barwnikami.





Rys. 98 Porównanie fluorescencji sond ekscymerowych i odpowiadających im monoznakowanych nukleotydów. Konturem oznaczono widmo wzbudzenia barwników, kontur z wypełnieniem pokazuje ich widma emisji. Widma nagrywano w stężeniu 4 μ M dla sond pirenowej (**6d**, **7c**) i fenyloetynylopirenowej (**6j**, **7d**), oraz 1 μ M dla sond z barwnikiem cyjanowinylowym (**6i**, **7e**).

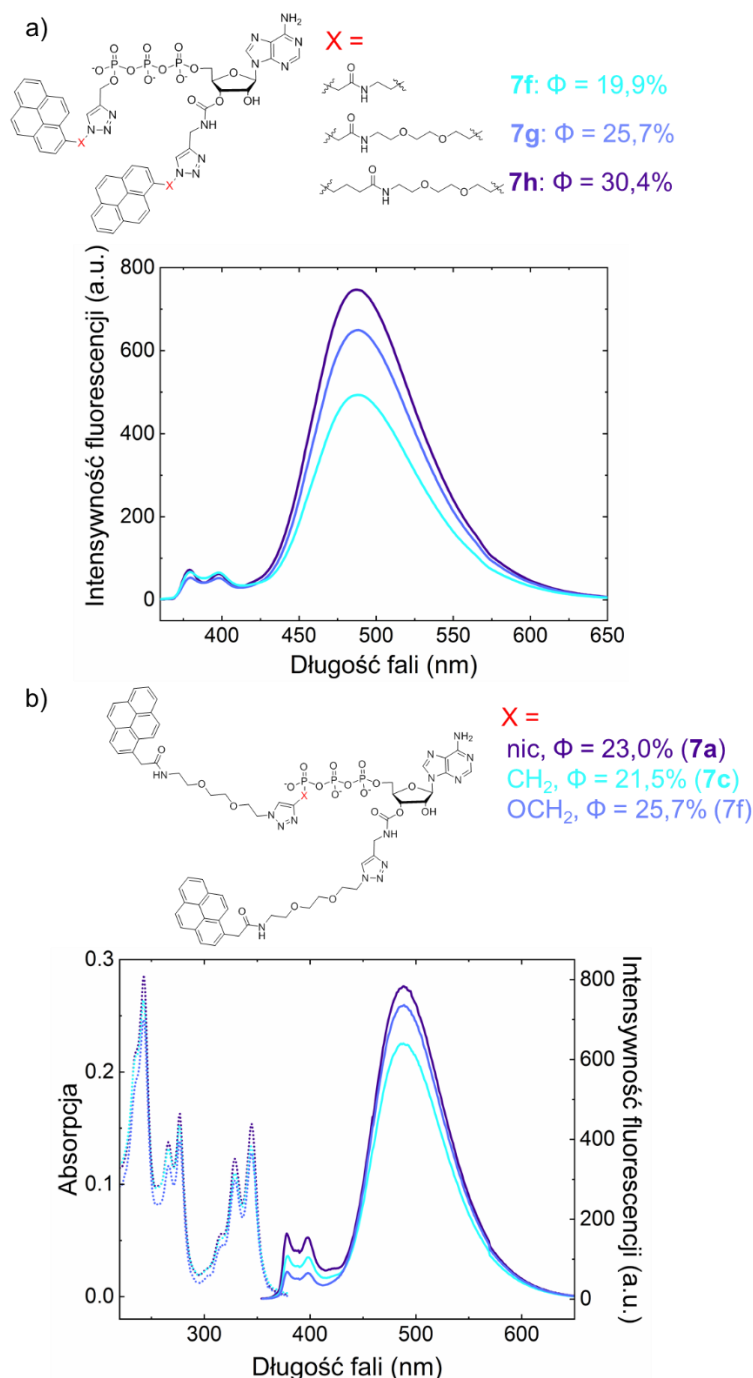
Następnie wyznaczono wydajności kwantowe fluorescencji wszystkich otrzymanych sond. Najwyższe wartości wydajności fluorescencji spośród sond przedstawionych na Rys. 98 posiadała sonda **7d** zawierająca fenyloetynylopiren (25,5%). Sonda pirenowa **7c** wykazywała tylko nieznacznie niższą wydajność kwantową (21,5%), natomiast sonda **7e** zawierająca barwnik cyjanowinylowy charakteryzowała się bardzo niską wydajnością kwantową (0,3%). W kolejnym eksperymencie sprawdzono, czy zasada azotowa ma wpływ na wydajność kwantową fluorescencji ekscymerowej. W tym celu porównano cztery sondy pirenowe, różniące się między sobą jedynie zasadą azotową – adeninową, guaninową, 7-metyloguaninową, oraz cytozynową. Wynik eksperymentu, przedstawiony na Rys. 99 wskazuje, że sondy różnią się całkowitą wydajnością fluorescencji, w zależności od zasady azotowej, jednak dla każdej sondy dominujące pasmo pochodzi od fluorescencji ekscymerowej. Oznacza to, że zaproponowany sposób przyłączenia barwników ekscymerowych jest uniwersalny, oczekiwane właściwości fluorescencyjne może wykazywać sonda będąca analogiem dowolnego nukleotydu.



Rys. 99 Porównanie widm sond różniących się zasadą azotową.

Kolejnym elementem struktury sond, który może mieć znaczący wpływ na ich właściwości fluorescencyjne jest długość linkerów, które łączą barwnik z nukleotydem. Istotna jest zarówno długość linkera, który łączy barwnik z nukleotydem, jak i typ analogu terminalnej reszty fosforanu. Poniżej zaprezentowano osobne porównania tych dwóch właściwości. (Rys. 100) Z porównania widać, że im dłuższy linker, tym wyższą wydajność fluorescencji wykazuje sonda, a różnice tej wartości mogą w skrajnym przypadku wynosić nawet 10%. (Rys. 100a). Zmiany te mogą wynikać z

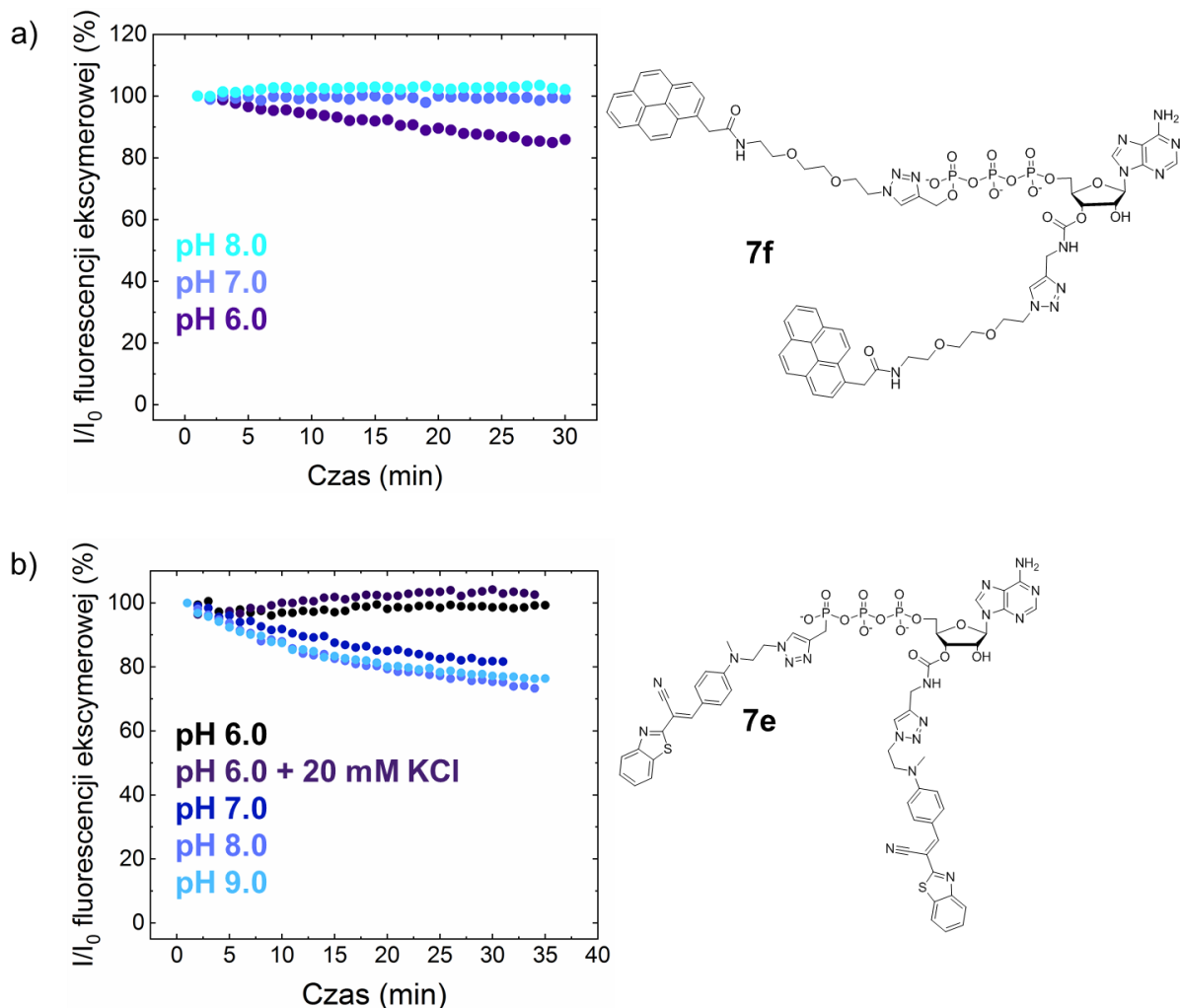
oddalenia ekscymeru od zasady azotowej, która może w tym układzie pełnić rolę wygaszacza fluorescencji. Z kolei wpływ analogu terminalnego fosforanu jest właściwie zaniedbywalny, sondy różniące się między sobą w tym zakresie wykazywały zmiany wydajności fluorescencji wynoszące maksymalnie około 3%. (Rys. 100b)



Rys. 100 a) porównanie widm emisji fluorescencji sond i ich wydajności kwantowej w zależności od długości linkera łączącego fluorofor z nukleotydem. b) porównanie widm emisji fluorescencji sond i ich wydajności kwantowej w zależności od zastosowanego analogu terminalnego fosforanu.

Kolejną ważną cechą skutecznej sondy nukleotydowej jest stabilność fluorescencji w szerokim zakresie pH. Kluczowy jest zwłaszcza zakres pH 7 – 9, na który przypada najwyższa aktywność badanych enzymów i w którym zwykle dokonuje się pomiarów.

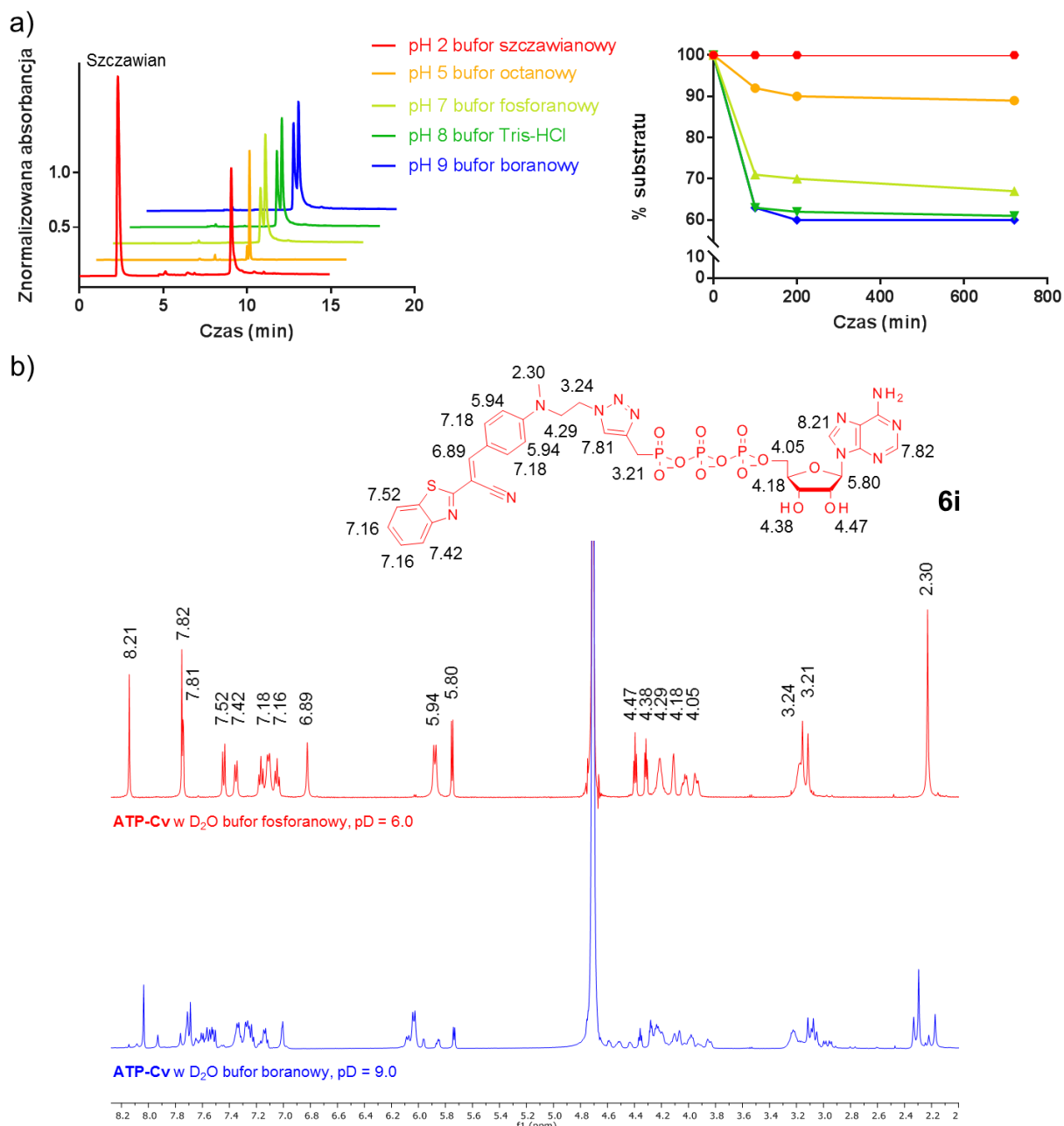
W przypadku sond pirenowych i fenyloetynylopirenowych zmiany były zaniedbywalne. Przykładowo sonda pirenowa zachowała stałość intensywności fluorescencji ekscymerowej w czasie 30 minut w pH 7 oraz 8. W pH 6 widać było nieznaczny spadek obserwowanej intensywności fluorescencji, jednak nie przekroczył on 15% w czasie 30 minut. (Rys. 101)



Rys. 101 Wykres względnej intensywności fluorescencji ekscymerowej sond pirenowej (a) i cyjanowinylowej (b) w różnych warunkach pH. Największa zmiana fluorescencji sondy pirenowej obserwowana była dla pH = 6 (Bufor Tris-HCl), jednak w pH 7 oraz 8 (bufor Tris-HCl) stabilność fluorescencji została zachowana. W przypadku sondy z barwnikiem cyjanowinylowym stabilność ekscymeru w obserwowanym zakresie czasu zachowana była jedynie w pH = 6.

Sondy zawierające barwnik cyjanowinylowy okazały się nietrwałe w zadanym zakresie pH. Fluorescencja ekscymerowa sondy 7e nie zanikała w czasie jedynie w pH = 6, jednak pH = 7 i wyższe powodowały znaczący spadek intensywności fluorescencji ekscymerowej. (Rys. 101b) W przypadku pH 8 i 9 spadek wynosił powyżej 20% już po 30 minutach. Dla wskazania możliwych przyczyn tego efektu przeprowadzono eksperyment z nukleotydem zawierającym tylko jeden znacznik cyjanowinylowy. Związek ten był inkubowany w buforach o różnych pH w zakresie 2-9, a następnie badany przy pomocy RP HPLC. Pojedynczo znakowany nukleotyd

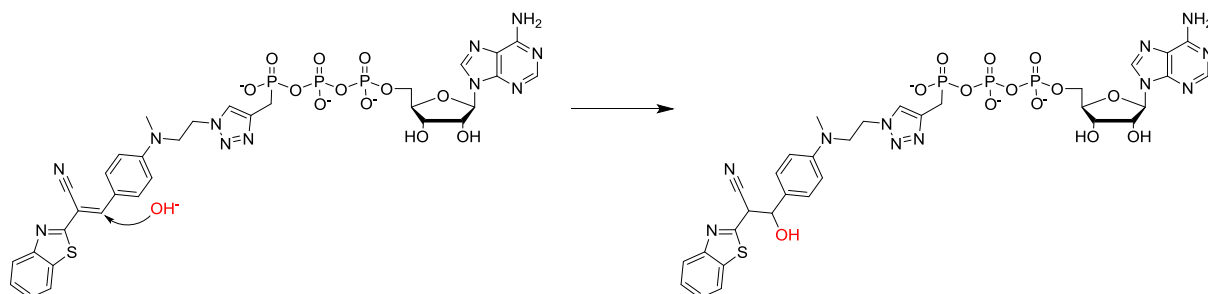
wykazał brak trwałości i powolny rozkład już w pH = 5. (Rys. 102a) Powstający produkt został poddany analizie MS, jednak jedyną różnicą w stosunku do substratu było zwiększenie masy o +18 Da, co sugeruje addycję wody do cząsteczki nukleotydu. W toku dalszych badań podjętych, w celu zrozumienia obserwowanego zjawiska przeprowadzony został kolejny eksperyment z wykorzystaniem techniki ^1H NMR. Po 24 godzinach pomiarów okazało się, że sonda była trwała przy pD = 6, natomiast dla pD = 9 uzyskano obraz widma zdegradowanego związku. (Rys. 102b)



Rys. 102 a) badanie HPLC analogu ATP z przyłączonym pojedynczym znacznikiem cyjanowinylowym w buforach o różnym pH. b) porównanie widm ^1H NMR po 24 godzinach inkubacji analogu ATP z przyłączonym barwnikiem cyjanowinylowym w buforach o pD = 6 i pD = 9.

Niestety powstający produkt nie był możliwy do zidentyfikowania na podstawie widma protonowego. Jedną z hipotez, dlaczego barwnik ten obniża intensywność

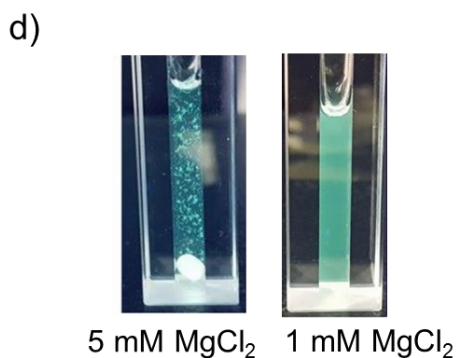
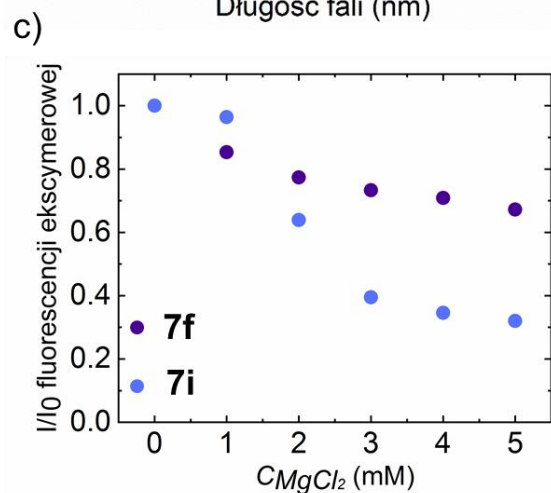
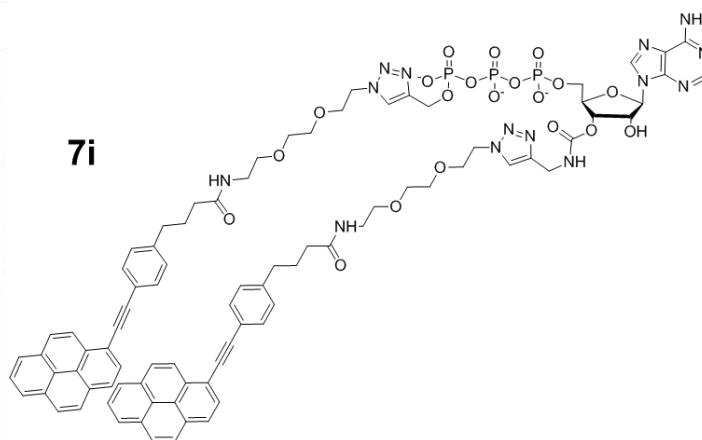
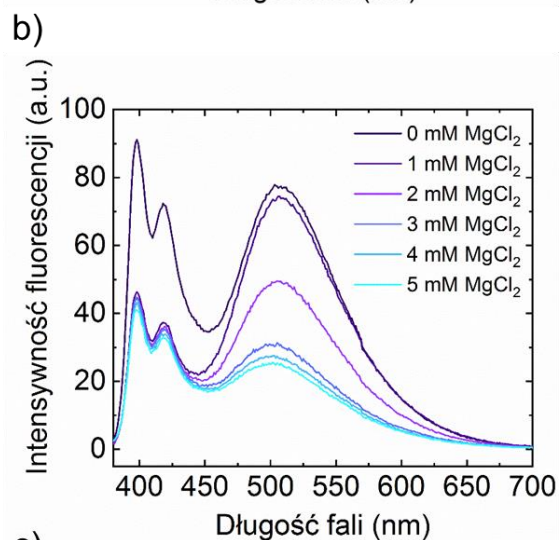
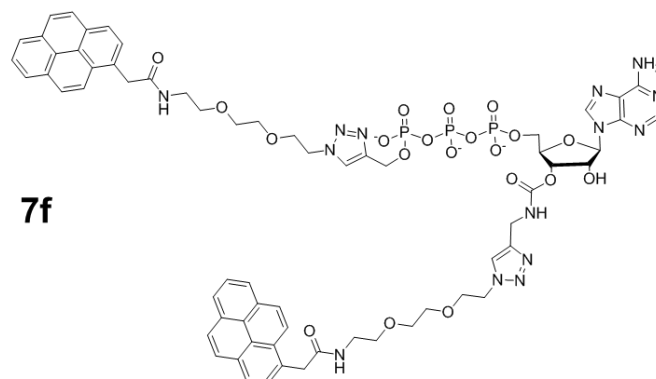
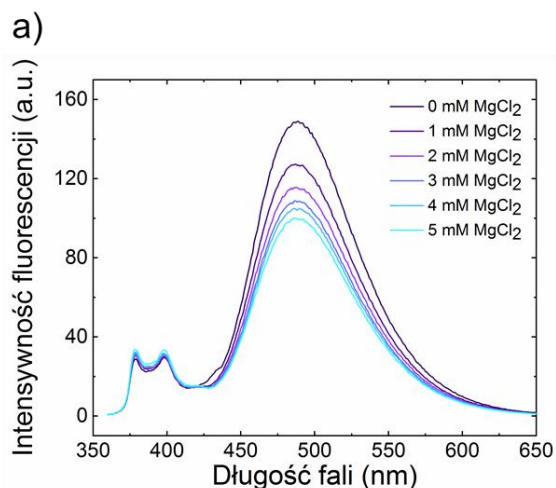
fluorescencji jest przyłączanie się jonu hydroksylowego do zaktywowanego grupą nitrylową wiązania podwójnego. (Rys. 103) W ten sposób dochodzi do przerwania systemu wiązań π , co prowadzi do zaniku fluorescencji. Ponadto, wyjaśnienie to koreluje z czasem retencji nowopowstającego związku na RP HPLC – zawierając grupę hydroksylową, jest on bardziej polarny, co wyjaśnia, czemu ma on krótszy czas retencji w układzie RP HPLC niż substrat, z którego powstaje.



Rys. 103 Proponowany mechanizm degradacji sond cyjanowinyowych w pH powyżej 6

Sondy cyjanowinyowe (**7b**, **7e**) zostały wykluczone z dalszych badań, ze względu na niestabilność barwnika w warunkach eksperymentu enzymatycznego. Mimo to nie jest wykluczone, że znalazłyby one zastosowanie w badaniu fosfohydrolaz aktywnych w pH 2 – 6.

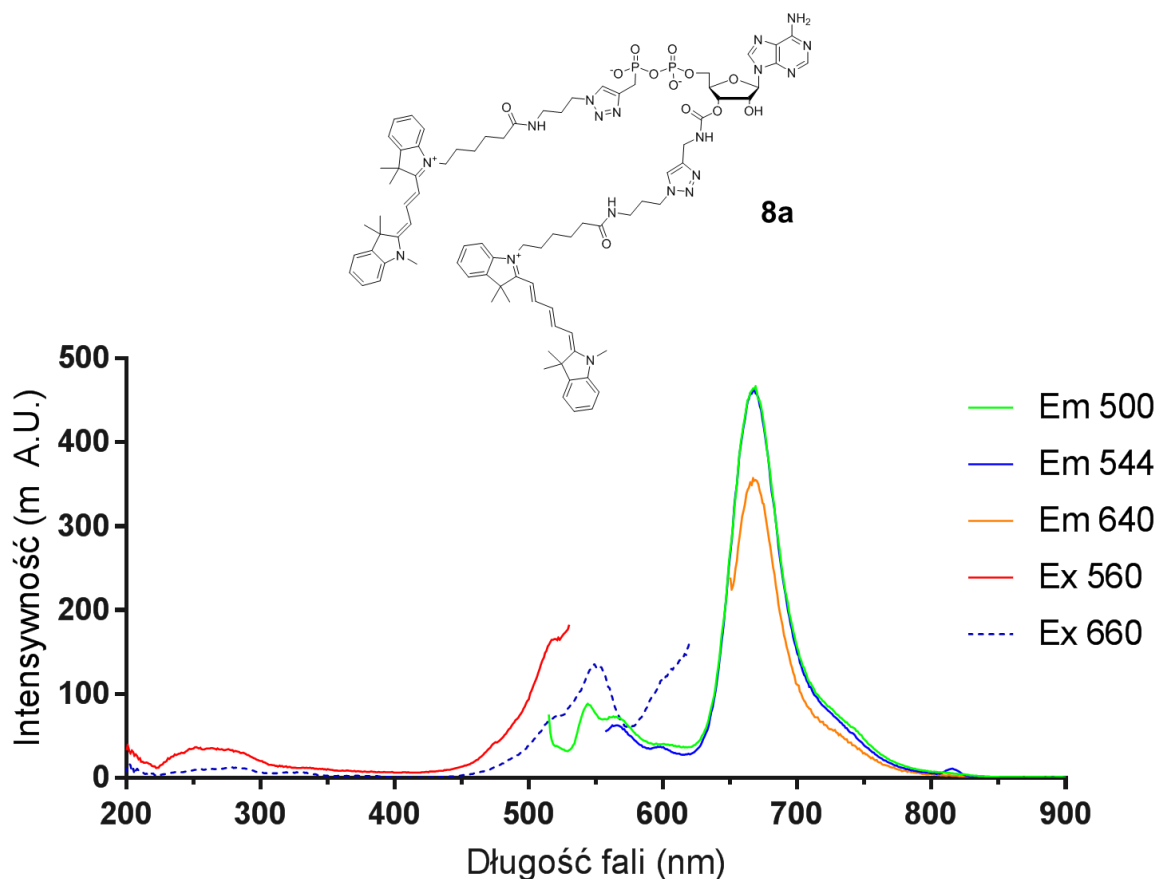
Kolejną istotną cechą sondy fluorescencyjnej jest jej stabilność wobec innych indywiduów chemicznych, jakie mogą znajdować się mieszaninie reakcyjnej. Szczególnie ważnym składnikiem, który jest konieczny w badaniach wielu różnych pirofosfataz są sole metali, takich jak magnez, mangan, czy wapń. Sole te pełnią rolę kofaktorów enzymów, jednak jako związki jonowe mogą wpływać na stabilność ekscymerów i rozpuszczalność sond nukleotydowych. W przypadku sondy **7f** zawierającej piren, zwiększanie stężenia chlorku magnezu powodowało obniżenie intensywności pasma fluorescencji ekscymerowej. Mimo to w zakresie stężeń 1 mM – 5 mM, pasmo ekscymeru było pasmem dominującym w widmie emisyjnym tej sondy. (Rys. 104a) Sytuacja przedstawiała się inaczej w przypadku sondy fenyloetynylopirenowej **7i**. (Rys. 104b) Okazało się, że ekscymer jest nietrwały już w stężeniu $MgCl_2$ powyżej 1 mM, a co gorsza następuje wtedy agregacja sondy i wytrącenie jej z roztworu. (Rys. 104d)



Rys. 104 Porównanie widm emisji fluorescencji sondy **pirenowej 7f** a) i fenyloetynylpirenowej b). Spadek intensywności pasma ekscymerowego (gdzie jako 100% intensywności fluorescencji wyznaczono wartość przy braku chlorku magnezu) przedstawiono na wykresie c). Na zdjęciach d) przedstawiono stan mieszaniny reakcyjnej w kuwecie w przypadku 5 mM i 1 mM stężenia chlorku magnezu. Zdjęcie wykonano przy naświetlaniu lampą UV (365 nm).

17.3. Właściwości fluorescencyjne sond FRET

Fakt, że nukleotydy zawierające dwa barwniki tworzące parę ekscymerów faktycznie wykazywały efekt ekscymerowy, oraz opracowanie nowej strategii syntezy sekwencyjnych reakcji CuAAC, stanowiły istotną zachętę do zaprojektowania sond nukleotydowych z dwoma różnymi znacznikami wykazującymi efekt FRET. Oddziaływanie FRET może odbywać się między znacznikami oddalonymi maksymalnie o 10 nm. Jest to znacznie większa odległość niż w przypadku fluorescencji ekscymerowej, co dodatkowo sugerowało, że sondy FRET mogą być dużo bardziej czułe w stosunku do sond ekscymerowych. Jako pierwsze otrzymano sondy będące analogami ADP. Ze względu na obecność jedynie dwóch reszt fosforanowych, barwniki powinny być maksymalnie zbliżone do siebie, co powinno maksymalizować efekt FRET. Widma emisji i wzbudzenia zostały przedstawione na przykładzie analogu ADP **8a** (Rys. 105). Wybrane długości fal wzbudzenia zostały dostosowane do cyjanin 3 i 5. W eksperymentach dotyczących efektu FRET pary Cy3-Cy5 długość fali wzbudzenia fluoroforów ustalono na 500 nm. Pomimo, że optymalna długość fali do wzbudzenia cyjaniny 3 wynosi 544 nm, to przy tej długości fali wzbudzeniu mogłaby ulec również cyjanina 5, ale nie byłby to wynik oddziaływania fluoroforów ze sobą. Z punktu widzenia niniejszej pracy najważniejsze jest stwierdzenie, czy efekt FRET rzeczywiście występuje. Na Rys. 105 na to pytanie odpowiada wykres opisany jako „Em 500”. Światło o długości fali 500 nm wzbudza jedynie cyjaninę 3 (pasmo emisji w granicach 550 – 650 nm). Mimo to pasmo emisji Cy3 obserwowane na widmie jest nieznaczne w porównaniu z pasmem w granicach 650 – 750 nm, które jest charakterystyczne dla cyjaniny 5. Wyjaśnieniem tego zjawiska jest właśnie występowanie efektu FRET i przekazanie energii na sposób bezpromienisty od donora (Cy3) do akceptora (Cy5).

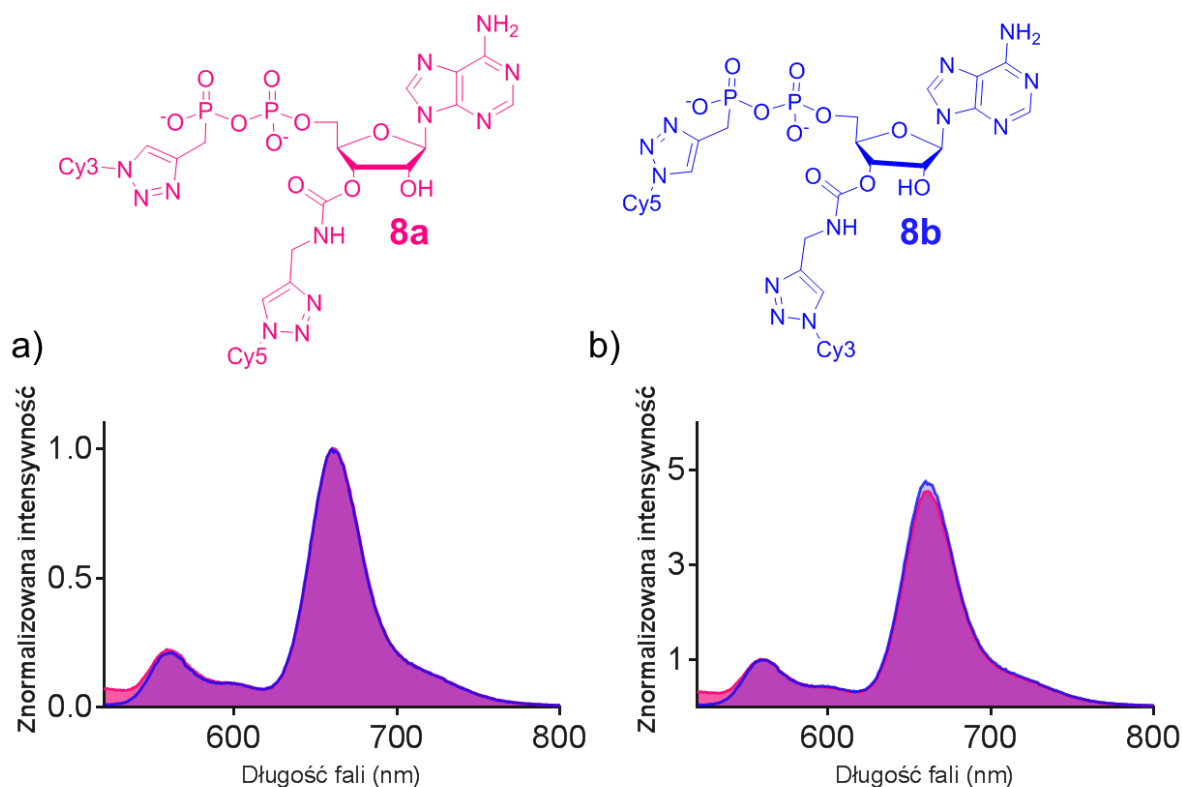


Rys. 105 Przykładowe widma emisji i wzbudzenia sondy **8a** - analogu ADP – sondy FRET. Pomiary przeprowadzono w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 8.

W kolejnym kroku sprawdzono, czy właściwości emisyjne sondy mogą zależeć od kolejności przyłączenia znaczników. W tym celu porównano właściwości emisyjne sondy **8a** w 50 mM buforze Tris-HCl o pH = 8 z izomeryczną sondą **8b**.

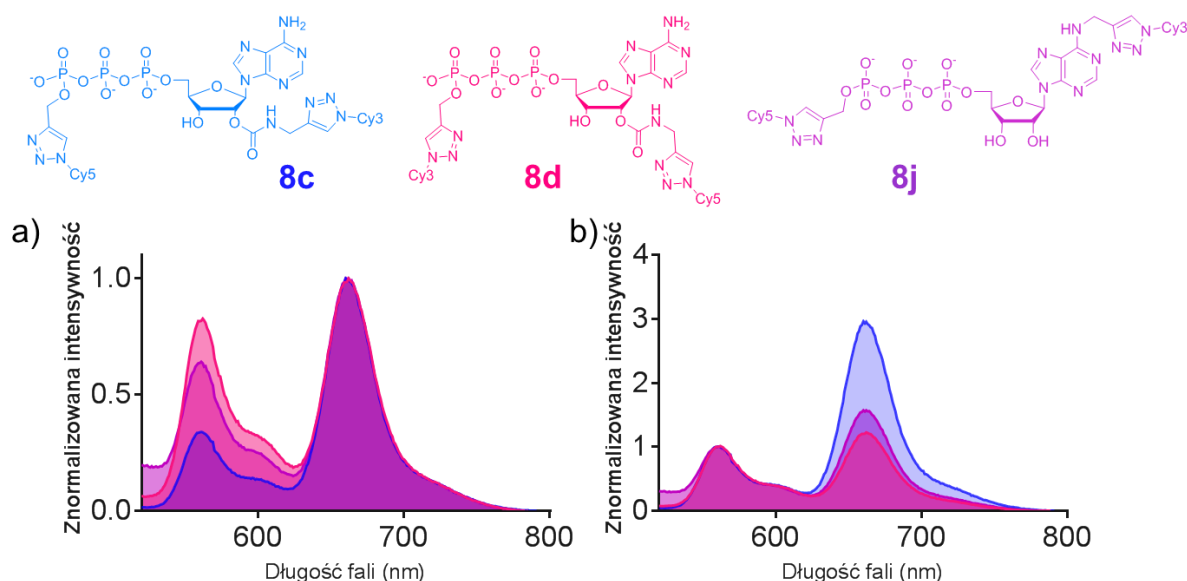
W przypadku obu sond kształt widm emisji fluorescencji był identyczny. Na Rys. 106 ukazano widma emisji zarejestrowane przy wzbudzeniu sond światłem o długości fali 544 nm. Panel a) przedstawia widma emisji obydwu nukleotydów znormalizowane do maksimum emisji cyjaniny 5 (660 nm), natomiast panel b) przedstawia widma emisji znormalizowane do maksimum emisji cyjaniny 3 (560 nm). Pozwoliło to pokazać, że widma wzbudzenia obu sond są niemalże identyczne. Nieznacznie większy efekt FRET z dwóch badanych związków prezentuje sonda **8b**, w której akceptor FRET jest przyłączony w obrębie reszty oligofosforanu.

Warto zauważyć też, że efekt FRET ma znaczący udział we fluorescencji obydwu sond – fala wzbudzenia charakterystyczna dla cyjaniny 3 (500 nm) wywołała znacznie wyższą emisję cyjaniny 5 (660 nm) niż cyjaniny 3 (560 nm).



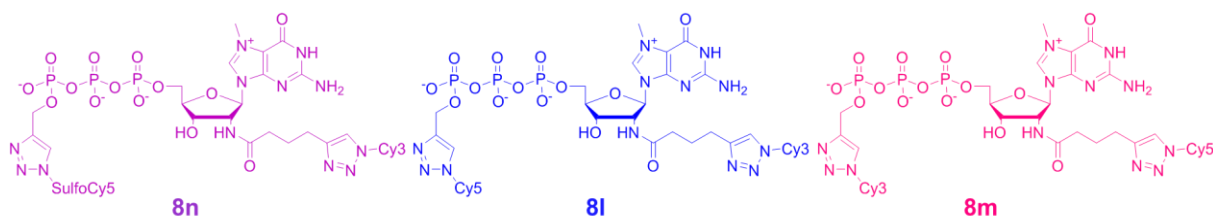
Rys. 106 a) nałożone widma emisji analogów ADP normalizowane do maksimum emisji cyjaniny 5.
b) nałożone widma emisji analogów ADP normalizowane do maksimum emisji cyjaniny 3.

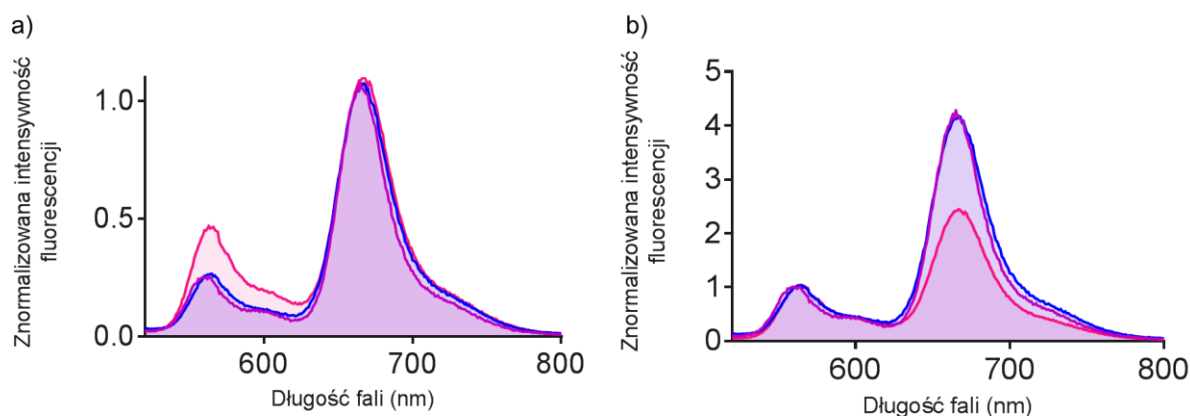
W następnym kroku przeprowadziłem podobne badania dla sond trifosforanowych **8c**, **8d**, **8j**, analizując nie tylko wpływ kolejności, ale również miejsca podstawienia na właściwości spektroskopowe. W tym przypadku największa różnica występowała dla sond o podobnej strukturze, jednak zawierających odwrotnie podstawione znaczniki – **8c** i **8d**. (Rys. 107) W tym przypadku jeszcze wyraźniej ujawniła się różnica pomiędzy odwrotnie wyznakowanymi sondami. Najkorzystniejsze bowiem okazało się przyłączenie akceptora FRET w obrębie reszty oligofosforanowej, a donora w pozycji 2'/3' rybozy (sonda **8c**). Spowodowało to maksymalizację efektu FRET w porównaniu z innymi zaproponowanymi strukturami. W przypadku sondy **8j**, zmiana miejsca przyłączenia donora FRET (z pozycji 2'/3' rybozy na pozycję 6N adeniny) spowodowała znaczące osłabienie efektu FRET, jednak wciąż efekt ten był większy, niż w przypadku umieszczenia barwników odwrotnie – czyli donora w obrębie reszty nukleozydu (w pozycji 2'/3' rybozy), a akceptora w obrębie reszty oligofosforanowej, tak jak w przypadku sondy **8d**.



Rys. 107 a) nałożone widma fluorescencyjnych analogów ATP normalizowane do maksimum emisji cyjaniny 5. b) nałożone widma fluorescencyjnych analogów ATP normalizowane do maksimum emisji cyjaniny 3.

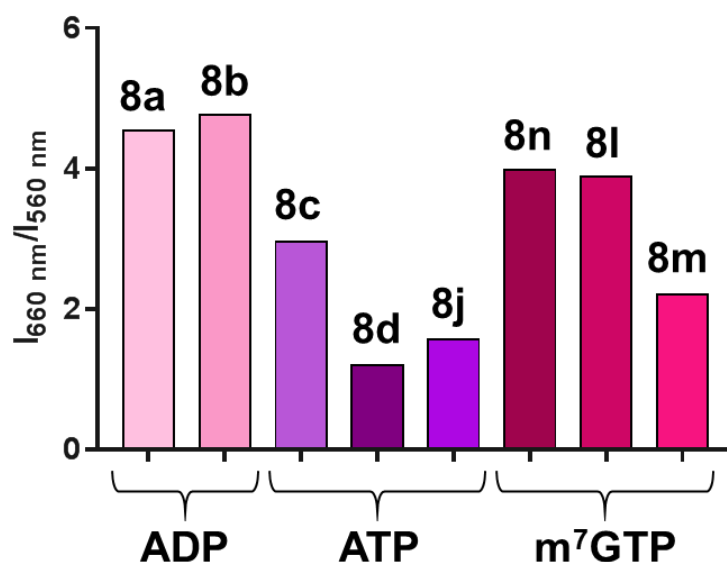
Podobne zestawienie przygotowano dla sond zawierających 7-metyloguanozynę. Sondy rozpuszczone w 50 mM buforze Tris-HCl pH 8 wzbudzano światłem o długości fali 500 nm. Pomimo zmiany linkera łączącego fluorofor z resztą rybozy, utrzymała się tendencja widoczna już dla sond adeninowych, że nukleotyd zawierający akceptor FRET przyłączony do reszty fosforanu wykazuje większą wydajność FRET w stosunku do sondy, w której akceptor FRET przyłączony jest w obrębie rybozy. W przedstawionym na Rys. 108 przypadku widać, że nukleotydy spełniające tę zależność, **8n** oraz **8l**, wykazują silniejszy efekt FRET w porównaniu z **8m**, w którego strukturze donor FRET znajduje się w obrębie oligofosforanu, a akceptor FRET przyłączony jest do reszty rybozy. Związki **8n** i **8l** różniące się obecnością grup sulfonowych w obrębie cyjaniny 5 mają znormalizowane widma emisji fluorescencji praktycznie identyczne – a zwłaszcza identyczny jest stosunek intensywności pasm fluorescencji donora i akceptora. Sugeruje to, że zmiana znacznika Cy5 na sulfoCy5 nie zmienia właściwości spektralnych sondy, może jednak wpływać na jej stabilność w środowisku reakcyjnym, co zostanie opisane w dalszej części tego rozdziału.





Rys. 108 a) nałożone widma fluorescencyjnych analogów m^7GTP normalizowane do maksimum emisji cyjaniny 5. b) nałożone widma fluorescencyjnych analogów m^7GTP normalizowane do maksimum emisji cyjaniny 3.

Ilościowe podsumowanie stosunku intensywności emisji cyjaniny 3 do intensywności emisji cyjaniny 5 zostało przedstawione na wykresie poniżej. (Rys. 109) Z przedstawionych danych wylania się ogólny wniosek, że korzystniejsze z punktu widzenia efektywności efektu FRET jest umiejscowienie donora fluorescencji w obrębie reszty rybozy. W odwrotnym przypadku dochodzi do osłabienia efektu FRET o ponad połowę. Być może jest to związane z bliskością i łatwością oddziaływania donora FRET z zasadą azotową. Umieszczenie go na końcu elastycznego łańcucha oligofosforanowego, bądź bezpośrednie przyłączenie go do zasady azotowej, ułatwia oddziaływanie z nią. Umieszczenie go w pozycji 2'-O,3'-O rybozy, w stosunku *cis* do zasady azotowej utrudnia donorowi FRET oddziaływanie z nią.

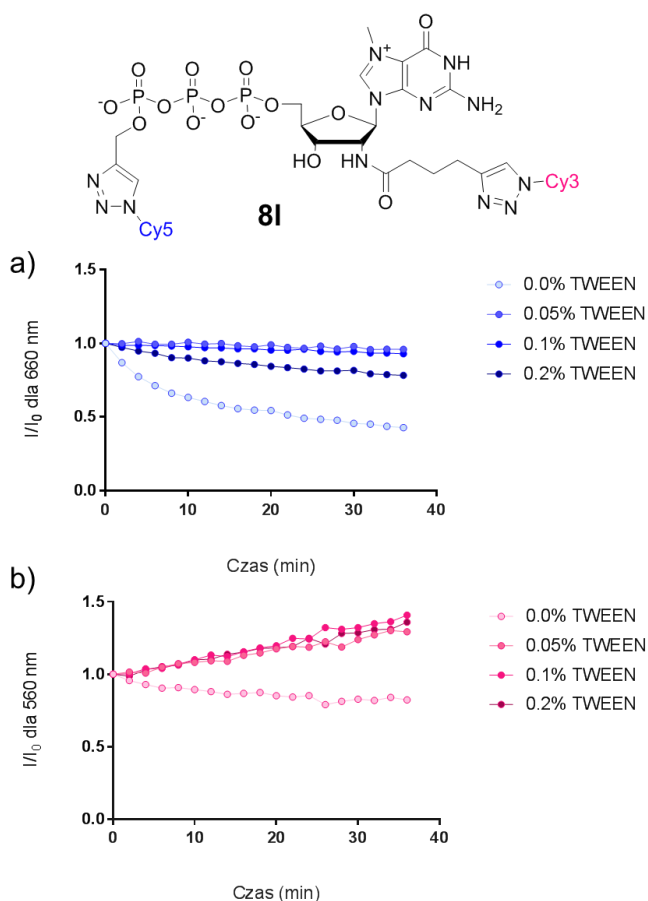


Rys. 109 Stosunek intensywności emisji cyjaniny 5 do cyjaniny 3 dla różnych sond nukleotydowych (analogi ADP, ATP i m^7GTP) wzbudzanych przy długości fali 500 nm. Najniższy jest on dla nukleotydów, w których cyjanina 3 (donor FRET) przyłączona jest w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego.

Fluorofory cyjaninowe to związki niepolarne. Pomimo, że posiadają w swojej strukturze dodatnio naładowany atom azotu, są przede wszystkim rozbudowanym

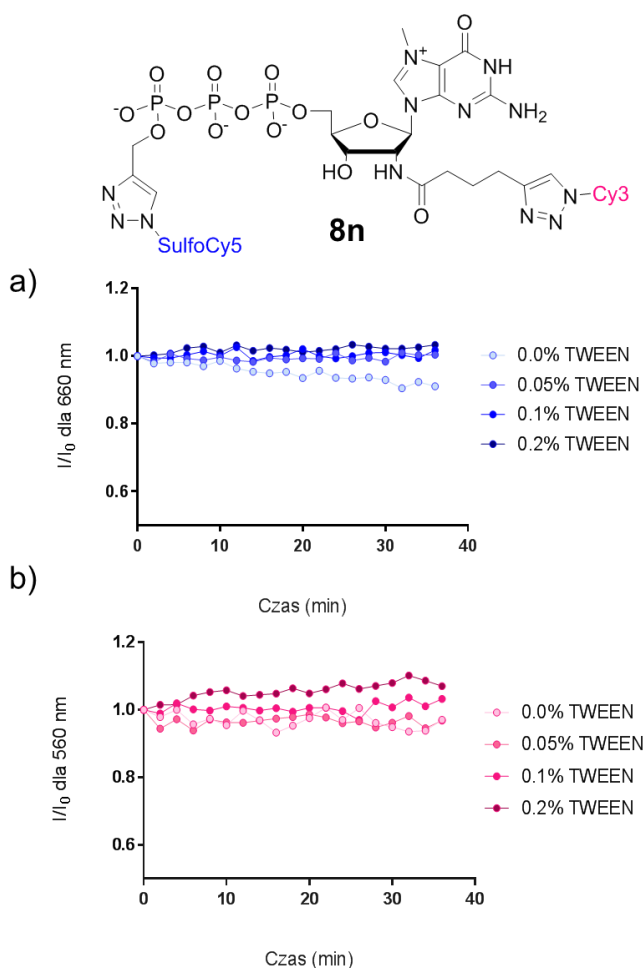
układem węglowodorów. Przyłączenie do nukleotydu zwiększa ich rozpuszczalność w wodzie, jednak wciąż związki te pozostają hydrofobowe, co może przekładać się na trwałość fluorescencji w warunkach prowadzenia reakcji enzymatycznych.

Sondy pozostawione w buforze Tris-HCl pH 8 stopniowo zmniejszają intensywność efektu FRET. W skrajnym przypadku intensywność fluorescencji cyjaniny 5 wywołanej wzbudzeniem układu FRET światłem o długości fali 500 nm może zmaleć o 50% w czasie 35 minut, jak pokazane zostało to na przykładzie związku **8I**. (Rys. 110a) Jednym z wyjaśnień tego zjawiska była agregacja cyjaniny 5. Mogło to powodować trudność w bezpromienistym transferze energii z cyjaniny 3. Co ciekawe, intensywność fluorescencji cyjaniny 3 ulega temu efektowi w znacznie mniejszym stopniu (ok. 20% w czasie 35 minut). (Rys. 110b) Jako jeden ze sposobów rozwiązania tego problemu zaproponowano wprowadzenie do mieszaniny detergentu Tween 20. Działanie to zapobiegło tworzeniu się agregatów cyjanin i umożliwiło utrzymanie fluorescencji na względnie stałym poziomie. Zastanawiający może być wzrost o niemal 40% intensywności fluorescencji cyjaniny 3. Być może związane jest to z faktem działania detergentu na parę FRET i odseparowanie donora od akceptora, co skutkuje przerwaniem transferu energii i wzrostem intensywności fluorescencji donora.



Rys. 110 a) intensywność fluorescencji cyjaniny 5 (donora) w sondzie **8I** w zależności od zastosowanego stężenia Tween 20 w czasie. b) intensywność fluorescencji cyjaniny 3 (akceptora) w sondzie **8I** w zależności od zastosowanego stężenia Tween 20 w czasie.

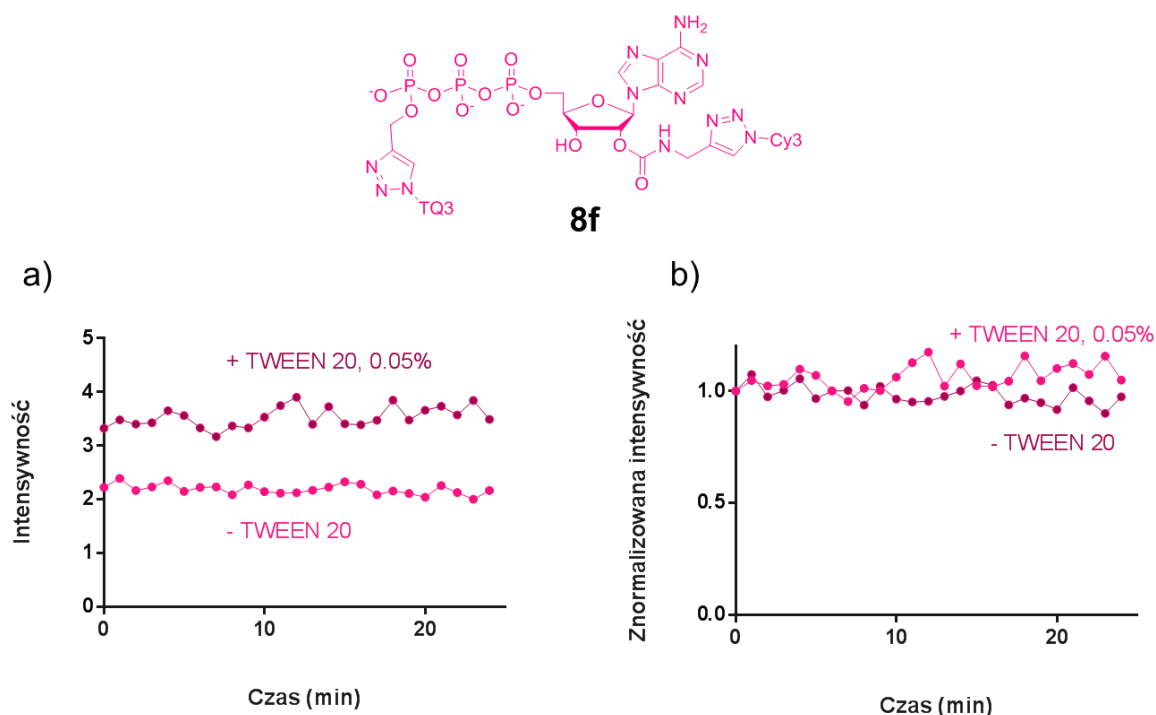
Powyższe doświadczenia pokazały, że efekty niespecyficznych zmian fluorescencji w czasie mogą wynikać z kwestii niepolarności barwników fluorescencyjnych, jednak detergent nie jest idealnym rozwiązaniem tego problemu. W kolejnym podejściu podobnym doświadczeniu poddano sondę (**8n**), która zawierała cyjaninę 5 z przyłączonymi grupami sulfonowymi. Modyfikacja akceptora FRET została wybrana jako istotniejsza, gdyż intensywność fluorescencji cyjaniny 5 zanikała w dużo większym stopniu, niż cyjanina 3. Podejście to okazało się trafne. Już w buforze Tris-HCl pH 8 pozbawionym Tween 20 związek ten zachował w przybliżeniu stałą intensywność fluorescencji zarówno donora, jak i akceptora FRET. (Rys. 111) Spadek intensywności fluorescencji cyjaniny 5 wyniósł około 10% przez 35 minut reakcji, zaś w tym samym czasie spadek intensywności fluorescencji cyjaniny 3 wyniósł około 5%. Zastosowanie dodatkowo detergentu Tween 20 spowodowało utrzymanie stałej intensywności fluorescencji cyjaniny 5, za to nie wpłynęło znacząco na intensywność fluorescencji cyjaniny 3. Co ciekawe, także w tym przypadku nadmiar Tween 20 okazał się niekorzystny – widać to na wykresie dotyczącym cyjaniny 3; gdzie stężenie 0,1% oraz 0,2% Tween 20 powoduje wzrost intensywności fluorescencji cyjaniny 3, co może być spowodowane oddaleniem donora i akceptora FRET przez cząsteczki detergentu.



Rys. 111 a) intensywność fluorescencji sulfocyjaniny 5 (donora) w sondzie **8n** w zależności od zastosowanego stężenia Tween 20 w czasie. b) intensywność fluorescencji cyjaniny 3 (akceptora) w sondzie **8m** w zależności od zastosowanego stężenia Tween 20 w czasie.

Warto zwrócić uwagę, że takie zachowanie pary donor-akceptor w obecności detergentu wyklucza hipotezę, że zachodzi zjawisko fotobłaknięcia (*photobleaching*). Proces ten polega na zniszczeniu fluorofora przez wielokrotne naświetlanie go i może zdarzyć się w przypadku wielokrotnie powtarzanego pomiaru. Odpowiadałoby to zmniejszającej się intensywności fluorescencji badanych sond w czasie. Ponieważ jednak wprowadzenie detergentu ogranicza ten efekt, właściwszą hipotezą wydaje się to, że hydrofobowe fluorofory mogą agregować, co doprowadza do stopniowego zaniku fluorescencji.

W przypadku sond zawierających parę fluorofor-wygaszacz (**8e**, **8f**, **8k**), wpływ detergentu na intensywność fluorescencji nie był znaczny. Pokazano to na przykładzie sondy **8f** w buforze Tris-HCl pH 8 (Rys. 112). Ponieważ jest to sonda wygaszeniowa, która z założenia wykazuje niską intensywność fluorescencji, szумы pomiarowe są stosunkowo duże, niemniej można zaobserwować, że średnia fluorescencja pozostaje stabilna. Interesującym zjawiskiem jest podwyższenie intensywności fluorescencji sondy inkubowanej w roztworze z Tween 20. Może sugerować, że detergent utrudnia oddziaływanie składników pary FRET i powoduje ich odseparowanie, a co za tym idzie – zmniejszenie efektu wygaszenia fluorescencji.

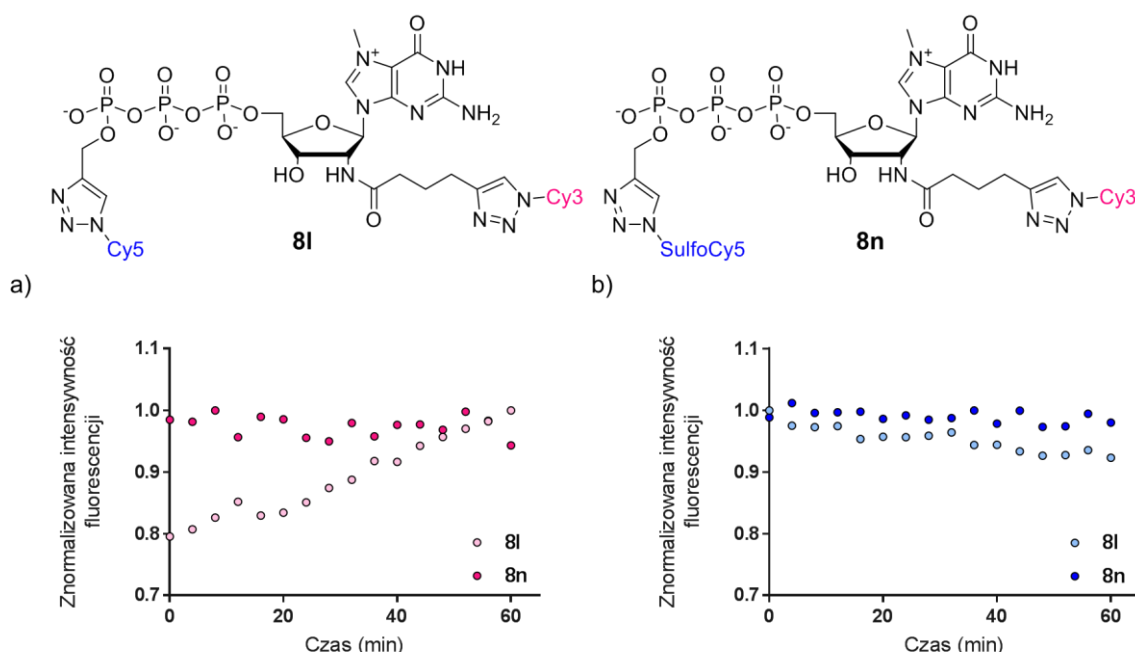


Rys. 112 a) intensywność fluorescencji cyjaniny 3 w sondzie **8f** w roztworze wodnym oraz w roztworze wodnym z 0,05% Tween 20 w czasie b) znormalizowana do wartości początkowej intensywność fluorescencji cyjaniny 3 w sondzie **8f** w roztworze wodnym oraz w roztworze wodnym z 0,05% Tween 20 w czasie.

Podobnie jak w przypadku sond ekscymerowych istotnym aspektem jest obecność soli magnezu i ich wpływ na stabilność efektu FRET wykazywanego przez sondy nukleotydowe w roztworze. Jony magnezu są niezbędne do działania wielu enzymom w tym PDE-I oraz FHIT. Z tego względu wykonano eksperyment, w którym zbadano stabilność fluorescencji przy wzbudzeniu $\lambda = 500$ nm w buforze Tris-HCl z dodatkiem

0,05% Tween 20, w obecności 5 mM soli $MgCl_2$ (stężenie soli używane w badaniach enzymatycznych). Zmiany intensywności fluorescencji dwóch sond (**8l**, **8n**) przedstawiono na Rys. 113. Podobnie jak w przypadku eksperymentu w buforze pozbawionym soli magnezu sonda **8n** z sulfocyjaniną 5 utrzymuje w przybliżeniu stałą intensywność fluorescencji obydwu fluoroforów. W przypadku sondy **8l** widać obniżenie fluorescencji cyjaniny 5 i wzrost intensywności fluorescencji cyjaniny 3 o ~25%.

Z przedstawionych eksperymentów wynika, że sondy generalnie są stabilne w roztworach wodnych pod warunkiem zapewnienia obecności detergentu, który uniemożliwi agregację lipofilowych cyjanin. Wprowadzenie cyjaniny zawierającej grupy sulfonowe zwiększa stabilność fluorescencji w porównaniu z analogicznymi sondami zawierającymi niesulfonowane cyjaniny. Mimo to także w przypadku sond z sulfonowanymi cyjaninami wskazane jest zastosowanie detergentu, gdyż zabieg ten praktycznie całkowicie niweluje obniżanie wydajności FRET w czasie. (Rys. 113)



Rys. 113 Inkubacja sondy **8l** oraz **8n** w buforze Tris-HCl pH 8 + 0,05% Tween 20 + 5 mM $MgCl_2$. a) wykres intensywności fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) w czasie. b) wykres intensywności fluorescencji cyjaniny 5 (660 nm) w czasie.

17.4. Podsumowanie rozdziału

Badania przedstawione w tym rozdziale miały na celu spektroskopową charakterystykę sond nukleotydowych ekscymerowych jak i tych wykazujących efekt FRET, oraz wyselekcjonowanie sond, które w warunkach prowadzenia eksperymentów (obecność jonów metali, buforu, detergentu) nie zmieniają swoich właściwości fluorescencyjnych, bądź robią to w nieznacznym stopniu. Wśród sond ekscymerowych największy stosunek intensywności pasm ekscymerowego do monomernego wykazały sondy z pirenem (**7a**, **7c**, **7f**). Sondy zawierające

fenyloetynylopiren (**7d**, **7i**) miały ten stosunek niższy, jednak wciąż pasmo ekscymerowe pozostało pasmem dominującym, podobnie jak w przypadku sond z barwnikami cyjanowinyłowymi (**7b**, **7e**). Eksperymenty wykazały, że fluorescencja ekscymerowa występuje niezależnie od zasady azotowej, jednak ma ona wpływ na jej intensywność. Podobnie wpływ na intensywność ma długość linkerów, które łączą fluorofory z nukleotydem; im są one dłuższe, tym bardziej intensywnie jest pasmo ekscymerowe, co może sugerować, że wydłużenie linkerów ułatwia fluoroforom przybranie optymalnej orientacji do utworzenia ekscymeru. Inne możliwe wyjaśnienie to kwestia bliskości zasady azotowej, która jako kolejny chromofor w otoczeniu może wpływać na fluorescencję ekscymerową związku. Oznaczałoby to, że im krótszy jest linker, tym bliżej układ ekscymerowy znajduje się zasady azotowej i tym bardziej jest on przez nią wygaszany. Fluorescencja ekscymerowa nie jest stała w czasie i pewne czynniki mogą powodować jej spadek. Sondy z barwnikiem cyjanowinyłowym zostały zupełnie wykluczone z dalszych badań, gdyż okazały się one nietrwałe w warunkach $\text{pH} > 7$ i barwnik cyjanowinyłowy w tych warunkach ulegał częściowo chemicznej degradacji. Sondy z barwnikiem fenyloetynylopirenowym (**7d**, **7i**) z kolei są wrażliwe na wysokie stężenie kationów magnezowych w roztworze, co przejawia się agregacją sond i ich wytrąceniem z roztworu. Ostatecznie doświadczenia opisane w tym rozdziale pozwoliły wyselekcjonować sondy użyteczne w badaniach enzymatycznych, które zostaną opisane w kolejnym rozdziale.

Opisane doświadczenia pozwoliły także wysnuć wnioski na temat projektowania sond wykazujących efekt FRET i ich racjonalnego użycia w badaniach spektroskopowych. Przede wszystkim istotne jest, by akceptor FRET przyłączony był do reszty oligofosforanu, natomiast donor FRET przyłączony w obrębie reszty rybozy. Prawdopodobnie ma to związek z oddziaływaniem donor – zasada azotowa. Przemawia za tym również fakt, że donor przyłączony do zasady azotowej nie dorównuje efektywnością FRET do sond zawierających donor przyłączony do reszty rybozy.

Stabilność efektu FRET w roztworze wodnym stopniowo zanika w czasie, co może wiązać się z agregacją lipofilowych cyjanin. Przeciwdziałać temu może wymiana barwnika na bardziej hydrofilowy lub zastosowanie detergentu, którego nadmiar może jednak doprowadzić do rozdzielenia pary FRET i obniżenia wydajności transferu energii. Sondy zawierające barwniki z serii Tide Quencher nie ulegają podobnym efektom, jednak trudno spekulować o przyczynach tego zjawiska, gdyż struktury tych barwników nie zostały ujawnione przez producenta. Sole magnezu, niezbędne dla działania niektórych pirofosfataz, nie mają znacznego wpływu na efektywność wewnątrzcząsteczkowego transferu energii.

18. Sondy nukleotydowe w badaniach enzymatycznych i komórkowych

18.1. Wstęp

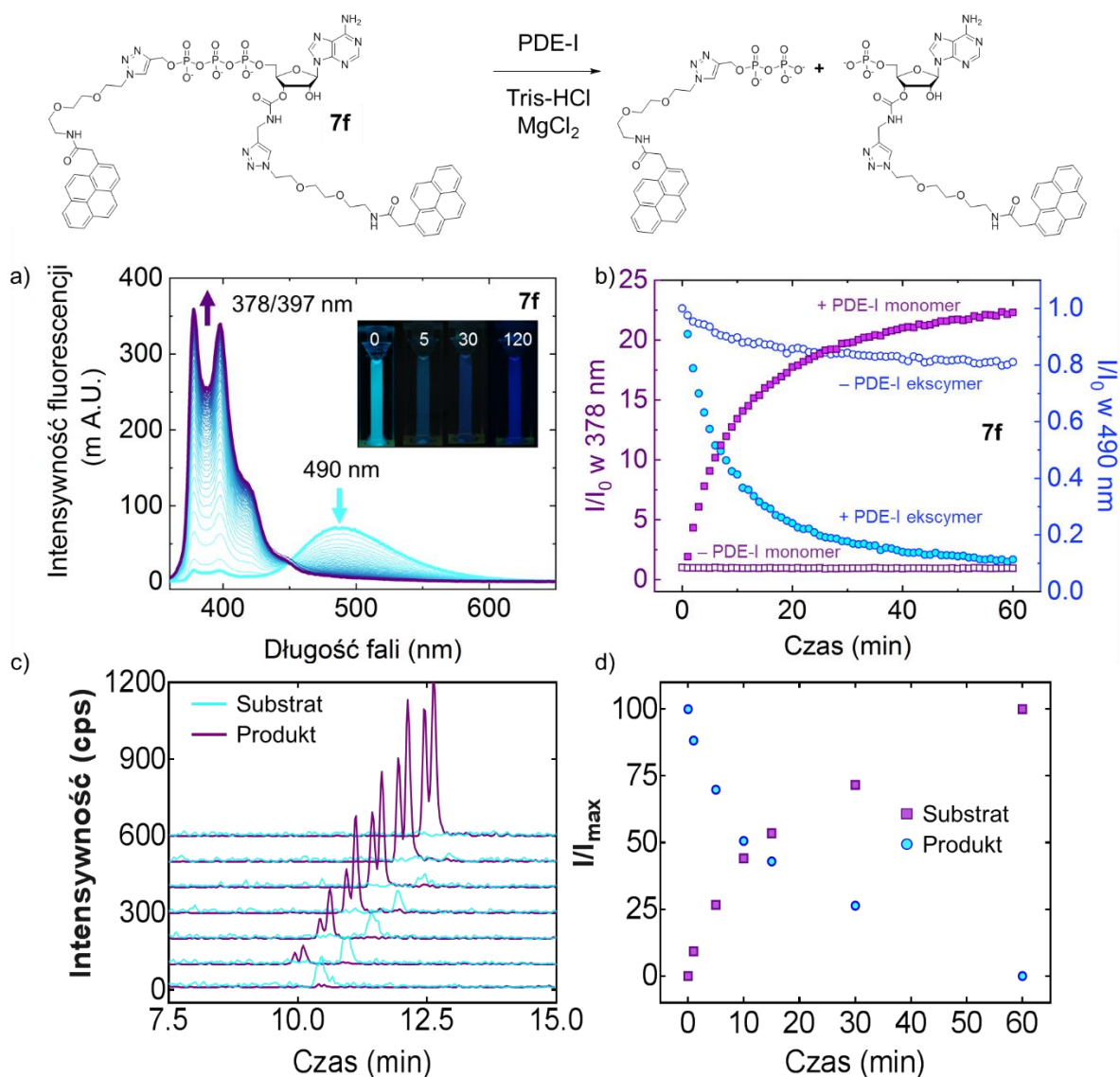
W niniejszym rozdziale opisane zostaną eksperymenty w których sondy adeninowe zostały wykorzystane do monitorowania aktywności enzymów – PDE-I jako modelowej pirofosfatazy, oraz białka FHIT. Niektóre z sond zostały sprawdzone w warunkach inkubacji z komórkami eukariotycznymi.

Sondy zawierające 7-metyloguaninę zostały użyte w monitorowaniu aktywności enzymu DcpS (*decapping scavenger*) jednak nie jest to bezpośrednio tematyka niniejszej pracy i w związku z tym wyniki tych badań nie zostały tu opisane.

18.2. Sondy ekscymerowe w badaniach enzymatycznych i komórkowych.

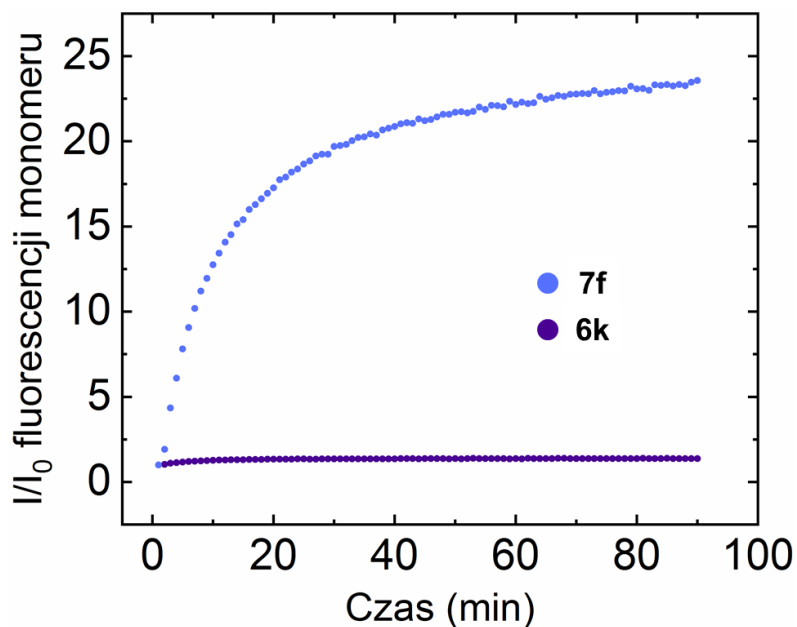
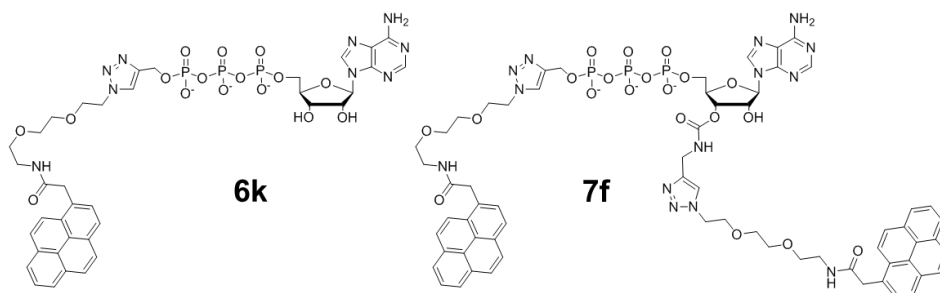
Adeninowe sondy ekscymerowe zostały poddane reakcji z fosfodiesterazą z jadu węża (PDE-I, por. rozdz. 11.1). Ze względu na niską specyficzność substratową enzym ten jest doskonałym narzędziem do sprawdzenia, czy degradacja oligofosforanu faktycznie prowadzi do oczekiwanego skutku, czyli obniżenia fluorescencji ekscymerowej. Pomiar spektroskopowy przedstawione w rozdziale 18.2 zostały wykonane przez mgr Renatę Kasprzyk (z wyjątkiem eksperymentu dot. degradacji sondy **7f**, przedstawionego na Rys. 114), natomiast badania z użyciem żywych komórek HeLa zostały wykonane przez dr. inż. Pawła Sikorskiego. Analiza i interpretacja otrzymanych wyników została wykonana przez autora niniejszej pracy.

W pilotażowej reakcji w buforze Tris-HCl, pH 8, 5 mM MgCl₂, sondę pirenową (**7f**) poddano reakcji z enzymem PDE-I. (Rys. 114) Postęp reakcji można było obserwować poprzez wzrastającą intensywność fluorescencji monomerowej ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 378/397 \text{ nm}$) i malejącą równocześnie intensywność fluorescencji ekscymerowej ($\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$). Sondy nukleotydowe w reakcji z enzymem PDE-I są degradowane poprzez hydrolizę wiązania pirofosforanowego α, β . Po reakcji enzymatycznej produkty degradacji mogą swobodnie od siebie oddzielić, co w niskich stężeniach, przy których badane są te związki powoduje zanik emisji ekscymerowej. W celu potwierdzenia tej hipotezy i wykluczenia niespecyficznych oddziaływań enzymu z fluoroforami wykonano eksperyment degradacji sondy **7f** z wykorzystaniem techniki HPLC-MS równolegle wobec badań spektrofluorymetrycznych. Przedstawione przebiegi reakcji (Rys. 114 b, d) mają podobny przebieg, co świadczy o tym, że zmiana intensywności pasm ekscymerowego i monomerowego zależy wyłącznie od postępu hydrolizy nukleotydu. Podwójne sygnały HPLC widoczne na (Rys. 114 c) pochodzą od izomerów 2'-O, 3'-O podstawionych.



Rys. 114 Reakcja degradacji enzymatycznej sondy **7f**. a) zbierane w minutowych odstępach widma emisji sondy ekscymerowej. Strzałkami oznaczono tendencje zmiany intensywności fluorescencji w czasie reakcji. Zdjęcia przedstawiają wygląd kuwety reakcyjnej naświetlanej światłem UV odpowiednio 0, 5, 30, 120 minut od rozpoczęcia reakcji b) Wykres zmieniającej się znormalizowanej intensywności fluorescencji ekscymeru i monomeru w czasie. c) chromatogramy HPLC wykonywane w ciągu pierwszej godziny reakcji (0, 1, 5, 10, 15, 30, 60 min.) d) znormalizowana intensywność pików odpowiadających zawartości substratu i produktu w mieszaninie. Eksperyment HPLC-MS został wykonany przez mgr Dominikę Strzelecką.

W osobnym eksperymencie sondę **7f** oraz nukleotyd **6k** poddano reakcji z PDE-I. (Rys. 115) Podczas tej reakcji żadne znaczące zmiany nie zaszły we fluorescencji pojedynczo znakowanego nukleotydu, co wskazuje, że wzrastająca fluorescencja monomerowa w przypadku sondy **7f** pochodzi wyłącznie z dysocjacji ekscymeru.



Rys. 115 Porównanie zmian intensywności pasma odpowiadającego długości fali 378 nm w reakcji PDE-I dla sondy **7f** oraz nukleotydu **6k**.

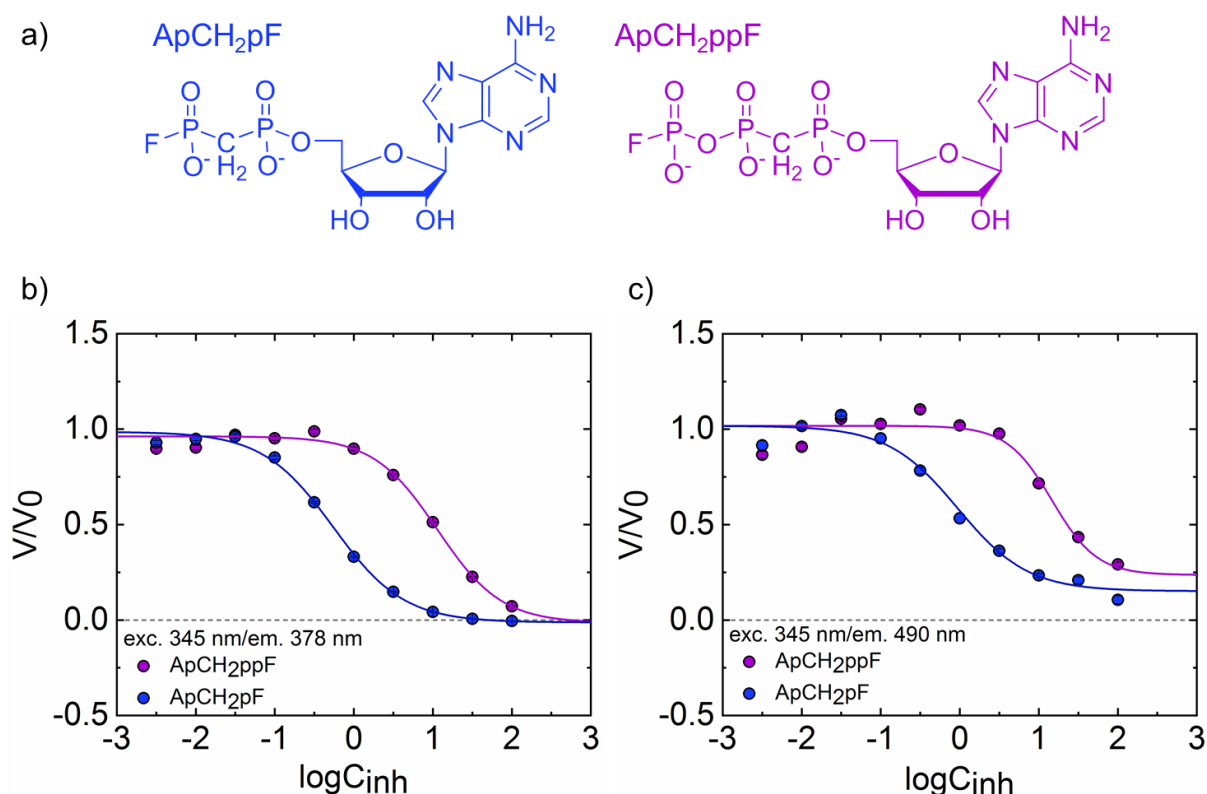
Sondy adeninowe poddane reakcji z enzymem PDE-I ulegały degradacji z różną szybkością w zależności od budowy cząsteczki. Poniżej wartości zostały zebrane wartości odpowiednich czasów półtrwania (Tabela 3).

Tabela 3			
Sonda	$t_{1/2}$ (min) w reakcji z PDE-I	Sonda	$t_{1/2}$ (min) w reakcji z PDE-I
7a	19,7	7g	10,2
7c	21,9	7h	9,3
7d*	3,9	7i*	6,1
7f	9,3	* Wyznaczone przy 10-krotnie wyższym stężeniu enzymu	

Wśród analogów ATP zawierających barwnik pirenowy można wyróżnić analogi z fosforanem propargilowym (**7f-h**) jako te, które są najlepiej rozpoznawane przez

enzym. Czasy półtrwania analogów zawierających ugrupowania C-fosfonianowe (**7a,c**) są 2-krotnie dłuższe. Analogi zawierające ugrupowanie fenyloetynylopirenowe (**7d,i**) są substratami dla PDE-I i ich czasy półtrwania są krótkie, jednak w eksperymentach z nimi użyto 10-krotnie wyższą ilość enzymu, aby przyspieszyć reakcję. Przy zastosowaniu tego samego stężenia enzymu, co dla sond zawierających piren, reakcja była zbyt powolna, by zaobserwować znaczące zmiany intensywności fluorescencji. Z tego powodu można wnioskować, że sondy te są zdecydowanie gorszymi substratami dla enzymu PDE-I w porównaniu z sondami zawierającymi piren.

Sondy nukleotydowe okazały się substratami dla PDE-I, a zmiany ich widma fluorescencji zachodzące w reakcji enzymatycznej pozwoliły na monitorowanie jej postępu w czasie. W kolejnym kroku sprawdzono, czy sondy te mogą być użyte w poszukiwaniu inhibitorów enzymu PDE-I. W tym celu przeprowadzono reakcje enzymatyczne z sondą **7f**, do których dodano w różnych stężeniach dwa znane inhibitory PDE-I: ApCH₂pF oraz ApCH₂ppF.²⁰⁸ (Rys. 116 a)



Rys. 116 a) Struktury inhibitorów użytych w eksperymencie, b),c) Krzywe inhibicji wyznaczone w eksperymencie z enzymem PDE-I oraz sondą **7f**, wyznaczone poprzez pomiar zmian fluorescencji monomerowej (b) lub ekscymerowej (c) sondy.

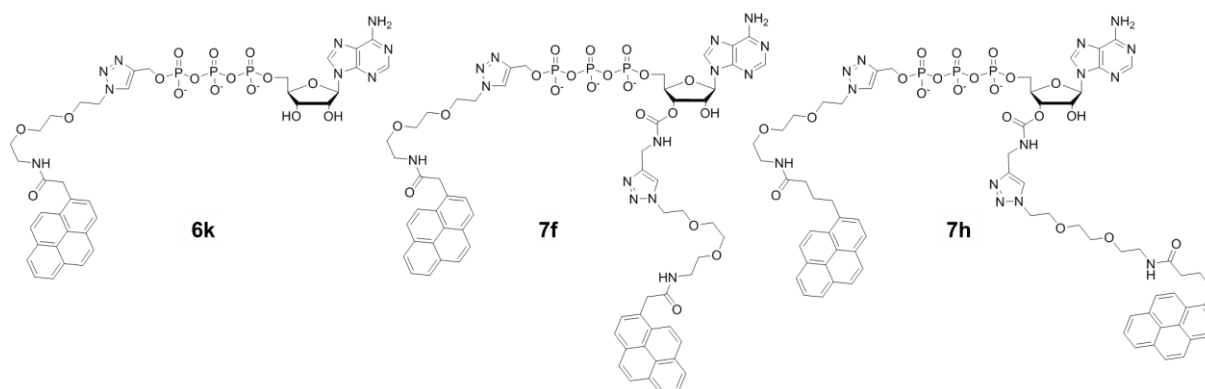
Wartości IC₅₀ wyznaczono poprzez przeprowadzenie reakcji enzymatycznych z różnymi stężeniami inhibitorów. Prędkość tych reakcji zmierzono stosując detekcję zarówno przy długości fali 378 nm (emisja monomerowa), jak i przy długości fali 490 nm (emisja ekscymerowa). (Rys. 116 b,c) Wyniki wraz z odniesieniem do wartości literaturowych stwierdzonych innymi metodami biofizycznymi umieszczono w tabeli

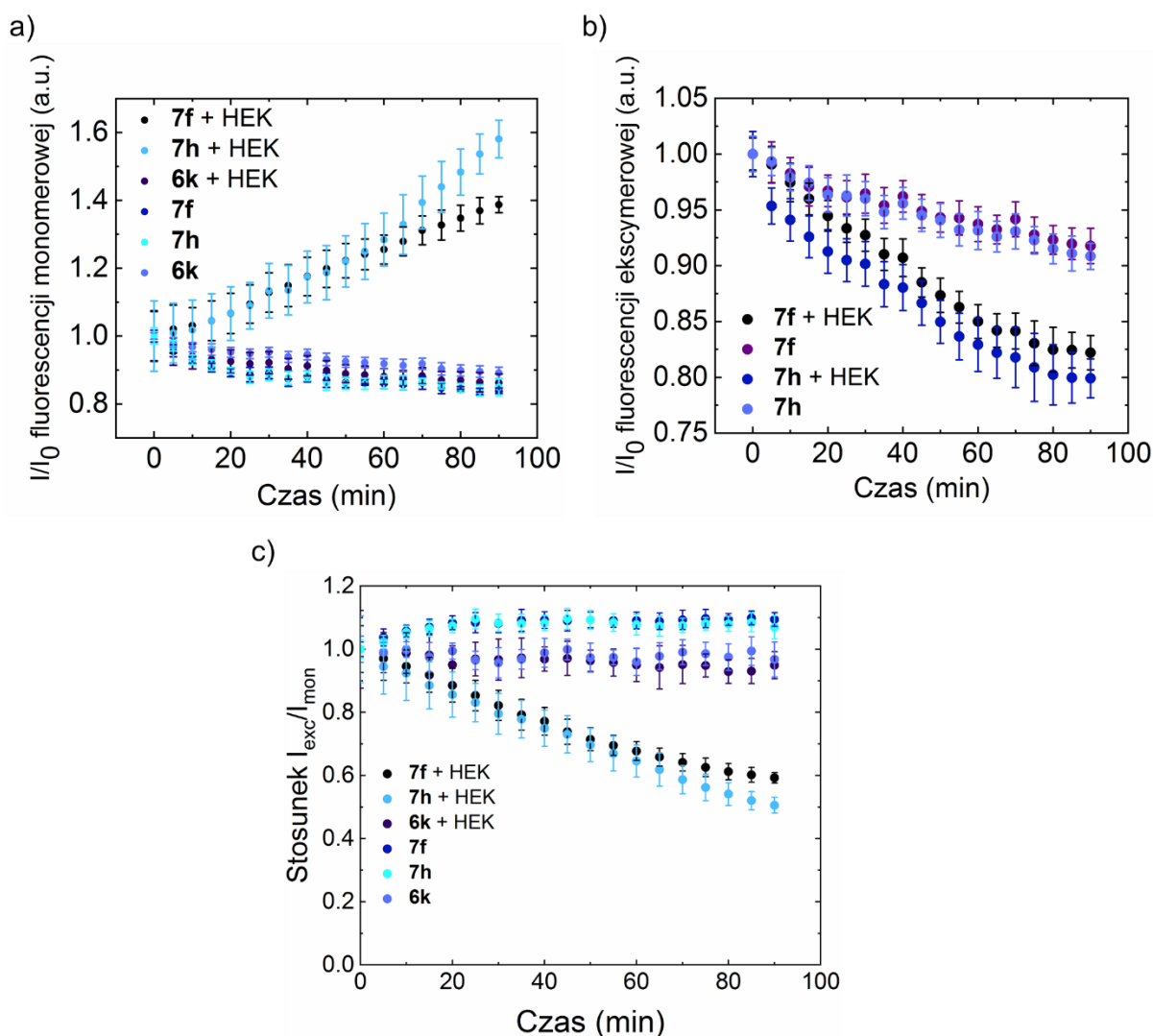
poniżej. (Tabela 4) Korelacja wartości IC₅₀ dwóch przebadanych inhibitorów sugeruje, że metoda korzystająca z opisywanych sond nukleotydowych ma potencjał jako narzędzie do przesiewowego sprawdzania potencjalnych inhibitorów enzymów hydrolizujących łańcuch oligofosforanowy nukleotydów.

Tabela 4

Inhibitor PDE-I	IC ₅₀ (μM) wg emisji monomeru (378 nm)	IC ₅₀ (μM) wg emisji ekscymeru (490 nm)	IC ₅₀ (μM) Wartość wyznaczona inną metodą ²⁰⁸
ApCH ₂ pF	0.549 ± 0.029	0.946 ± 0.190	1,21 ± 0.26
ApCH ₂ ppF	11.441 ± 0.497	14.694 ± 3.069	17,97 ± 5.34

Eksperyment z enzymem PDE-I był zastosowany jako *proof of concept* pokazujący potencjał sond nukleotydowych. Kolejnym krokiem było sprawdzenie, czy obserwowana *in vitro* zmiana widma fluorescencji będzie widoczna także w ekstraktach komórkowych. W komórkach znajduje się wiele enzymów degradujących ATP, jednak obecność wielu składników komórkowych mogła spowodować trudności w obserwacji fluorescencji. Eksperyment przeprowadzono z użyciem ekstraktu z komórek HEK 293-F Gibco w 50 mM buforze Tris-HCl pH 8, w 30 °C wykorzystując sondy **7f** oraz **7h**, jako kontrolę wykorzystując nukleotyd **6k**. Zgodnie z oczekiwaniami w czasie inkubacji można było zaobserwować wzrost intensywności fluorescencji monomerowej oraz spadek intensywności fluorescencji ekscymerowej sond **7f** oraz **7h**. (Rys. 117) W przypadku sond inkubowanych w roztworze pozbawionym komórek HEK można było zaobserwować spadek fluorescencji ekscymerowej (~10% w czasie 90 min.), jednak nie był on tak znaczny jak w przypadku sond inkubowanych z ekstraktem komórkowym.

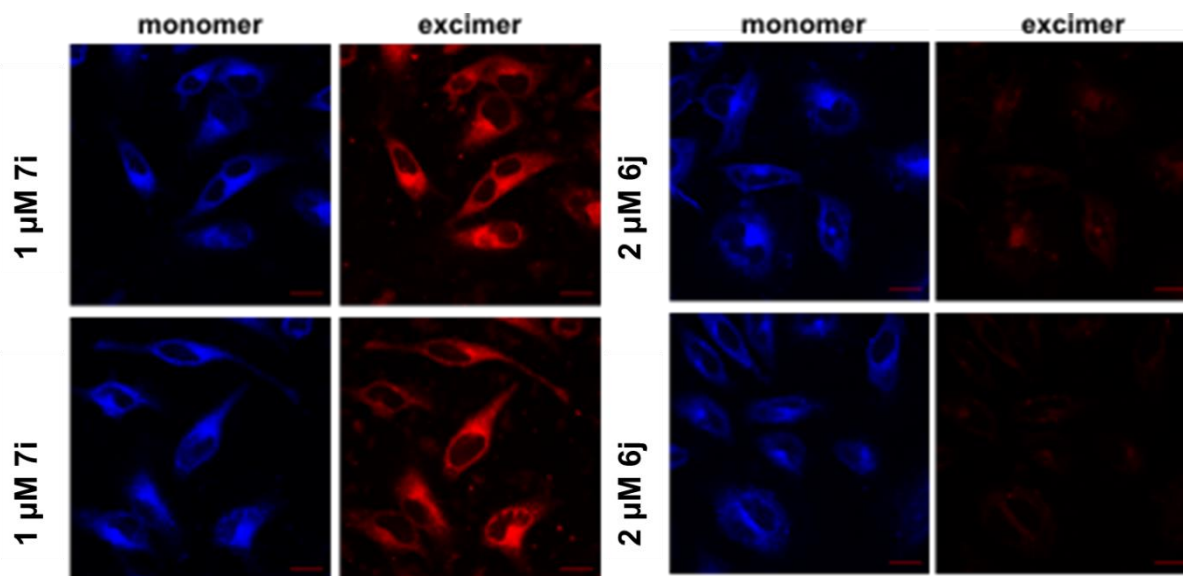




Rys. 117 a) względną zmianę w czasie intensywności fluorescencji monomerowej b) względną zmianę w czasie intensywności fluorescencji monomerowej c) zmianę w czasie stosunku intensywności fluorescencji ekscimerowej do intensywności fluorescencji monomerowej. Na wszystkich wykresach skala osi rzędnych została spłaszczona, w celu zachowania przejrzystości wykresu.

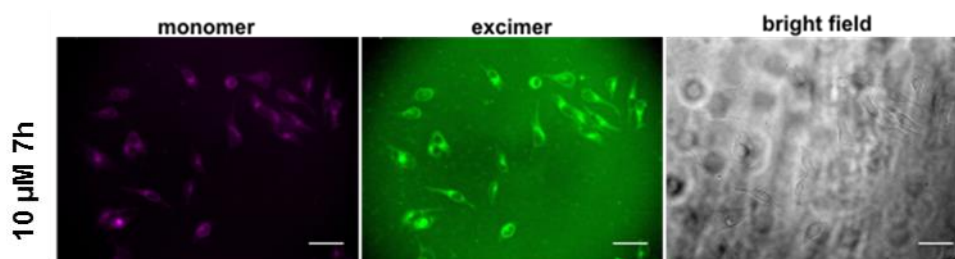
Ze względu na obecność łańcucha trifosforanowego nukleotydy i ich analogi są związkami bardzo polarnymi i przez to ich transport bierny do wnętrza komórki jest praktycznie niemożliwy (por. rozdz. 2.4). Analogi nukleotydów zawierające wysoce niepolarne grupy funkcyjne mogą jednak penetrować błonę komórkową. W eksperymencie nukleotydy **7i** oraz **6j** zawierające ugrupowanie fenyloetynylopirenowe (najbardziej niepolarny ze wszystkich zastosowanych barwników) były inkubowane z komórkami HeLa przez godzinę. Po tym czasie komórki zostały przemyte buforem PBS i utrwalone paraformaldehydem. Następnie przeprowadzono obserwację komórek z użyciem mikroskopu konfokalnego. Obraz był odbierany w zakresie długości fal 300 – 420 nm dla monomeru PEP, oraz 495 – 800 nm dla ekscymeru PEP. Na przedstawionych zdjęciach (Rys. 118) widać, że zarówno sonda **7i** jak i nukleotyd **6j** zlokalizowały się wewnątrz cytozolu komórek HeLa. W zakresie fluorescencji monomerowej widoczna jest fluorescencja zarówno **6j** jak i **7i**. W przypadku sondy **7i** nie jest jasne, czy obserwowana emisja to resztkowa fluorescencja monomerowa

występująca także w sondzie z dwoma fluoroforami, czy wynik degradacji sondy i odseparowania barwników. Z kolei w zakresie fluorescencji ekscymerowej emisję widać przede wszystkim w komórkach inkubowanych z sondą **7i**. Ślady emisji ekscymerowej widoczne w komórkach inkubowanych z nukleotydem **6j** mogą wskazywać na agregację nukleotydu (bądź samego barwnika, jeśli nukleotyd został zdegradowany przez enzymy) w określonych przedziałach komórki.



Rys. 118 Obraz z mikroskopu konfokalnego komórek HeLa po inkubacji z sondą **7i** oraz **6j**. $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$. Sondy zlokalizowały się w cytozolu, poza jądrami komórkowymi. W przypadku sondy **7i** barwnik pirenowy daje odpowiedź zarówno w zakresie fluorescencji monomerowej, jak i ekscymerowej. W przypadku nukleotydu **6j** barwnik daje przede wszystkim odpowiedź w zakresie fluorescencji monomerowej, wykazując jedynie słabą fluorescencję ekscymerową.

Sondy zawierające piren w ogólności nie były zdolne do penetracji błony komórkowej. Wyjątkiem była sonda **7h** zawierająca barwnik Py^{L} (**5a**). Prawdopodobnie na skutek obecności dłuższego linkera węglowodorowego, nukleotyd ten był na tyle niepolarny, żeby przedostać się przez błonę komórkową. Poniżej zaprezentowano zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego komórek HeLa inkubowanych z sondą **7h**. (Rys. 119) Podobnie jak w przypadku wcześniejszego eksperymentu widać, że nukleotydy lokują się w cytozolu poza jądrem komórkowym. Na zdjęciach można obserwować fluorescencję zarówno monomerową, jak i ekscymerową. Obecność fluorescencji monomerowej może wynikać podobnie jak w poprzednim przypadku, bądź to z reszkowych pasm fluorescencji monomerowej sondy, bądź to z faktu, że sonda została w pewnym stopniu zdegradowana, co skutkuje emisją charakterystyczną dla monomeru pirenu.

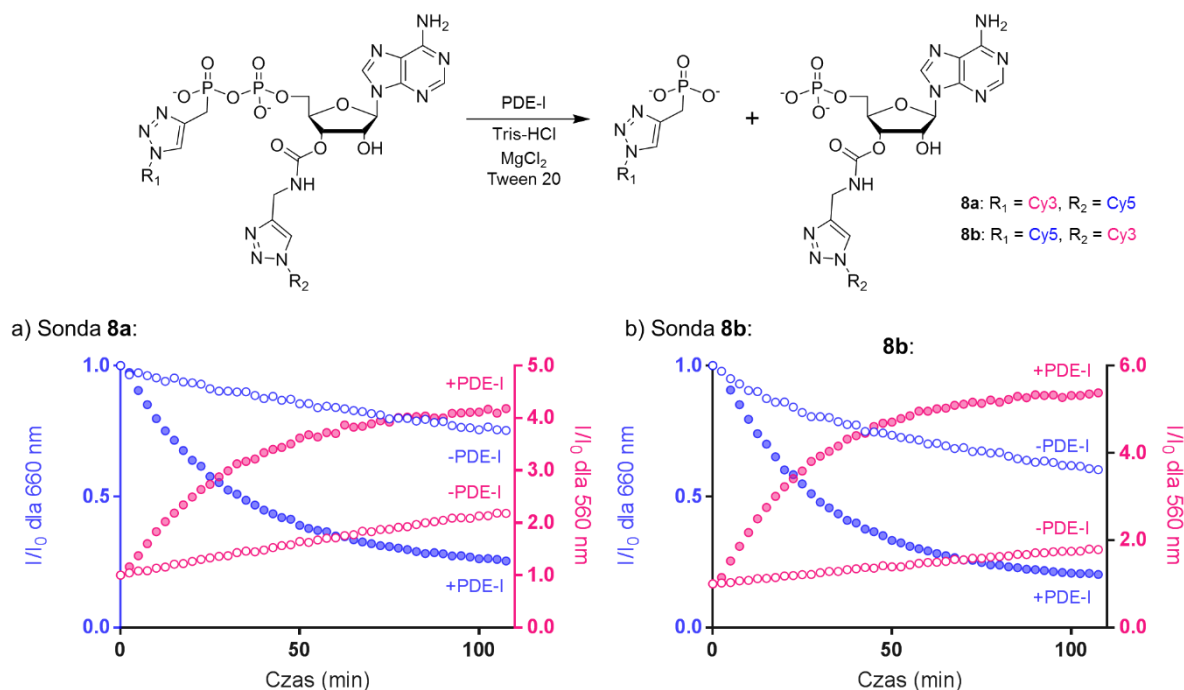


Rys. 119 Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego komórek HeLa inkubowanych z sondą **7h**.

18.3. Sondy FRET w badaniach enzymatycznych i komórkowych

Nukleotydy zawierające w swej strukturze pary FRET zostały poddane reakcji z enzymem PDE-I. Eksperymenty wykonywano w warunkach, w których fluorescencja sond i wykazywany przez nie efekt FRET były najwyższe – 50 mM bufor Tris-HCl o pH 8, 5 mM $MgCl_2$ oraz 0,05% Tween 20. Stężenie sondy wynosiło 100 nM, enzymu PDE-I zaś 3,2 nM. Pomiary wykonywano w temperaturze 30 °C. W rozdziale 18.3 eksperymenty z wykorzystaniem komórek HeLa zostały przeprowadzone przez dr. inż. Pawła Sikorskiego, natomiast analiza i interpretacja wyników zostały wykonane przez autora niniejszej pracy.

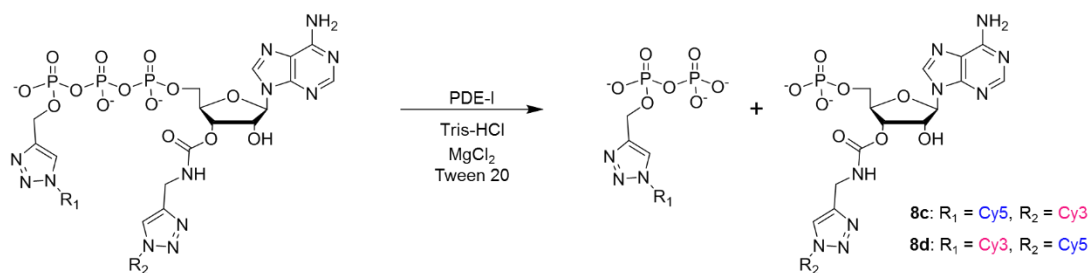
W pierwszym eksperymencie reakcji z enzymem PDE-I poddano analogi ADP – **8a** oraz **8b**. Zgodnie z oczekiwaniami obydwa nukleotydy okazały się substratami dla PDE-I, a w miarę postępu reakcji można było obserwować zmieniające się intensywności fluorescencji pasm cyjaniny 3 ($\lambda = 560$ nm) i cyjaniny 5 ($\lambda = 660$ nm). (Rys. 120)



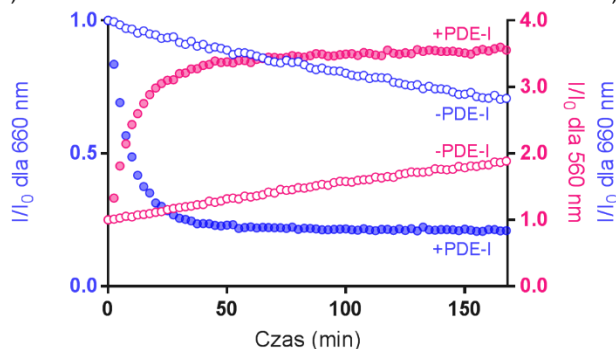
Rys. 120 a) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i cyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8a** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I. b) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i cyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8b** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I.

Obydwa badane sondy nie wykazują stabilnego efektu FRET w zaproponowanych warunkach i nawet pod nieobecność enzymu (konturowe symbole na wykresie) mają skłonność do spadku wydajności efektu FRET. Mimo to widać, że zmiany te różnią się istotnie w sytuacji, gdy w mieszaninie reakcyjnej znajduje się enzym PDE-I. Spadek intensywności fluorescencji cyjaniny 5 jest znacznie gwałtowniejszy w porównaniu z reakcją kontrolną w obydwu przypadkach. Analogicznie, wzrost intensywności cyjaniny 3 jest intensywniejszy w mieszaninie reakcyjnej zawierającej enzym, w stosunku do mieszaniny kontrolnej. Uwagę zwraca także różnica pomiędzy badanymi sondami. Sonda **8a** zmieniła intensywność fluorescencji cyjaniny 3 i cyjaniny 5 odpowiednio do 420% oraz 25% wartości początkowych. W przypadku sondy **8b** wartości końcowe wynoszą odpowiednio 537% oraz 20% wartości początkowych. Zjawisko to może sugerować, że enzym PDE-I preferuje nukleotyd zawierający większy podstawnik (cyjanina 5) przyłączony do reszty oligofosforanu.

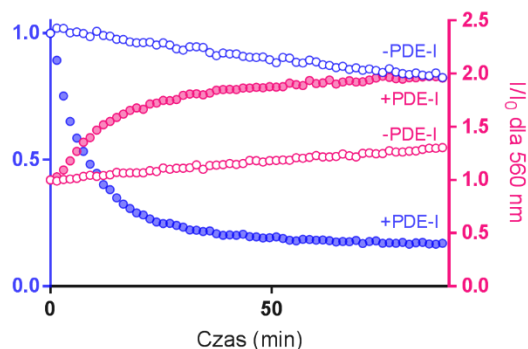
Potwierdzeniem tej obserwacji jest analogiczny eksperyment przeprowadzony dla analogów ATP – **8c** oraz **8d**. (Rys. 121) W tym przypadku intensywność fluorescencji donora (cyjanina 3) na koniec reakcji wzrosła w przybliżeniu dwukrotnie w stosunku do wyjściowej intensywności fluorescencji dla sondy **8d** oraz około 3,5-krotnie w stosunku do wyjściowej intensywności fluorescencji sondy **8c**. Intensywność akceptora (cyjanina 5) w obu przypadkach zmieniała się podobnie i pod koniec reakcji wynosiła około 20% wartości wyjściowej.



a) Sonda **8c**

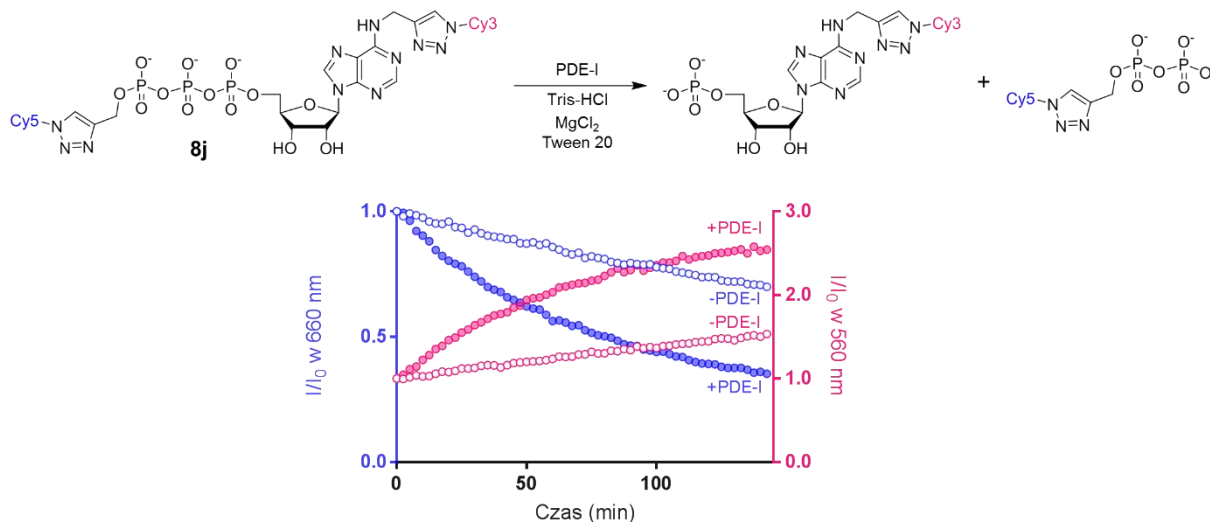


b) Sonda **8d**



Rys. 121 a) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i cyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8c** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I. b) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i cyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8d** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I.

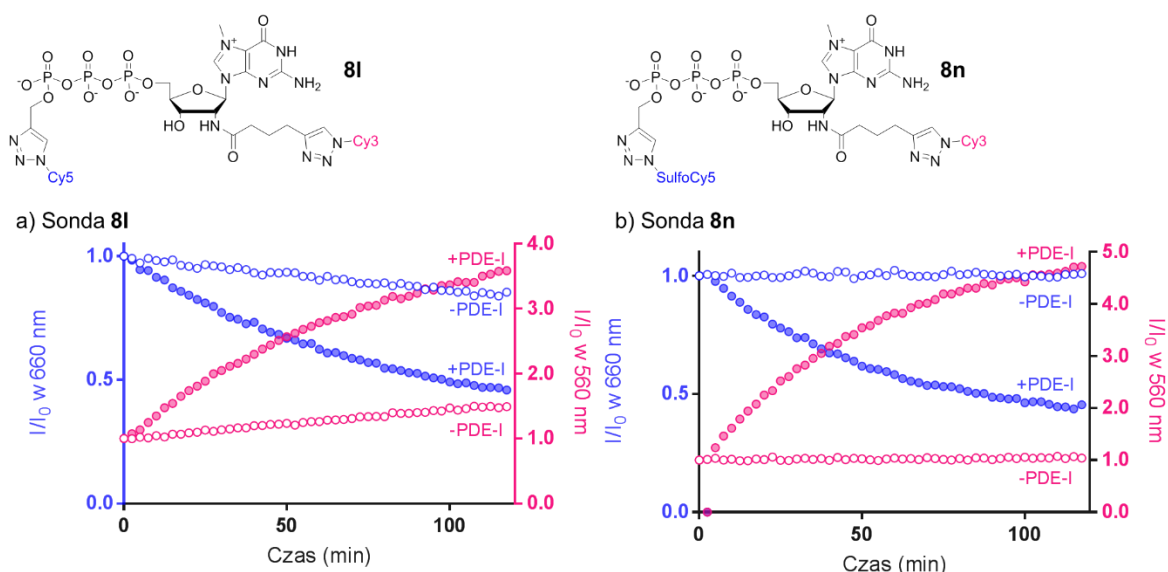
W przypadku sondy z cyjaniną 3 przyłączoną w obrębie zasady azotowej zmiany były jeszcze niższe. Wynosiły one dla cyjaniny 3 – około 2,5-krotność początkowej wartości intensywności fluorescencji, a w przypadku cyjaniny 5 około 1/3 początkowej wartości intensywności fluorescencji. (Rys. 122)

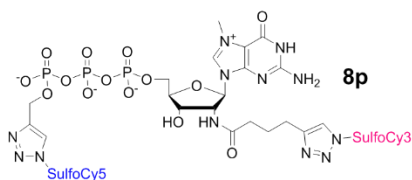


Rys. 122 zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i cyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8j** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I.

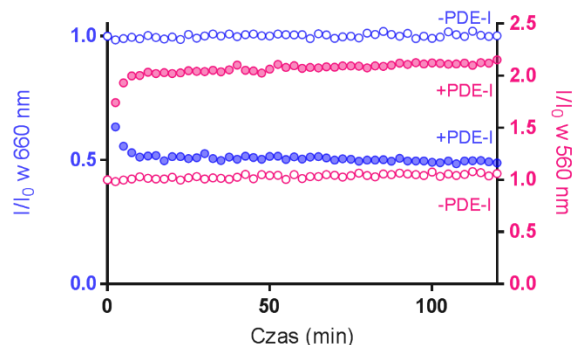
Pomimo zastosowania detergentu Tween 20 w mieszaninach reakcyjnych, efekt FRET wykazywany przez sondy adeninowe nie jest stabilny. Mimo to, występuje znacząca różnica pomiędzy układami, do których wprowadzono enzym PDE-I oraz tymi, które pełniły rolę kontroli negatywnej. W kolejnym podejściu postanowiono

sprawdzić, jak na przebieg reakcji enzymatycznej wpłynie zastosowanie analogów nukleotydów zawierających sulfocyjaniny. W badaniach spektroskopowych grupy sulfonowe przyłączone do znaczników w sondach nukleotydowych sprawdzały się dużo lepiej niż zastosowanie detergentu Tween 20 (por. rozdz. 17.3). Badanie wpływu sulfocyjanin na reakcję z enzymem PDE-I sprawdzono w eksperymencie z analogami trifosforanu 7-metyloguanozyny. W eksperymencie tym porównano trzy sondy zawierające sulfocyjaniny (**8n**, **8p**) oraz sondę **8l** jako kontrolę. W przypadku sondy **8p** plateau jest osiągnięte najszybciej. Mimo to wzrost intensywności fluorescencji sulfocyjaniny 3 jest jedynie około dwukrotny, z kolei spadek intensywności fluorescencji sulfocyjaniny 5 wynosi 50% (Rys. 123c,d). Może to oznaczać, że reakcja nie przebiegła do końca, gdyż prawdopodobnie rozbudowany substrat, jakim jest sulfocyjanina 3, utrudniała wiązanie nukleotydu z enzymem. W przypadku sondy **8l** wzrost intensywności fluorescencji cyjaniny 3 sięga ponad 350%, jednak reakcje kontrolne pokazują, że sonda ta wykazuje niestabilny w czasie efekt FRET. (Rys. 123a). Najlepsza kombinacja fluoroforów występuje w sondzie **8n**. Obecność sulfocyjaniny 5 zapewnia stabilność efektu FRET w czasie (w mieszaninie kontrolnej, bez enzymu PDE-I zmiany praktycznie nie zachodzą, Rys. 123b), natomiast mniejszy z dwóch fluoroforów przyłączony do reszty rybozy (cyjanina 3) nie utrudnia wiązania sondy z enzymem PDE-I.

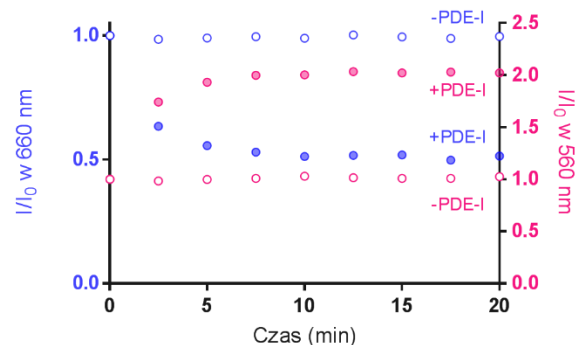




c) Sonda **8p**



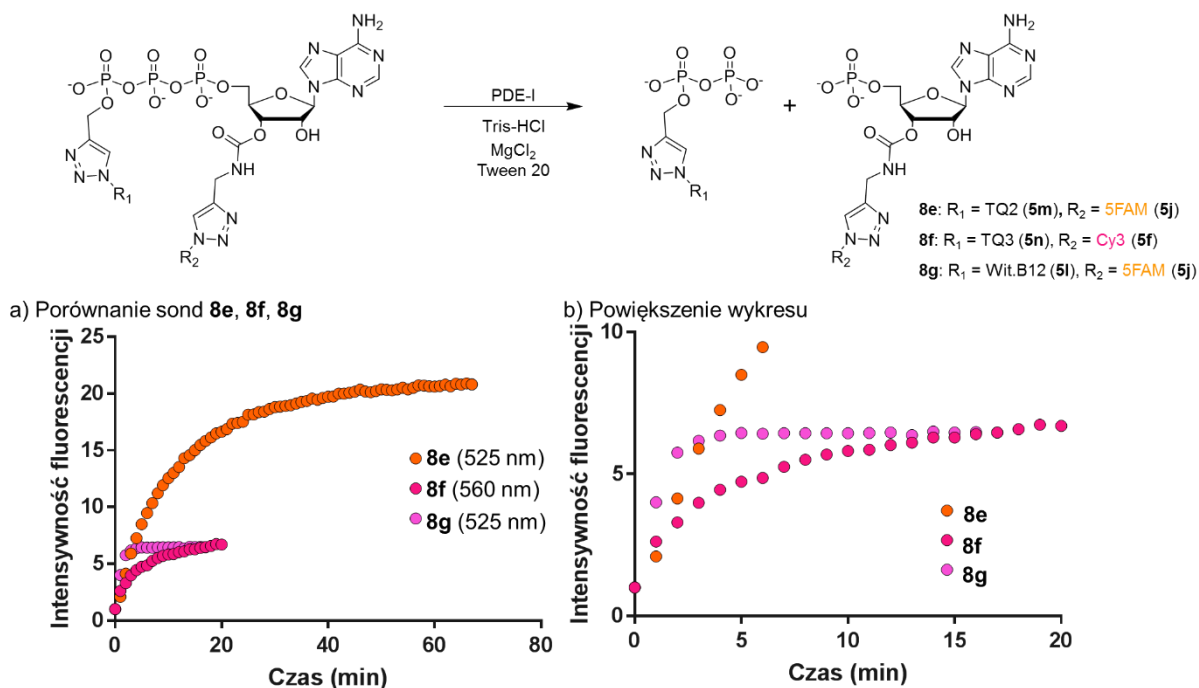
c) Sonda **8p** – powiększenie wykresu



Rys. 123 a) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i cyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8l** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I. b) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i sulfocyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8n** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I. c) zmiana fluorescencji sulfocyjaniny 3 (560 nm) i sulfocyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8p** w obecności i pod nieobecność enzymu PDE-I. d) przybliżenie wykresu z punktu c.

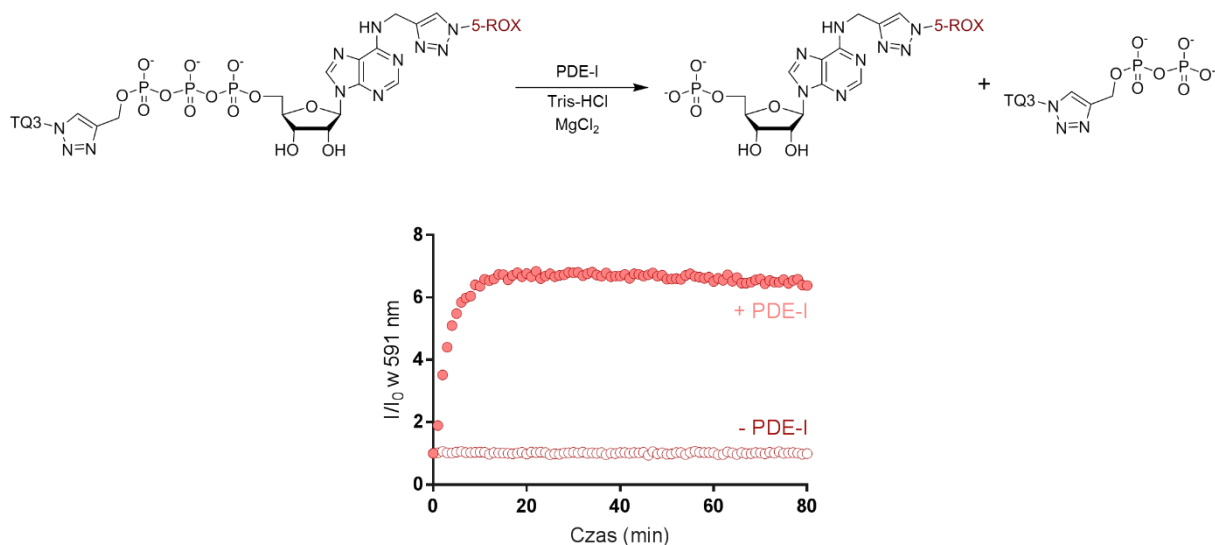
Sondy zawierające pary FRET (**8e**, **8f**, **8g**, **8k**, **8r**), z której akceptor pełni rolę wygaszacza (*quencher*) mają bardzo słabe właściwości emisyjne. Dopiero reakcja z pirofosfatazą PDE-I powoduje degradację łańcucha fosforanowego i odseparowanie fluoroforu i wygaszacza, co powoduje przyrost fluorescencji proporcjonalny do postępu reakcji hydrolizy. Związki te zostały zbadane w reakcji z enzymem PDE-I w 50 mM buforze Tris-HCl, 5 mM, stężenie sondy 100 nM, stężenie enzymu 3,2 nM, temperatura 30 °C. W tym przypadku nie stosowano Tween 20, gdyż jak pokazano w rozdziale 17.3 nie tylko nie poprawia on rozpuszczalności sondy, ale wręcz może obniżać wydajność efektu FRET.

W pierwszym podejściu w reakcji z PDE-I przetestowane zostały sondy **8e**, **8f** oraz **8g**. Na Rys. 124 przedstawiono znormalizowaną do wartości początkowych intensywność fluorescencji poszczególnych sond odczytywaną w maksimum ich emisji (525 nm dla sond z fluoresceiną, **8e**, **8g**, 560 nm dla sondy z cyjaniną 3, **8f**). Uwagę zwraca różnica w zdolności wygaszania fluorescencji poszczególnych wygaszaczy. Sondy z witaminą B12 oraz Tide Quencher 3 zwiększyły swoją intensywność fluorescencji w maksimum emisji ponad 5-krotnie. W przypadku Tide Quencher 2 (związek **8e**) reakcja trwała dłużej, jednak intensywność fluorescencji wzrosła w przybliżeniu 20 razy. Związek **8e** stanowi interesujący przykład czulej sondy, która może być wykorzystywana w badaniach enzymatycznych. Pozostałe dwie sondy wykazały mniejszą czułość, jednak szybkie osiągnięcie plateau sugeruje, że enzym PDE-I wykazuje do nich wyższe powinowactwo niż do sondy **8e**.



Rys. 124 Znormalizowana intensywność fluorescencji sond 8e, 8f oraz 8g w czasie reakcji z PDE-I.

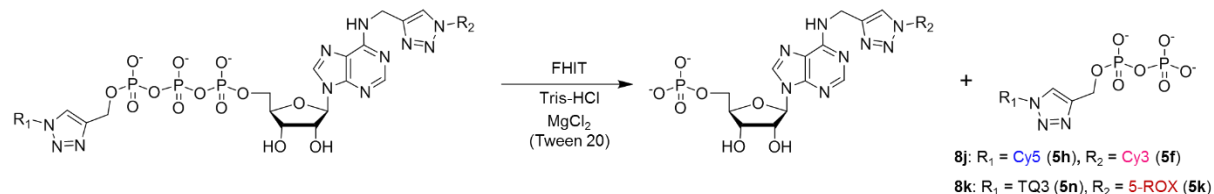
Analogiczny eksperyment z PDE-I przeprowadzono dla wygaszeniowej sondy 8k. Reakcję przeprowadzono w 50 mM buforze Tris-HCl, 5 mM, stężenie sondy 100 nM, stężenie enzymu 3,2 nM, temperatura 30 °C. Podobnie jak w powyższym przypadku nie używano detergentu Tween 20. Sonda 8k wykazała dobre powinowactwo do enzymu, a plateau zostało osiągnięte już po 20 minutach reakcji. Intensywność fluorescencji rodaminu X (5k) wzrosła w przybliżeniu do 660% wartości początkowej. Wyniki uzyskane w eksperymencie sugerują, że sonda 8k nie jest tak czuła sonda jak 8e, jednak enzym PDE-I wykazuje do niej dużo wyższe powinowactwo w porównaniu z sondą 8e.

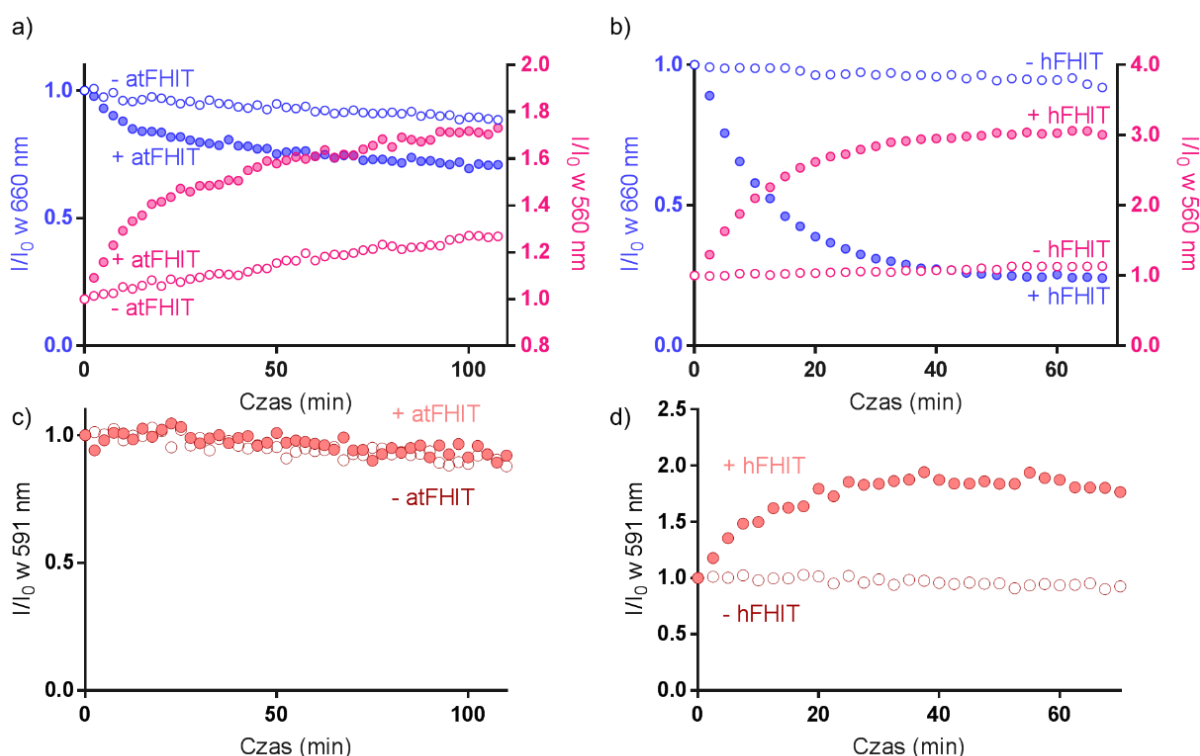


Rys. 125 Znormalizowana intensywność fluorescencji sond 8k w czasie reakcji z PDE-I

Ostatnim etapem badań enzymatycznych był eksperyment, w którym sprawdzono użyteczność sond nukleotydowych do śledzenia reakcji z bardziej specyficznym enzymem. Do eksperymentów wybrano białko FHIT (por. rozdz. 11.2). Ze względu na sposób wiązania naturalnego substratu ApppA analogi nukleotydów zawierające zablokowane grupy hydroksylowe 2',3'-OH nie są dobrymi substratami dla białka FHIT i nie były one w ogóle wiązane przez enzym. Z tego powodu w eksperymentach wykorzystano sondę wykazującą efekt FRET **8j** i sondę wygaszeniową **8k**. W badaniach wykorzystano dwa homologi białka FHIT – ludzki (hFHIT) oraz roślinny, pochodzący z rzodkiewnika pospolitego (atFHIT). Eksperymenty przeprowadzono w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 7,5, z dodatkiem 5 mM chlorku magnezu, 0,05% Tween 20 (tylko w przypadku **8j**), w 37 °C. Stężenie nukleotydu wynosiło 100 nM, enzymu 5 nM.

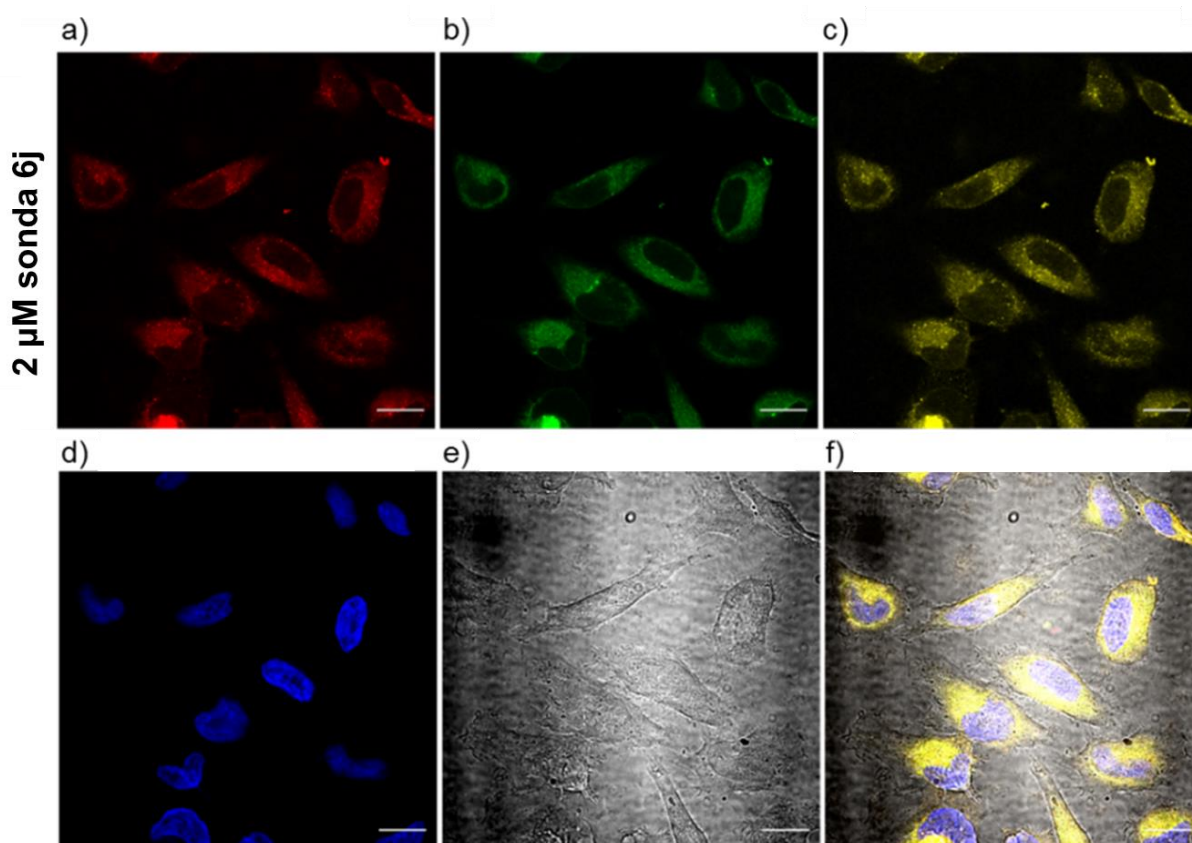
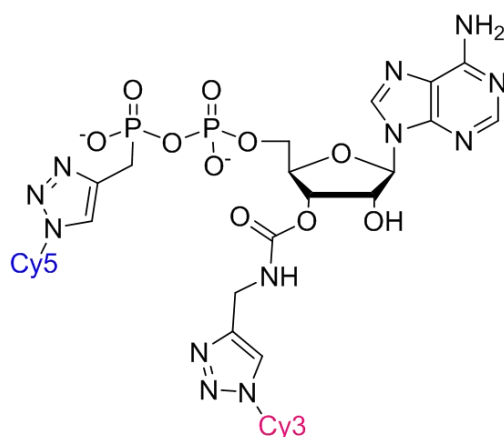
Z dwóch homologów to ludzki FHIT wykazał się większą tolerancją dla zastosowanych modyfikacji. W przypadku roślinnego enzymu i sondy **8j** intensywność fluorescencji cyjaniny 3 po 110 minutach wynosiła 173% pierwotnej, natomiast intensywność fluorescencji cyjaniny 5 – 71% początkowej. (Rys. 126a) Relatywnie niska zmiana wynika prawdopodobnie z niskiego powinowactwa atFHIT do sondy **8j**, gdyż w eksperymentach z innymi enzymami sonda ta wykazała zdolność do dużo większej zmiany intensywności fluorescencji obydwu znaczników (Rys. 122, Rys. 126b). W przypadku hFHIT końcowe intensywności fluorescencji wynosiły 300% intensywności pierwotnej cyjaniny 3 oraz 24% intensywności pierwotnej cyjaniny 5. (Rys. 126b) Większa tolerancja enzymu hFHIT jeszcze silniej została ukazana w przypadku eksperymentu z sondą wygaszeniową **8k**. Prawdopodobnie ze względu na rozmiar rodaminy X wiązanie z enzymem atFHIT w ogóle nie było możliwe, a reakcja praktycznie nie zaszła, co pokazuje wykres na Rys. 126c. Zmiany fluorescencji w mieszaninie zawierającej enzym są w przybliżeniu takie same jak zmiany fluorescencji w mieszaninie kontrolnej. W przypadku ludzkiego homologu enzymu FHIT zmiany są wyraźne, a intensywność fluorescencji rodaminy wzrasta w czasie reakcji niemal dwukrotnie.





Rys. 126 a) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i cyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8j** w obecności i pod nieobecność enzymu atFHIT. b) zmiana fluorescencji cyjaniny 3 (560 nm) i sulfocyjaniny 5 (660 nm) w sondzie **8j** w obecności i pod nieobecność enzymu hFHIT. c) zmiana fluorescencji rodamin (591 nm) w sondzie **8k** w obecności i pod nieobecność enzymu atFHIT. d) zmiana fluorescencji rodamin (591 nm) w sondzie **8k** w obecności i pod nieobecność enzymu hFHIT.

W ostatnim etapie badań sondy wykazujące efekt FRET zostały sprawdzone ze względu na ich zdolność do penetracji błony komórkowej żywych komórek. W tym celu wykorzystano sondę **8b** zawierającą parę cyjanin 3 i 5. Roztwór sondy o stężeniu 0,1 μM był inkubowany z komórkami HeLa przez godzinę. Po tym czasie komórki zostały przeemyte buforem PBS i utrwalone paraformaldehydem. Następnie przeprowadzono obserwację komórek z użyciem mikroskopu konfokalnego, rejestrując emisję fluorescencji w zakresie 560 – 630 nm i 640 – 700 nm, przy wzbudzeniu osobno akceptora i donora FRET (odpowiednio 555 nm oraz 639 nm). Wynik został zaprezentowany na zdjęciu poniżej (Rys. 127). Podobnie jak w przypadku sond ekscymerowych można zaobserwować, że nukleotydy znakowane fluorescencyjnie były w stanie przedostać się przez błonę komórkową i usytuować w cytozolu. Jednocześnie widać ciemne obszary wewnątrz komórek, co sugeruje, że błona jądrowa jest trudniejsza do pokonania i najwyższe stężenie sondy występuje w cytozolu. Na zdjęciach a i b, widać fluorescencję odpowiednich barwników po naświetlaniu światłem o charakterystycznych dla nich długościach fali wzbudzenia. Zdjęcie c, przedstawia emisję fluorescencji cyjaniny 5, powstałą poprzez naświetlanie światłem o długości fali charakterystycznej dla wzbudzenia cyjaniny 3, co dowodzi, że sondy te wykazują efekt FRET po ułożeniu się w cytozolu.



Rys. 127 Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek HeLa inkubowanych z sondą **8b**. a) emisja donora po naświetleniu światłem o długości fali charakterystycznym dla wzbudzenia donora b) emisja akceptora po naświetleniu światłem o długości fali charakterystycznym dla wzbudzenia akceptora c) emisja akceptora po naświetleniu światłem o długości fali charakterystycznym dla wzbudzenia donora d) barwnik Hoechst służący wizualizacji jąder komórkowych e) zdjęcie bez filtrów f) nałożenie obrazów c, d, e.

18.4. Podsumowanie rozdziału

Sondy przedstawione w niniejszym rozdziale wykazały przydatność w badaniach aktywności enzymów hydrolizujących nukleotydy. Wszystkie sondy okazały się podatne na degradację za pomocą enzymu PDE-I. Eksperymenty te pozwoliły zbadać, czy fluorescencja zmieniająca się w czasie reakcji faktycznie odpowiada postępowi

reakcji enzymatycznej, co było możliwe dzięki porównaniu zmieniających się intensywności fluorescencji barwników z wynikami otrzymanymi za pomocą techniki HPLC-MS.

Wstępne doświadczenia pokazały, że sondy mogą być wykorzystane w poszukiwaniu inhibitorów enzymów hydrolizujących nukleotydy. Dotąd pokazano to na przykładzie enzymu PDE-I, a wyniki IC_{50} dla znanych inhibitorów tego enzymu okazały się porównywalne z wartościami wyznaczonymi z użyciem innych metod. Sondy fluorescencyjne zostały też użyte do monitorowania reakcji bardziej specyficznych pirofosfataz. Sondy zawierające 7-metyloguaninę posłużyły do badań aktywności enzymu DcpS, jednak nie jest to bezpośrednio związane z tematyką niniejszej pracy. Sondy adeninowe zostały użyte w monitorowaniu aktywności dwóch homologów enzymu FHIT – ludzkiego (hFHIT) i roślinnego (atFHIT). Ludzki enzym wykazał wyższą tolerancję na rozbudowane fluorofory przyłączone do zasady azotowej. Zarówno sonda **8j** jak i **8k** okazały się przydatne w monitorowaniu jego aktywności. Mniejszą tolerancję wykazał enzym pochodzenia roślinnego. W jego przypadku sonda wygaszeniową **8k** nie została zdegradowana w ogóle. Prawdopodobnie duże znaczenie ma tutaj kwestia zawady sterycznej fluorofora. Im jest on większy, tym słabiej sonda oddziałuje z enzymem.

Niektóre z otrzymanych sond, zawierających barwniki Py^L, PEP, Cy3, Cy5, okazały się zdolne do penetracji błony komórkowej i lokowania się w cytozolu. Jest to istotna obserwacja, gdyż zwykle transport dkomórkowy związków tak polarnych jak nukleotydy sprawia wiele trudności. Obecnie we współpracy z Instytutem Chemii Fizycznej PAN prowadzone są badania nad wykorzystaniem opracowanych przeze mnie sond do badania aktywności enzymów hydrolitycznych w żywych komórkach metodą FLIM.

19. Podsumowanie

Głównym celem pracy było opracowanie sond nukleotydowych – narzędzi przydatnych w bezinwazyjnym monitorowaniu w czasie rzeczywistym reakcji enzymatycznych katalizowanych przez pirofosfatazy. Tego typu związki mogą znaleźć zastosowanie w monitorowaniu przebiegu reakcji katalizowanych przez te enzymy, poszukiwaniu inhibitorów pirofosfataz, czy w końcu w obserwacji procesów degradacji nukleotydów w warunkach *in vivo*.

Projekt składał się z dwóch głównych części – syntetycznej, w ramach której opracowano, zoptymalizowano i przeprowadzono syntezę analogów nukleotydów mogących służyć jako sondy molekularne, oraz spektroskopowej, w ramach której zbadano właściwości spektroskopowe otrzymanych związków, a także określono ich podatność na hydrolizę enzymatyczną, oraz zdolność do penetracji błony komórkowej i lokalizowania się w cytozolu.

Na realizację części syntetycznej składały się następujące zadania:

- Synteza analogów nukleotydów i analogów terminalnej reszty fosforanu zawierającej grupy alkinowe.

W ramach tego punktu zoptymalizowano syntezę analogów terminalnej reszty fosforanu – C-fosfonianu etynylowego, C-fosfonianu 2-propargilowego, oraz fosforanu propargilu. Wymienione związki otrzymano z wysokimi wydajnościami, a następnie użyto ich w reakcjach z *P*-imidazolidami nukleotydów, uzyskując szereg analogów nukleotydów zawierających jedną, bądź dwie grupy alkinowe w strukturze. Otrzymane związki były analogami różnych nukleotydów – adenozyne, guanozyne, cytydiny, urydiny, oraz 7-metyloguanozyne. Łącznie uzyskano 16 analogów nukleotydów zawierających jedną grupę alkinową przyłączoną do reszty terminalnego fosforanu, oraz 17 analogów nukleotydów zawierających dwie grupy alkinowe – jedną przyłączoną do reszty terminalnego fosforanu, a drugą w obrębie reszty nukleozydu.

- Opracowanie warunków wydajnej reakcji CuAAC nukleotydów ze znacznikami fluorescencyjnymi.

W ramach realizacji tego zadania zoptymalizowano warunki reakcji CuAAC nukleotydów zawierających jedną lub dwie grupy alkinowe z reagentami zawierającymi grupę azydkową. Odpowiednio dobrane stężenia reagentów, katalizatora, oraz odpowiednie proporcje rozpuszczalników pozwoliły na uzyskanie znakowanych nukleotydów i sond nukleotydowych z dobrymi wydajnościami. Pojedynczo znakowane nukleotydy były analogami nukleotydów purynowych, uzyskano ich 11 z dobrymi wydajnościami. Ponadto, wykorzystując reakcję CuAAC, otrzymano 19 sond ekscymerowych będących analogami trifosforanów adenozyne, guanozyne, cytydiny, oraz 7-metyloguanozyne.

- Opracowanie warunków sekwencyjnej reakcji CuAAC.

W toku eksperymentów związanych z optymalizacją syntezy sond ekscymerowych okazało się, że grupa alkinowa przyłączona do terminalnej reszty fosforanu nukleotydu jest bardziej reaktywna w reakcji CuAAC niż grupa alkinowa przyłączona do reszty rybozy. Wykonanie eksperymentów optymalizacyjnych pozwoliło ustalić najlepsze warunki dla regioselektywnej reakcji CuAAC. Podejście takie umożliwiło przyłączenie kolejno dwóch różnych znaczników do struktury nukleotydu, bez konieczności wykorzystania grup ochronnych, ani wydzielania produktu pośredniego. W ten sposób możliwa była synteza 18 analogów trifosforanów guanozyne, adenozyne, oraz 7-metyloguanozyne, zawierających w swej strukturze dwa różne znaczniki.

Druga część projektu obejmowała spektroskopową charakterystykę otrzymanych sond nukleotydowych. Badania te zrealizowano w następujących etapach:

- Badania spektroskopowe otrzymanych sond nukleotydowych.

Analogi nukleotydów zawierające dwa barwniki fluorescencyjne, czy to identyczne (w przypadku sond ekscymerowych), czy też różne (w przypadku sond FRET), aby były użyteczne w roli narzędzi do monitorowania postępu reakcji enzymatycznych, powinny wykazywać określone właściwości fluorescencyjne. Każda z otrzymanych

sond została oceniona pod względem właściwości emisyjnych (występowanie FRET lub emisji ekscymerowej) oraz ich stabilności w czasie. Ponadto na tym etapie stwierdzono, jak badane sondy zachowują się w roztworach zawierających popularne składniki buforów do prowadzenia reakcji enzymatycznych (jony metali, substancje buforujące, etc.). W wyniku przeprowadzonych eksperymentów niektóre z sond zostały wykluczone z dalszych badań (np. sondy zawierające barwnik cyjanowinylowy, ze względu na jego nietrwałość w $\text{pH} > 7$), inne z kolei wymusiły zmianę standardowych warunków reakcji enzymatycznych (np. sondy z PEP wymagały niższego stężenia soli metalu, a sondy z parą Cy3-Cy5 wymagały obecności detergentu Tween20). Doświadczenia zdobyte przy realizacji tego etapu projektu pozwoliły na przeprowadzenie badań enzymatycznych otrzymanych sond.

- Badania enzymatyczne sond nukleotydowych.

Optymalne warunki środowiska reakcji opracowane w ramach badań spektroskopowych pozwoliły na wykorzystanie sond do monitorowania reakcji enzymatycznych w czasie rzeczywistym. W pierwszym etapie każda z sond została poddana reakcji z niespecyficznym enzymem PDE-I. W przypadku każdej sondy w miarę trwania reakcji widmo fluorescencji zmieniało się. W przypadku sond ekscymerowych pojawiały się pasma fluorescencji monomerowej, w przypadku sond FRET pojawiało się pasmo fluorescencji charakterystyczne dla donora FRET, w przypadku sond wygaszeniowych wzrastało pasmo fluorescencji zastosowanego fluorofora. W celu wykluczenia niespecyficzných efektów zanikania fluorescencji, wykonano dodatkowe eksperymenty z wykorzystaniem HPLC-MS, co stanowiło niezależny od fluorescencji sposób detekcji produktów reakcji enzymatycznej. Eksperymenty z PDE-I wykazały, że zmiana fluorescencji odpowiada postępowi reakcji enzymatycznej, co potwierdziło, że sondy nukleotydowe faktycznie mogą być używane w celu monitorowania postępu reakcji enzymatycznej. Pozwoliło to wykorzystać sondy w badaniu aktywności bardziej specyficznych enzymów – DcpS (sondy zawierające 7-metyloguanoznę, eksperymenty nieujęte w niniejszej rozprawie) oraz FHIT (sondy zawierające adenozyne). W obydwu przypadkach sondy nukleotydowe umożliwiły obserwację reakcji enzymatycznej w czasie rzeczywistym, bez potrzeby ingerowania w układ reakcyjny.

- Badania właściwości sond w komórkach i lizatach komórkowych

W kolejnym etapie badań sprawdzono właściwości sond w lizatach komórek HEK. Pomimo złożonego środowiska reakcji, sondy były rozpoznawane przez komórkowe pirofosfatazy. Postęp reakcji można było obserwować śledząc zmieniające się widmo fluorescencyjne sond nukleotydowych.

W ostatnim etapie badań sondy zostały przebadane ze względu na ich zdolność do wnikania do wnętrza komórek HeLa. Wybrane sondy (zawierające barwniki Py^L, PEP, oraz pary Cy3-Cy5) okazały się zdolne do penetracji błony komórkowej i lokowania się w cytozolu. Obserwacja ta jest istotna, gdyż z jednej strony stanowi interesujący sposób dostarczania bardzo polarnych związków, jakimi są nukleotydy, do wnętrza

komórek, a z drugiej strony może pozwolić na badanie aktywności pirofosfataz wewnątrz komórki w warunkach *in vivo*.

Część eksperymentalna

20. Informacje ogólne

20.1. Odczynniki chemiczne użyte w pracy

Wszystkie odczynniki użyte w pracy zostały zakupione w firmach: Merck, wcześniej Sigma-Aldrich (większość odczynników chemicznych), Carbosynth (analogi nukleozydów), oraz Lumiprobe (barwniki fluorescencyjne zawierające azydek). W eksperymentach używana była woda ultraczysta (miliQ, MQ). Chromatografię jonowymienną Sephadex wykonywano z użyciem rozcieńczonych wodnych roztworów węglanu trietyloamoniowego (TEAB) o wyjściowym stężeniu 1,2 M. Bufory do HPLC zawierające octan amonu były przygotowywane z użyciem acetonitrylu lub metanolu HPLC Gradient Grade for LC-MS, stałego octanu amonu oraz 50% kwasu octowego, a następnie odgazowywane i przefiltrowane poprzez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem. Bufory zawierające acetonitryl oraz metanol przechowywane były w temperaturze pokojowej, natomiast bufory będące roztworami kwasu octowego i octanu amonu przechowywane były w temperaturze 4 °C.

20.2. Syntezy z użyciem reaktora mikrofalowego

Reakcje wspomagane mikrofalowo przeprowadzono z użyciem jednomodowego aparatu CEM Discover z generatorem mikrofal o częstotliwości 2,45 GHz. Reagenty oraz magnetyczny element mieszający umieszczano wewnątrz fiolki wykonanej z grubego szkła z membraną. Reakcje przeprowadzano przy następujących parametrach: program „dynamic power mode”, $P_{\max} = 5$ W i $T_{\max}$ w przedziale 40–50 °C z tolerancją zmian temperatury ± 1 °C. Temperatura, ciśnienie i moc panująca wewnątrz naczynia z reakcją były monitorowane za pomocą sensorów znajdujących się w wyposażeniu aparatury.

20.3. Chromatografia jonowymienna

Większość analogów nukleotydów otrzymanych w dużej skali (co najmniej 50 mg) oczyszczane było za pomocą jonowymiennej chromatografii kolumnowej na złożu DEAE-Sephadex (forma HCO_3^-). Po zakończeniu reakcji poprzez rozcieńczenie jej wodą, mieszanina była nakładana na złożo, przemywana wodą (do momentu, gdy eluat nie generował osadu po zmieszaniu z 1% wodnym roztworem AgNO_3), a następnie rozpoczynano elucję gradientową w liniowym gradiencie buforu TEAB w

wodzie MQ: 0 – 0,6 M dla związków o ładunku sumarycznym (-1), 0 – 0,8 M dla związków o ładunku sumarycznym (-2), 0 – 1,0 M dla związków o ładunku sumarycznym (-3), oraz 0 – 1,2 M dla związków o ładunku sumarycznym (-4). Zebrane frakcje były analizowane ze względu na ich absorbancję przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Związki we frakcjach przekraczających wartość absorbancji 1,0 analizowano za pomocą techniki HPLC-MS.

Zebrane frakcje były łączone, ich stężenie było oznaczane na podstawie pomiaru milijednostek optycznych ($mODU = \text{absorbancja} \times \text{objętość roztworu}$) w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 6 dla analogów zawierających 7-metyloguaninę, pH 7 dla pozostałych nukleotydów). Do roztworów dodawany był etanol 96% w celu ułatwienia rozkładu buforu TEAB, a następnie otrzymany roztwór odparowywany był do stałej masy. Resztki wilgoci usuwano przez kilkukrotne odparowywanie z acetonitrylem. Otrzymane trietyloamoniowe sole nukleotydów były przechowywane w temperaturze -20°C .

20.4. Chromatografia HPLC

Analizy metodą HPLC były przeprowadzane ze użyciem aparatu Agilent Tech. Series 1200 przy użyciu kolumn RP: Supelcosil LC-18-T HPLC (4,6x250 mm, przepływ 1,3 ml/min), Supelcosil LC-8 HPLC (4,6x250 mm, przepływ 0,75 ml/min) oraz Eclipse XDBC18 (4,5x150 mm, przepływ 1,0 ml/min). Detekcja UV zastosowana do wszystkich nukleotydów prowadzona była przy $\lambda = 254$ nm, w przypadku sond i znakowanych nukleotydów dodatkowa detekcja z użyciem detektora DAD ustawiona była na długość fali charakterystyczną dla maksimum absorpcji przyłączonego znacznika. Metody HPLC stosowane do analizy mieszanin reakcyjnych zostały podane poniżej. Metoda F posłużyła wyłącznie do monitorowania degradacji sondy nukleotydowej za pomocą enzymu PDE-I.

Metoda	Eluent A	Eluent B	Gradient eluentu B w czasie 15 min.	Kolumna
A	0.05 M bufor octanowy (pH 5.9)	MeCN	0–100%	Supelcosil LC-8
B	0.05 M bufor octanowy (pH 5.9)	MeOH	0–100%	Supelcosil LC-18-T
C	0.05 M bufor octanowy (pH 5.9)	MeCN	0–50%	Supelcosil LC-8
D	0.05 M bufor octanowy (pH 5.9)	MeOH	0–50%	Supelcosil LC-18-T
E	0.05 M bufor octanowy (pH 5.9)	MeOH	0–25%	Supelcosil LC-18-T

F	0.01 M bufor octanowy (pH 5.9)	MeCN	0–75%	Eclipse XDB-C18
---	--------------------------------	------	-------	-----------------

20.5. Otrzymywanie substratów w formie soli trietyloamoniowej.

Z względu na to, że nukleotydy dostępne są komercyjnie w formie różnych soli (sodowe, potasowe, amoniowe, lub też jako wolne kwasy), przed zastosowaniem ich w syntezach chemicznych przeprowadzanych w rozpuszczalnikach takich jak DMF czy DMSO konieczne jest przeprowadzenie ich w sól trietyloamoniową.

Substraty zakupione w formie kwasów (np. AMP) zawieszane były w 50% wodnym roztworze etanolu, a następnie do zawiesiny dodawano n+1 nadmiar trietyloaminy, gdzie n to liczba ładunków ujemnych w cząsteczce. Otrzymana zawiesina była mieszana aż do całkowitego rozpuszczenia nukleotydu. Po tym czasie woda i etanol były usuwane pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie produkt był suszony poprzez 3-4-krotne odparowanie z acetonitrylem.

Substraty dostępne jako sole litowców zamieniano na sole trietyloamoniowe z użyciem kolumny wypełnionej kationitem Dowex 50 W x 8 w formie soli trietyloamoniowej. Po nałożeniu wodnego roztworu nukleotydu, był on wymywany wodą MQ do czasu, aż wypływający eluat nie wykazywał absorbancji przy $\lambda = 260$ nm wyższej niż 0,9 A.U. Rozpuszczalniki z uzyskanego roztworu były usuwane pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie produkt był suszony poprzez 3-4-krotne odparowanie z acetonitrylem.

Substraty dostępne w postaci soli amoniowej rozpuszczane były w wodzie, do której dodawano równą objętość 96% etanolu, a następnie do roztworu dodawano n+1 nadmiar trietyloaminy, gdzie n to liczba ładunków ujemnych w cząsteczce. Rozpuszczalniki z uzyskanego roztworu były usuwane pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie produkt był suszony poprzez 3-4-krotne odparowanie z acetonitrylem.

20.6. Wyznaczanie ilości związku

Ze względu na to, że nukleotydy uzyskiwano w formie soli trietyloamoniowych, które nie zawsze miały ustaloną i stałą stechiometrię, a ponadto mogły być hydratami, wyznaczanie ilości takich związków na podstawie masy nie jest precyzyjne. Zamiast tego dla każdej partii związku wyznaczano ilość jednostek optycznych na mg (mODU/mg). Dokonywano tego poprzez rozpuszczenie naważki związku w wodzie (3–5 mg związku/300–500 μ l wody), a następnie badanie absorbancji otrzymanego roztworu do momentu uzyskania trzech zbliżonych wyników. W celu uzyskania liczby jednostek optycznych na mg, otrzymaną wartość podstawiano do wzoru:

$$\frac{\text{Absorbancja} \times \text{objętość roztworu}}{\text{masa związku}}$$

Jednostki optyczne uzyskane na podstawie pomiarów absorbancji związane są z ilością związku wyrażoną w molach następującą zależnością:

$$\frac{\text{Jednostki optyczne}}{\text{współczynnik ekstynkcji}} = \text{liczba moli}$$

Wykorzystując dwie podane wyżej zależności można było powiązać liczbę moli substancji w jej masie,. Współczynniki ekstynkcji dla nukleotydów w pH 7 są stabelaryzowane i zostały podane poniżej:

Zasada azotowa w nukleotydzie:	Współczynnik ekstynkcji dla $\lambda = 260 \text{ nm}$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
Guanina	12 080
7-metyloguanina	11 400 ¹
Adenina	15 020
6-propargiloadenina	19 950
Cytosyna	7 070
Urydyna	9 660
¹ – pochodne 7-metyloguaninowe analizowane są w buforze o pH = 6.	

20.7. Spektrometria mas i spektroskopia NMR

Struktury oraz czystość większości nukleotydów i innych produktów uzyskiwanych w skali powyżej 50 mg zostały potwierdzone za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HR MS), oraz spektroskopii protonowego oraz fosforowego jądrowego rezonansu magnetycznego. Struktura produktów reakcji CuAAC (sondy nukleotydowe oraz inne addukty nukleotydów ze znacznikami azydkowymi) została potwierdzona za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas. Widma masowe rejestrowano na aparacie Thermo Scientific LTQ OrbitrapVelos z dodatnią lub ujemną jonizacją typu elektrosprej (HR MS (-) ESI lub HR MS (+) ESI). Przed rejestracją widm NMR związki były oczyszczane za pomocą HPLC.

Pomiary wykonywano w temperaturze 25 °C korzystając na spektrometrze Bruker AVANCE III HD 500 MHz o częstotliwości rezonansowej 500 MHz (¹H NMR) i 202 MHz (³¹P NMR) lub ze spektrometru Varian UNITY-plus 400 MHz o częstotliwości rezonansowej 400 MHz (¹H NMR) i 162 MHz (³¹P NMR).

Próbki do analizy przygotowywane były poprzez rozpuszczenie 1 – 10 mg związku w 600 µl odpowiedniego deuterowanego rozpuszczalnika. Widma analizowano za

pomocą oprogramowania MestReNova 12.0 (Mestrelab Research S.L.). Przesunięcia chemiczne ^1H NMR (δH) oraz ^{31}P NMR (δP) wyrażono w ppm i odniesiono odpowiednio do 3-(trimetylosililo)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionianu sodu (TSP) oraz 20% kwasu fosforowego(V) w D_2O (wzorzec zewnętrzny).

20.8. Badania spektroskopowe i spektrofluorymetryczne

Widma absorpcyjne były nagrywane w temperaturze pokojowej za pomocą spektrofotometru Cary 100 UV-Vis (Agilent) z przystawką Dual Cell Peltier. Widma wzbudzenia i emisji fluorescencji były nagrywane z użyciem spektrofluorymetru Cary Eclipse (Agilent) zaopatrzonego w lampę ksenonową. Pomiary wykonywano w termostatowanych kuwetach o wymiarach 10 x 4 mm. Bufory były odgazowywane pod zmniejszonym ciśnieniem przed każdą serią pomiarów.

Widma absorpcyjne wykonywane były w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 8 (sondy z pirenem, PEP oraz sondy FRET) lub w 50 mM buforze MES-KOH o pH 6 (sondy z barwnikiem cyjanowinylowym) w temperaturze pokojowej, w kuwetach o wymiarach 10 x 2 mm (długość drogi optycznej – 10 mm). Widma fluorescencyjne były nagrywane w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 8 (sondy z pirenem, PEP oraz sondy FRET) lub w 50 mM buforze MES-KOH o pH 6 (sondy z barwnikiem cyjanowinylowym) w 30 °C w kuwecie kwarcowej o wymiarach 10 x 4 mm.

20.9. Eksperymenty z enzymem PDE-I

Enzym PDE-I (EC 3.1.4.1) z jadu węża (*C. adamanteus*) został zakupiony w formie zliofilizowanej z Sigmy-Aldrich. Roztwór wyjściowy o stężeniu 1 mg/ml został przygotowany przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości enzymu w 50% roztworze glicerolu w 110 mM buforze Tris-HCl o pH 8,9, zawierającym dodatkowo 110 mM NaCl oraz 15 mM MgCl_2 i był przechowywany w temperaturze -20 °C.

Przed przeprowadzeniem eksperymentów enzym był rozcieńczany za pomocą 50 mM buforu Tris-HCl o pH 8 do stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$. Reakcje prowadzono w temperaturze 30 °C w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 8, z dodatkiem 5 mM chlorku magnezu (1 mM MnCl_2 w przypadku sond z PEP). Użyte w reakcjach stężenie nukleotydów w przypadku sond ekscymerowych wynosiło 1 μM , w przypadku sond FRET 0,1 μM . Stężenie enzymu w przypadku sond ekscymerowych wynosiło 98,5 ng/ml (w reakcjach z sondami z pirenem), 1 $\mu\text{g/ml}$ (w reakcjach z sondami z PEP), lub 0,5 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku sond FRET. W przypadku sond z pochodnymi cyjanin 3 i 5, dodatkowo stosowano detergent Tween 20, którego stężenie w końcowej mieszaninie reakcyjnej wynosiło 0,05%.

Eksperymenty z monitorowaniem aktywności enzymu PDE-I z użyciem HPLC-MS przeprowadzono w opisanych wcześniej warunkach (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2) stężenie sondy **7f** 1 μM , stężenie enzymu PDE-I 99 ng/ml. Wykonane zostały 3

powtórzenia, każde w temperaturze 30 °C. Stałe objętości reakcji (10 µl) były pobierane z niej przed dodaniem enzymu (t = 0 min), a następnie w punktach czasowych 1, 5, 10, 15, 30 oraz 60 minut. Próbkę od razu po pobraniu były zamrażane w ciekłym azocie i rozmrażane tuż przed wprowadzeniem do układu HPLC-MS. Do analizy chromatograficznej wykorzystano metodę F (por. rozdz. 20.4), detekcji dokonywano za pomocą spektrometru masowego z potrójnym kwadrupolem (Sciex QTRAP 3200) w trybie jonizacji ujemnej.

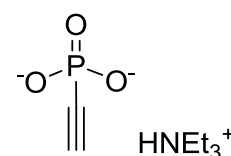
21. Syntezy chemiczne

21.1. Wstęp

C-fosfonian **1b**, C-fosfonian etynylowy dietylu (**1c**) oraz nukleotydy zawierające jedną grupę alkinową (**2a – 2l**) zostały otrzymane w ramach pracy magisterskiej,²⁰¹ opis syntez tych związków nie zostanie tutaj powtórzony.

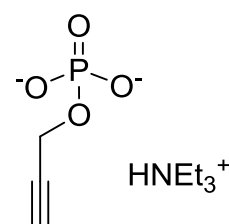
21.2. C-fosfonian etynylowy (**1a**)

C-fosfonian etynylowy dietylu (1 g, 6,17 mmol) rozpuszczono w 20 ml DCM, w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne. Następnie do roztworu dodany został bromotrimetylosilan (4,89 ml, 5,67 g, 37 mmol) i powstałą mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie nadmiar bromotrimetylosilanu został usunięty poprzez odparowanie, a pozostały olej rozpuszczono w 86 ml DMF i 86 ml trietyloaminy (62 g, 617 mmol). Roztwór ten mieszano w temperaturze 90 °C przez 3 h. Po tym czasie rozpuszczalniki usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt rozpuszczono w wodzie (20 ml) i 2-krotnie przemyto chloroformem (2 x 20 ml). Następnie wodę usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a produkt suszono w eksykatorze próżniowym z nad tlenkiem fosforu. Uzyskano 1,68 g (5,5 mmol, 89%) produktu w postaci brązowego żelu. ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 25 °C) δ_H 3.17 (6H, q, J = 7.4 Hz), 3.08 (1H, d, J = 12.1 Hz), 1.25 (9H, t, J = 7.4 Hz), ³¹P NMR (162 MHz, D₂O, 25 °C) δ_P -10.75 (1P, d, J = 13.2 Hz), HRMS (-) ESI m/z obliczono dla [M-H]⁻ = C₂H₂O₃P⁻: 104.9747, otrzymano: 104.9732.



21.3. Fosforan propargilu (**1c**)

Kwas fosforowy (III) (2,0 g, 24,4 mmol) rozpuszczono w alkoholu propargilowym (42,2 ml, 732 mmol) i do roztworu dodano trietyloaminę (10,12 ml, 73,2 mmol). Po 5 minutach mieszania do reakcji zaczęto dodawać porcjami jod (12,3 g, 48,8 mmol). Po dodaniu ostatniej porcji mieszanina była mieszana przez 30 minut, a następnie reakcję zakończono poprzez dodanie roztworu cykloheksyloaminy (14 ml, 122 mmol) w acetonie (633 ml). Powstały osad zwirowano, a następnie 3 razy przemyto go świeżymi porcjami acetonu. Ostatecznie osad osuszono w eksykatorze próżniowym. Sól cykloheksyloamoniową wymieniono na sól trietyloamoniową przy użyciu kationitu Dowex. Pożądany produkt uzyskano z wydajnością 73% (4,2 g, 17,8 mmol). ^1H NMR (400 MHz, D_2O , 25 °C) δ_{H} : 4.50 (2H, J = 9.6, 2.6, dd), 3.18 (6H, J = 7.4, q), 2.88 (1H, J = 2.4, t), 1.25 (9H, J = 7.4, t); ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , 25 °C) δ_{P} : 3.16 (1P, t, J = 9.6); HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4\text{P}^-$: 134.9853, otrzymano: 134.9839.



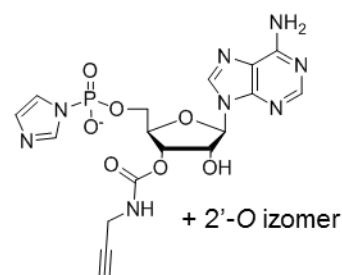
21.4. *P*-imidazolidy nukleotydów zawierających grupę *N*-propargilo-karbaminianową w pozycji 2'(3')-*O* rybozy **3a-e**.

21.4.1. Procedura ogólna

Sól trietyloamoniowa odpowiedniego nukleotydu została rozpuszczona w DMSO (1 mg na 10 μl), w naczyniu reakcyjnym przeznaczonym do stosowania w reaktorze mikrofalowym. Do uzyskanego roztworu dodany został 1,1'-karbonylodiimidazol (CDI, 10 eq.). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 20 minut (temp. = 50 °C, P_{max} = 5 W). Po tym czasie nadmiar CDI rozłożono z dodając wodę (25 eq.). Po ok. 5 minutach mieszania do reakcji dodano propargiloaminę (10 eq.) oraz DBU (5 eq.). Reakcję mieszano przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej postęp monitorowano z użyciem HPLC. Po stwierdzeniu całkowitej konwersji substratu (~1 h) produkt wytrącono z użyciem roztworu LiClO_4 (12 eq.) w acetonitrylu (10-krotność objętości użytego DMSO). Osad został trzykrotnie przemyty acetonitrylem i zwirowany. Otrzymany produkt został wysuszony, najpierw na powietrzu, a następnie w eksykatorze próżniowym.

21.4.2. *P*-imidazolid monofosforanu (*N*-propargilo)-2'(3')-*O*-karbamoiloadenozyny, sól litowa (**3a**)

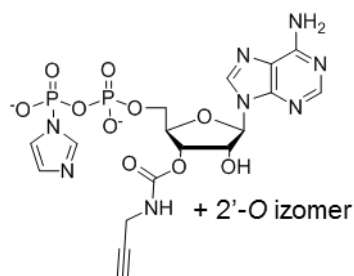
Zgodnie z procedurą ogólną 19.4.1 do reakcji użyto AMP (sól TEA, 0,73 mmol, 11 040 mODU) oraz 1,191 g CDI. Po zakończeniu ogrzewania do reakcji dodano 331 μl wody, a następnie propargiloaminę (470 μl , 7,35 mmol) oraz DBU (559 μl , 3,68 mmol). Po godzinie do reakcji dodano roztwór LiClO_4 (935 mg) w acetonitrylu (30 ml), uzyskując produkt w postaci soli litowej (90%, 9 936 mODU). Proporcja izomerów



2'/3' wyniosła odpowiednio 33% i 67% co stwierdzono z użyciem HPLC. Czas retencji HPLC RP (metoda B) to odpowiednio $t_R = 10,740$ min oraz $t_R = 12,091$ min. 2'-O-Izomer: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.26 (1H, m), 8.18 (1H, m), 7.81 (1H, m), 7.45 (1H, m), 6.91 (1H, m), 6.15 (1H, m), 5.49 (1H, m), 4.62 (1H, m), 4.29 (1H, m), 4.05–4.13 (2H, m), 3.94 (2H, m), 2.57 (1H, m) ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -7.19 (1P, m). 3'-O-Izomer: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.26 (1H, m), 8.18 (1H, m), 7.81 (1H, m), 7.45 (1H, m), 6.91 (1H, m), 6.03 (1H, m), 5.20 (1H, m), 4.90 (1H, m), 4.40 (1H, m), 4.05–4.13 (2H, m), 3.94 (2H, m), 2.57 (1H, m) ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -7.19 (1P, m).

21.4.3. *P*-imidazolid difosforanu (N-propargilo)-2'(3')-O-karbamoiloadenozyny, sól litowa (**3b**)

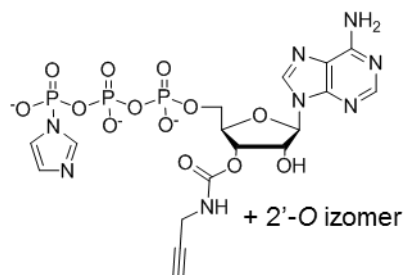
Zgodnie z procedurą ogólną 19.4.1 do reakcji użyto ADP (sól TEA, 1,17 mmol, 17 625 mODU) w 7,5 ml DMSO oraz 1,901 g CDI. Po zakończeniu ogrzewania do reakcji dodano 528 μl wody, a następnie propargiloaminę (751 μl , 11,74 mmol) oraz DBU (892 μl , 5,98 mmol). Po godzinie do reakcji dodano roztwór LiClO_4 (1 368 mg) w acetonitrylu (83 ml), uzyskując produkt w postaci soli litowej (87%, 15



400 mODU). Proporcja izomerów 2'/3' wyniosła odpowiednio 36% i 64% co stwierdzono z użyciem HPLC. Czas retencji HPLC RP (metoda B) to odpowiednio $t_R = 7,433$ min oraz $t_R = 8,673$ min. 2'-O-Izomer: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.33 (1H, s), 8.17 (1H, s), 7.89 (1H, m), 7.09 (1H, m), 6.94 (1H, m), 6.06 (1H, m), 5.22 (1H, m), 4.83 (1H, m), 4.42 (2H, m), 4.35 (1H, m), 4.03–4.08 (2H, m), 2.52 (1H, m) ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -11.01 (1P, m), -18.94 (1P, m). 3'-O-Izomer: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.36 (1H, s), 8.19 (1H, s), 7.89 (1H, m), 7.09 (1H, m), 6.94 (1H, m), 6.20 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 5.37 (1H, dd, $J = 5.9, 5.1$ Hz), 4.53 (1H, dd, $J = 5.9, 3.1$ Hz), 4.42 (2H, m), 4.31 (1H, m), 4.03–4.08 (2H, m), 2.52 (1H, m) ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -11.01 (1P, m), -18.94 (1P, m).

21.4.4. *P*-imidazolid trifosforanu (N-propargilo)-2'(3')-O-karbamoiloadenozyny, sól litowa (**3c**)

Zgodnie z procedurą ogólną 19.4.1 do reakcji użyto ATP (sól TEA, 647 μmol , 9 720 mODU) w 4,86 ml DMSO oraz 1,048 g CDI. Po zakończeniu ogrzewania do reakcji dodano 291 μl wody, a następnie propargiloaminę (356 μl , 6,471 mmol) oraz DBU (492 μl , 3,24 mmol). Po godzinie do reakcji dodano roztwór LiClO_4 (823 mg) w acetonitrylu (48,6 ml), uzyskując produkt w postaci soli litowej (67%, 6 537 mODU). Proporcja izomerów 2'/3' wyniosła

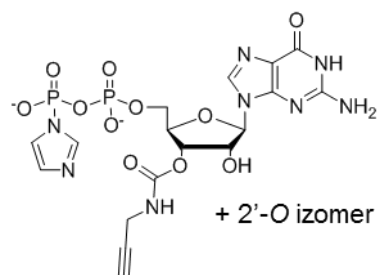


odpowiednio 35% i 65% co stwierdzono z użyciem HPLC. Czas retencji HPLC RP (metoda B) to odpowiednio $t_R = 7,393$ min oraz $t_R = 7,725$. 2'-O-Izomer: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.45 (1H, m), 8.24 (1H, m), 7.93 (1H, m), 7.32 (1H, m), 6.96 (1H, m), 6.25

(1H, m), 5.43 (1H, m), 4.62 (1H, m), 4.34 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.96 (2H, m), 2.5 (1H, m) ³¹P NMR (202 MHz, D₂O): -10.72 (1P, m), -18.95 (1P, m), -22.67 (1P, m). 3'-O-izomer: ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8.45 (1H, m), 8.24 (1H, m), 7.93 (1H, m), 7.32 (1H, m), 6.96 (1H, m), 6.12 (1H, m), 5.30 (1H, m), 4.92 (1H, m), 4.48 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.96 (2H, m), 2.5 (1H, m) ³¹P NMR (202 MHz, D₂O): -10.72 (1P, m), -18.95 (1P, m), -22.67 (1P, m).

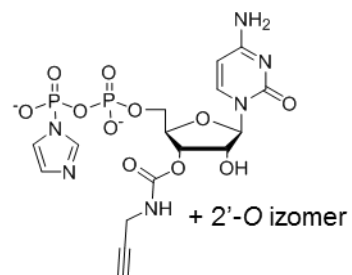
21.4.5. *P*-imidazolid difosforanu (N-propargilo)-2'(3')-O-karbamoilguanozyny, sól litowa (**3d**)

Zgodnie z procedurą ogólną 19.4.1 do reakcji użyto GDP (sól TEA, 691 μmol, 8 350 mODU) w 5,0 ml DMSO oraz 1,120 g CDI. Po zakończeniu ogrzewania do reakcji dodano 311 μl wody, a następnie propargiloaminę (442 μl, 6,912 mmol) oraz DBU (525 μl, 3,456 mmol). Po godzinie do reakcji dodano roztwór LiClO₄ (879 mg) w acetonitrylu (55 ml), uzyskując produkt w postaci soli litowej (99%, 8 240 mODU). Proporcja izomerów 2'/3' wyniosła odpowiednio 35% i 65% co stwierdzono z użyciem HPLC. Czas retencji HPLC RP (metoda B) to odpowiednio t_R = 7,470 min oraz t_R = 8,649 min. 2'-O izomer ¹H NMR (500 MHz, D₂O) 7.93 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.08 (1H, s), 6.96 (1H, d, *J* = 5.9 Hz), 6.03 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 5.42 (1H, t, *J* = 5.3 Hz), 4.55 (1H, t, *J* = 4.8 Hz), 4.25 (1H, m), 4.05 – 4.02 (2H, m), 3.95 (2H, s), 3.84 (1H, s), ³¹P NMR (202 MHz, D₂O) -10.71 – -11.36 (m), -18.94 (d, *J* = 21.2 Hz). 3'-O izomer: ¹H NMR (500 MHz, D₂O) 7.88 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.08 (1H, s), 6.96 (1H, s), 5.89 (1H, d, *J* = 6.3 Hz), 5.21 (1H, d, *J* = 4.2 Hz), 4.87 – 4.83 (1H, m), 4.38 (1H, m), 4.14 – 4.09 (1H, m), 4.05 – 4.02 (1H, m), 3.95 (2H, s), 3.84 (1H, s), ³¹P NMR (202 MHz, D₂O) -10.71 – -11.36 (m), -18.94 (d, *J* = 21.2 Hz).



21.4.6. *P*-imidazolid difosforanu (N-propargilo)-2'(3')-O-karbamoilocytydyny, sól litowa (**3e**)

Difosforan cytydyny (sól TEA, 3 802 mODU, 0,54 mmol) rozpuszczono w DMSO (2,16 ml), a następnie dodano CDI (435 mg, 2,70 mmol). Mieszaninę reakcyjną poddano ogrzewaniu w reaktorze mikrofalowym przez 20 minut (temp. = 45 °C, P_{max} = 5 W). Po tym czasie nadmiar CDI rozłożono z użyciem wody (121 μl), reakcja została rozcieńczona 2,16 ml DMF, i schłodzona do 0 °C. Następnie do reakcji dodano propargiloaminę (177 μl, 3,26 mmol) oraz DBU (204 μl, 1,34 mmol). Postęp reakcji prowadzono z użyciem HPLC. Po stwierdzeniu 100% konwersji substratu (po ok. 2 h) do reakcji dodano roztwór LiClO₄ (627 mg) w acetonitrylu (23,8 ml). Otrzymany osad wirowano przemywając trzykrotnie acetonitrylem. Produkt był wysuszony najpierw na powietrzu, a następnie w



eksykatorze próżniowym. Proporcja izomerów 2'/3' wyniosła odpowiednio 40% i 60% co stwierdzono z użyciem HPLC. Czas retencji HPLC RP (metoda B) to odpowiednio $t_R = 6,158$ min oraz $t_R = 6,922$ min. 2'-O-Izomer: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): 7.88 (1H, m), 7.74 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.00 (1H, m), 6.03 (1H, d, $J = 5.8$ Hz), 6.01 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.03 (1H, dd, $J = 5.8, 3.1$ Hz), 4.35 (1H, m), 4.11 (1H, m), 4.04 (2H, m), 3.85 (2H, bs), 2.56 (1H, s), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -10.97 (1P, m), -18.95 (1P, m). 3'-O-Izomer: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): ^1H NMR (400 MHz, D_2O): 7.88 (1H, m), 7.72 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.28 (1H, m), 7.00 (1H, m), 6.02 (1H, d, $J = 5.8$ Hz), 5.98 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.06 (1H, dd, $J = 5.8, 3.9$ Hz), 4.31 (1H, m), 4.15 (1H, m), 4.00 (2H, m), 3.89 (2H, bs), 2.56 (1H, m), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -10.97 (1P, m), -18.95 (1P, m).

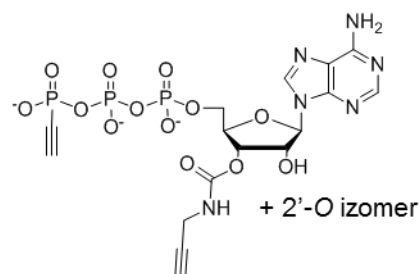
21.5. Synteza nukleotydów zawierających grupę alkinową w obrębie oligofosforanu oraz grupę *N*-propargilokarbaminianową w obrębie rybozy **4a-i**

21.5.1. Ogólna procedura sprzęgania analogów fosforanu z *P*-imidazolidami nukleotydów

Odpowiedni *P*-imidazolid nukleotydu w formie soli litowej (1 eq.) oraz odpowiedni analog fosforanu (3 eq.) w formie soli trietyloamoniowej rozpuszczano w DMF (2 ml na 100 mg nukleotydu). Otrzymaną zawiesinę mieszano przez 5 minut, po czym dodawano do niej bezwodny chlorek magnezu (3–4 eq), co po około 15 minutach powodowało uzyskanie klarownego roztworu. Postęp reakcji monitorowano z użyciem HPLC RP. Po stwierdzeniu 100% konwersji substratu (ok. 1 h), do reakcji dodawano wodę (10 objętości użytego DMF). Produkt oczyszczano za pomocą chromatografii jonowymiennej.

21.5.2. Nukleotyd **4a**

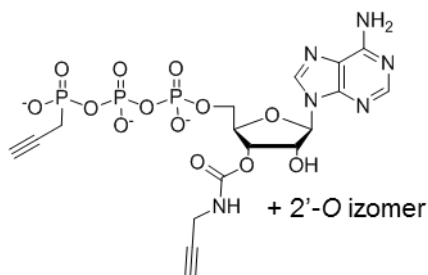
Nukleotyd **3b** (1 848 mODU, 0,123 mmol) oraz C-fosfonian etynyłowy (**1a**, 0,431 mmol) zawieszono razem w DMF (2,4 ml). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (46,8 mg, 0,492 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 24 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex z użyciem gradientu 0–1,0 M TEAB i wyizolowano jako sól trietyloamoniową (1 340 mODU, 0,089 mmol, 73%). Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 31% do 69%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów wynosiły odpowiednio $t_R = 9,477$ min oraz $t_R = 10,228$ min (metoda D). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{P}_3^-$: 595.0150 otrzymano 595.0156. 2'-O-Izomer: ^1H NMR (400 MHz,



D₂O): 8.49 (1H, s), 8.22 (1H, s), 6.25 (1H, d, $J = 4.7$ Hz), 5.46 (1H, dd, $J = 4.7$ Hz, 5.9 Hz), 4.74 (1H, dd, $J = 5.9$, 4.4 Hz), 4.41 (1H, m), 4.33-4.20 (2H, m), 3.79 (2H, bs), 3.17 (8.4H, q, $J = 7.4$ Hz sól TEA), 2.95 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.51 (1H, bs), 1.25 (15H, t, $J = 7.4$ Hz, sól TEA), ³¹P NMR (162 MHz, D₂O): -10.87 (1P, dd, $J = 18.5$, 7.6 Hz), -21.03 (1P, dd, $J = 18.5$, 12.3 Hz), -23.02 (1P, t, $J = 18.5$ Hz,) 3'-O-Izomer: ¹H NMR (400 MHz, D₂O): 8.56 (1H, s), 8.24 (1H, s), 6.13 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 5.38 (1H, dd, $J = 5.5$, 3.0 Hz), 4.98 (1H, dd, $J = 7.0$, 5.5 Hz), 4.56 (1H, dd, $J = 5.2$, 3.0 Hz), 4.33-4.20 (2H, m), 3.94 (2H, bs), 3.17 (8.4H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.95 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.61 (1H, bs), 1.25 (15H, t, $J = 7.4$ Hz), ³¹P NMR (162 MHz, D₂O): -10.87 (1P, dd, $J = 18.5$, 7.6 Hz), -21.03 (1P, dd, $J = 18.5$, 12.3 Hz), -23.02 (1P, t, $J = 18.5$ Hz,).

21.5.3. Nukleotyd **4b**

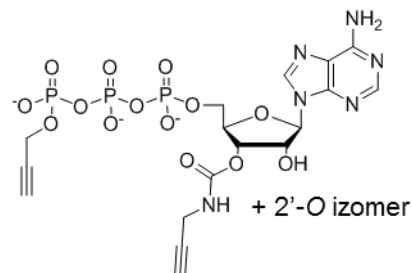
Nukleotyd **3b** (1 386 mODU, 0,092 mmol) oraz C-fosfonian propargilowy (**1b**, 0,323 mmol) zawieszono razem w DMF (1,8 ml). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (35,1 mg, 0,369 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 18 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex z użyciem



gradientu 0–1,0 M TEAB i wyizolowano jako sól trietyloamoniową (1 222 mODU, 0,081 mmol, 88%). Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 39% do 61%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów wynosiły odpowiednio $t_R = 9,521$ min oraz $t_R = 10,374$ min (metoda D). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{17}H_{20}N_6O_{13}P_3^-$: 609.0307, otrzymano 609.0311. 2'-O-Izomer: ¹H NMR (400 MHz, D₂O): 8.51 (1H, s), 8.27 (1H, s), 6.26 (1H, d, $J = 3.9$ Hz), 5.47 (1H, dd, $J = 5.9$, 3.9 Hz), 4.76 (1H, m, przykryty pikiem od HDO), 4.41 (1H, m), 4.33-4.26 (2H, m), 3.81 (2H, m), 2.74 (2H, dt, $J = 22.0$, 3.0 Hz), 2.52 (1H, m), 2.28 (1H, m), ³¹P NMR (162 MHz, D₂O): 11.90 (1P, dtd, $J = 22.1$, 22.0, 3.0 Hz), -8.51 (1P, dd, $J = 19.1$, 4.0 Hz), -20.16 (1P, dd, $J = 22.1$, 19.1 Hz), 3'-O-Izomer: ¹H NMR (400 MHz, D₂O): 8.57 (1H, s), 8.28 (1H, s), 6.14 (1H, dd, $J = 7.0$ Hz), 5.37 (1H, m), 4.97 (1H, dd, $J = 7.0$, 4.3 Hz), 4.55 (1H, m), 4.33-4.26 (2H, m), 3.94 (2H, m), 2.74 (2H, dt, $J = 22.0$, 3.0 Hz), 2.61 (1H, m), 2.28 (1H, m), ³¹P NMR (162 MHz, D₂O): 11.76 (1P, dtd, $J = 22.1$, 22.0, 3.0 Hz), -8.51 (1P, dd, $J = 19.0$, 4.0 Hz), -20.16 (1P, td, $J = 23.0$, 13.0 Hz).

21.5.4. Nukleotyd **4c**

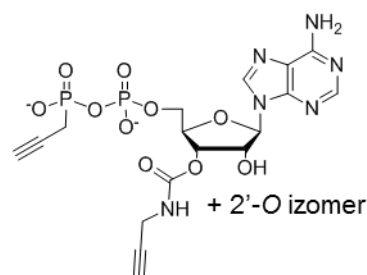
Nukleotyd **3b** (2 002 mODU, 0,133 mmol) oraz fosforan propargilu (sól TEA **1c**, 0,333 mmol) zawieszono razem w DMF (2,65 ml). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (50,7 mg, 0,534 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 27 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex z użyciem gradientu 0–1,0 M TEAB i wyizolowano jako sól



trietyloamoniową (1 660 mODU, 0,110 mmol, 83%). Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 28% do 72%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów wynosiły odpowiednio $t_R = 10,395$ min oraz $t_R = 11,475$ min (metoda D). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{17}H_{20}N_6O_{14}P_3^-$: 625.0256, otrzymano 625.0260. 2'-O-Izomer: 1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.47 (1H, s), 8.19 (1H, s), 6.26 (1H, d, $J = 4.7$ Hz), 5.46 (1H, dd, $J = 5.5, 4.7$ Hz), 4.72 (1H, przykryty pikiem od HDO), 4.54 (2H, m), 4.41 (1H, m), 4.31-4.23 (2H, m), 3.79 (2H, m), 2.77 (1H, m), 2.50 (1H, m), ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): -8.52 (2P, m), -20.06 (1P, m), 3'-O-Izomer: 1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.53 (1H, s), 8.22 (1H, s), 6.13 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 5.37 (1H, m), 4.97 (1H, dd, $J = 7.4, 4.7$ Hz), 4.54 (2H, m), 4.52 (1H, m), 4.31-4.23 (2H, m), 3.94 (2H, m), 2.77 (1H, m), 2.61 (1H, m), ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): -8.52 (2P, m), -20.06 (1P, m).

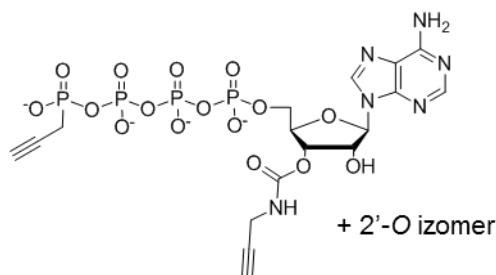
21.5.5. Nukleotyd **4d**

Nukleotyd **3a** (2 064 mODU, 0,137 mmol) oraz C-fosfonian propargilowy (sól TEA **1b**, 0,481 mmol) zawieszono razem w DMF (2,88 ml). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (52,2 mg, 0,550 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 29 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex z użyciem gradientu 0–0,8 M TEAB i wyizolowano jako sól trietyloamoniową (1 259 mODU, 0,084 mmol, 61%). Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 33% do 67%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów wynosiły odpowiednio $t_R = 8,069$ min oraz $t_R = 9,291$ min (metoda D). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{17}H_{19}N_6O_{10}P_2^-$: 529,0643, otrzymano 529,0636. 2'-O-Izomer: 1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.44 (1H, s), 8.18 (1H, s), 6.24 (1H, d, $J = 4.8$ Hz), 5.46 (1H, dd, $J = 6.7$ Hz, 4.8 Hz), 4.74 (1H, m, przykryty pikiem od HDO), 4.38 (1H, m), 4.26–4.15 (2H, m), 3.77 (2H, m), 2.67 (2H, dd, $J = 21.7, 3.02$ Hz), 2.48 (1H, m), 2.26 (1H, m). ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): -11.45 (1P, m), -8.50 (1P, m) 3'-O-izomer: 8.48 (1H, s), 8.20 (1H, s), 6.11 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.95 (1H, dd, $J = 7.3, 5.5$ Hz), 5.34 (1H, d, $J = 5.5$ Hz), 4.52 (1H, m), 4.26–4.15 (2H, m), 3.92 (2H, m), 2.67 (2H, dd, $J = 21.7, 3.02$ Hz), 2.60 (1H, m), 2.26 (1H, m). ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): -11.45 (1P, m), -8.50 (1P, m).



21.5.6. Nukleotyd **4e**

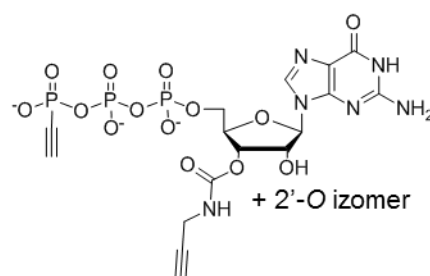
Nukleotyd **3c** (2 363 mODU, 0,183 mmol) oraz C-fosfonian propargilowy (sól TEA **1b**, 0,641 mmol) zawieszono razem w DMF (2,4 ml). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (69,9 mg, 0,733 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 24 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex z użyciem gradientu 0–1,2 M TEAB i wyizolowano jako sól trietyloamoniową (1 630 mODU, 0,126 mmol, 69%).



Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 37% do 63%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów wynosiły odpowiednio $t_R = 6.741$ min oraz $t_R = 6.999$ min (metoda D). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{17}H_{21}N_6O_{16}P_4^-$: 688,9970, otrzymano 688,9962. 2'-O-izomer: 1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.53 (1H, s), 8.23 (1H, s), 6.25 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 5.44 (1H, dd, $J = 5.4, 5.1$ Hz), 4.74 (1H, m, przykryty pikiem od HDO), 4.40 (1H, m), 4.30–4.18 (2H, m), 3.77 (2H, m), 2.75 (2H, ddd, $J = 21.8, 8.6, 2.9$ Hz), 2.48 (1H, m), 2.26 (1H, m). 3'-O-izomer: 1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.47 (1H, s), 8.20 (1H, s), 6.12 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 5.36 (1H, d, $J = 5.2$ Hz), 4.95 (1H, dd, $J = 7.5, 5.2$ Hz), 4.53 (1H, m), 4.30–4.18 (2H, m), 3.92 (2H, m), 2.75 (2H, ddd, $J = 21.8, 8.6, 2.9$ Hz), 2.59 (1H, m), 2.26 (1H, m). ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): 9.87 (1P, m), -10.59 (1P, m), -22.28 (2P, m)

21.5.7. Nukleotyd **4f**

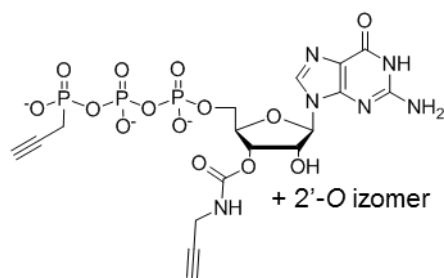
Nukleotyd **3d** (117 mODU, 0,010 mmol) oraz C-fosfonian etynylowy (sól TEA **1a**, 0,032 mmol) zawieszono razem w DMF (100 μ l). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (7,2 mg, 0,076 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 10 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu



DEAE Sephadex z użyciem gradientu 0–1,0 M TEAB i wyizolowano jako sól trietyloamoniową (56 mODU, 0,005 mmol, 48%). Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 37% do 63%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów wynosiły odpowiednio $t_R = 5.876$ min oraz $t_R = 6.022$ min (metoda B). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{16}H_{18}N_6O_{14}P_3^-$: 611.0099, otrzymano 611.0101. 2'-O-izomer: 1H NMR (D_2O , 400 MHz): 8.10 (1H, s), 6.05 (1H, d, $J = 4.7$ Hz), 5.53 (1H, t, $J = 5.6, 4.7$ Hz), 4.78 (m, przykryty przez sygnał od HDO), 4.57 – 4.53 (1H, m), 4.36 – 4.32 (1H, m), 4.32 – 4.18 (1H, m), 3.86 – 3.82 (2H, m), 3.18 (16H, q, $J = 7.3$ Hz, kation TEA), 3.14 (1H, d, $J = 12.9$ Hz), 2.55 (1H, t, $J = 2.5$ Hz), 1.25 (43H, t, $J = 7.3$ Hz, kation TEA), ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz): -10.71 – -11.14 (1P, m), -21.07 (1P, dd, $J = 20.0, 12.9$ Hz), -23.11 (1P, td, $J = 20.0, 8.1$ Hz), 3'-O-izomer: 1H NMR (D_2O , 400 MHz): 8.11 (1H, s), 5.92 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 5.36 (1H, d, $J = 3.9$ Hz), 5.06 – 5.00 (1H, m), 4.52 – 4.47 (1H, m), 4.32 – 4.18 (2H, m), 3.96 – 3.91 (2H, m), 3.18 (16H, q, $J = 7.3$ Hz kation TEA), 3.14 (1H, d, $J = 12.9$ Hz), 2.63 – 2.59 (1H, m), 1.25 (43H, t, $J = 7.3$ Hz, kation TEA), ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz): -10.80 – -10.99 (1P, m), -21.07 (1P, dd, $J = 20.0, 12.9$ Hz), -23.11 (1P, td, $J = 20.0, 8.1$ Hz).

21.5.8. Nukleotyd **4g**

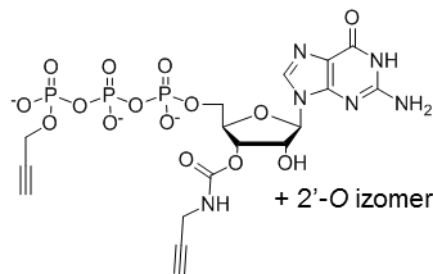
Nukleotyd **3d** (117 mODU, 0,010 mmol) oraz C-fosfonian propargilowy (sól TEA **1b**, 0,032 mmol) zawieszono razem w DMF (100 μ l). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (7,2 mg, 0,076 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 10 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu



DEAE Sephadex z użyciem gradientu 0–1,0 M TEAB i wyizolowano jako sól trietyloamoniową (56 mODU, 0,005 mmol, 48%). Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 42% do 58%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów były identyczne t_R = 6.047 min (metoda B). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^-$ = $C_{17}H_{20}N_6O_{14}P_3$: 625.0250, otrzymano 625.0260. 2'-O-Izomer: 1H NMR (500 MHz, D_2O) 8.05 (1H, s), 6.08 – 6.07 (1H, m), 5.56 (1H, m), 4.74 (m, przykryty pikiem od HDO), 4.49 – 4.43 (1H, m), 4.25 – 4.14 (2H, m), 3.82 (2H, s), 3.21 (28H, q, J = 7.3 Hz, kation TEA), 2.68 (2H, s), 2.52 (1H, d, J = 2.0 Hz, 1H), 2.28 – 2.24 (2H, m), 1.28 (43H, t, J = 7.3 Hz, kation TEA), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) 9.81 – 9.39 (1P, m), -10.72 (1P, m), -22.17 – -22.57 (1P, m); 3'-O-Izomer: 1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.12 (1H, s), 5.94 (1H, d, J = 5.8 Hz), 5.385 – 5.31 (1H, m), 4.98 (1H, s), 4.34 – 4.28 (1H, m), 4.25 – 4.14 (2H, m), 3.91 (2H, s), 3.21 (28H, q, J = 7.3 Hz, kation TEA), 2.72 (2H, s), 2.58 (1H, s), 2.28 – 2.24 (2H, m), 1.28 (43H, t, J = 7.3 Hz, kation TEA), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) 9.78 – 9.43 (1P, m), -10.59 – -10.86 (1P, m), -22.22 – -22.52 (1P, m).

21.5.9. Nukleotyd **4h**

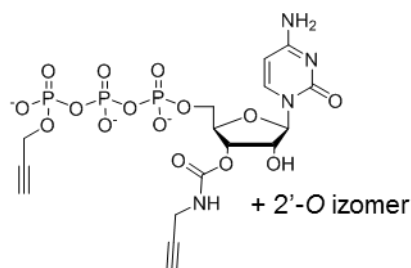
Nukleotyd **3d** (10 177 mODU, 0,842 mmol) oraz fosforan propargilu (sól TEA **1c**, 2,59 mmol) zawieszono razem w DMF (8.4 ml). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (650 mg, 6,84 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 80 ml wody. Produkt oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE



Sephadex z użyciem gradientu 0–1,0 M TEAB i wyizolowano jako sól trietyloamoniową (4 885 mODU, 0,404 mmol, 48%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^-$ = $C_{17}H_{20}N_6O_{15}P_3$: 641.0200, otrzymano 641.0210. 2'-O-izomer: 1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.04 (1H, s), 6.07 (1H, d, J = 4.3 Hz), 5.53 (1H, t, J = 5.2 Hz), 4.78 (1H, przykryty sygnałem od HDO), 4.58 - 4.54 (2H, dd, J = 9.1, 7.0 Hz), 4.46 (1H, s), 4.32 – 4.29 (1H, m), 4.25 – 4.10 (1H, m), 4.06 (1H, q, J = 7.0 Hz), 3.86 (2H, d, J = 4.5 Hz), 3.26 (6H, q, J = 7.3 Hz, kation TEA), 1.31 (1H, d, J = 6.9 Hz), 1.24 (6H, t, J = 7.2 Hz, kation TEA); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -11.41– -11.71 (2P, m), -23.10 (1P, t, J = 18.9 Hz); 3'-O-izomer: 1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.10 (1H, s), 5.93 (1H, t, J = 6.6 Hz), 5.36 (2H, d, J = 4.7 Hz), 5.03 – 5.01 (1H, m), 4.58 – 4.54 (2H, dd, J = 9.1, 7.0 Hz), 4.27 – 4.17 (3H, m), 4.10 (1H, q, J = 7.0 Hz), 3.91 (2H, s), 3.81 (d, J = 4.5 Hz, 3H), 3.26 (6H, q, J = 7.3 Hz, kation TEA), 1.32 (1H, d, J = 6.9 Hz), 1.24 (6H, t, J = 7.2 Hz, kation TEA); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -11.48– -11.63 (2P, m), -23.11 (1P, t, J = 18.9 Hz).

21.5.10. Nukleotyd 4i

Nukleotyd **3e** (1 234 mODU, 0,175 mmol) oraz fosforan propargilu (sól TEA **1c**, 0,698 mmol) zawieszono razem w DMF (3,0 ml). Reakcję zapoczątkowano dodając chlorek magnezu (133 mg, 1,40 mmol). Po godzinie reakcję zakończono poprzez dodanie 30 ml wody. Produkt oczyszczono na złożu DEAE Sephadex z użyciem gradientu 0–1,0 M TEAB i

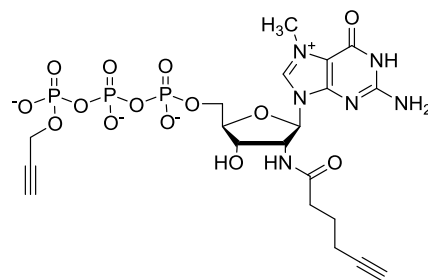


wyizolowano jako sól trietyloamoniową (852 mODU, 0,121 mmol, 69%). Stosunek izomerów 2'-O do 3'-O wynosił 46% do 54%, co stwierdzono z użyciem HPLC. Czasy retencji poszczególnych izomerów wynosiły odpowiednio $t_R = 5.217$ min oraz $t_R = 5.428$ min (metoda B). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{16}H_{20}N_4O_{15}P_3^-$: 601.0144, otrzymano 601.0139. 2'-O-Izomer: 1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.11 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 6.26 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 6.04 (1H, d, $J = 3.6$ Hz), 5.17 (1H, m), 4.55 (2H, dd, $J = 9.0$ Hz, 2.5 Hz), 4.53 (1H, m), 4.53 (1H, m), 4.16-4.21 (2H, m), 3.86 (2H, m), 3.16 (6H, q, $J = 7.4$ Hz, kation TEA), 2.84 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), 2.57 (1H, m), 1.23 (9H, t, $J = 7.4$ Hz, kation TEA) ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -10.72 (2P, m), -22.35 (1P, m); 3'-O-Izomer: 1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.10 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.03 (1H, d, $J = 6.4$ Hz), 5.21 (1H, dd, $J = 6.4$ Hz, 2.7 Hz), 4.55 (2H, dd, $J = 9.0$ Hz, 2.5 Hz), 4.45 (1H, m), 4.26 (1H, m), 4.16-4.21 (2H, m), 3.89 (2H, m), 3.16 (6H, q, $J = 7.4$ Hz, kation TEA), 2.84 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), 2.57 (1H, m), 1.23 (9H, t, $J = 7.4$ Hz, kation TEA); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): -10.72 (2P, dt, $J = 19.1, 5.0$ Hz), -22.35 (1P, t, $J = 19.1$ Hz).

21.6. Nukleotydy z dwiema grupami alkinowymi będące analogami m^7GTP . 4s

21.6.1. Nukleotyd 4s

Zgodnie z procedurą ogólną **Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.** nukleotyd **4r** (441 mODU, 34 μ mol) został rozpuszczony w DMSO (345 μ l), a następnie do roztworu dodano jodek metylu (17 μ l, 0,28 mmol). Reakcję zakończono po 5 godzinach z użyciem 1,5 ml wody, zobojętniono, i trzykrotnie

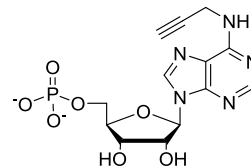


przemyto eterem dietylowym (3 x 5 ml). Produkt rozpuszczony w fazie wodnej został oczyszczony z użyciem HPLC. Produkt uzyskano w postaci soli amoniowej (141 mODU, 10.9 μ mol, 32%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{20}H_{26}N_6O_{14}P_3^-$: 667.0725, otrzymano 667.0733. 1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.04 (1H, s), 6.08 (1H, d, $J = 7.1$ Hz), 4.78 (1H, dd, $J = 7.1, 5.6$ Hz), 4.54 (1H, dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz), 4.53 (1H, m), 4.38 (1H, m), 4.23 (2H, m), 4.10 (3H, s), 2.78 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), 2.35 (2H, m), 2.21 (2H, t, $J = 2.7$ Hz), 2.10 (2H, m), 1.67 (2H, m). ^{31}P NMR (160 MHz, D_2O): -22.40 (2P, m), -10.79 (1P, t, $J = 19.7$ Hz).

21.7. Ścieżka syntetyczna nukleotydu **4p**.

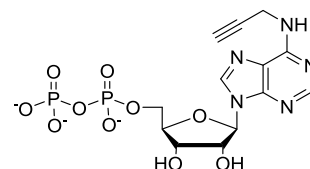
21.7.1. Monofosforan 6-(*N*-propargilo)-adenozyny (6^{pr}AMP)

6-(*N*-propargilo)adenozyna²⁰⁹ (1 g, 65 416 mODU, 3,28 mmol) została zawieszona w fosforanie trimetylu (15 ml), a mieszaninę schłodzono do 0 °C. Do schłodzonej mieszaniny dodano POCl₃ (4,92 mmol), a następnie reakcja była mieszana w temperaturze 0 °C przez 2 godziny. Po tym czasie reakcja została rozcieńczona wodą (150 ml), zobojętniona z użyciem stałego NaHCO₃, i oczyszczona techniką chromatografii jonowymiennej DEAE Sephadex (gradient 0 – 0,1 M TEAB). Produkt uzyskano w postaci soli TEA (1,33 mmol, 26 534 mODU, 41%). HRMS (-) ESI *m/z* obliczono dla [M-H]⁻ = C₁₃H₁₅N₅O₇P⁻: 384.0715, otrzymano 384.0714. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8.21 (1H, s), 8.38 (1H, s), 6.05 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 4.67 (1H, dd, *J* = 5.7, 5.2 Hz), 4.43 (1H, dd, *J* = 5.2, 3.7 Hz), 4.32 (1H, m), 4.27 (2H, d, *J* = 2.5 Hz), 4.07 (2H, m), 3.13 (8H, q, *J* = 7.3 Hz, kation TEA), 2.57 (1H, t, *J* = 2.5 Hz), 1.21 (12H, t, *J* = 7.3 Hz, kation TEA), ³¹P NMR (202 MHz, D₂O): 0.17 (1P, m).



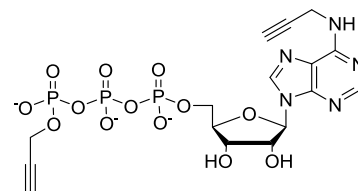
21.7.2. Difosforan 6-(*N*-propargilo)-adenozyny (6^{pr}ADP)

6^{pr}AMP (sól TEA, 24 840 mODU, 1,245 mmol) został zawieszony w DMF (18,4 ml) razem z *P*-imidazolidem 2-cyanoetylofosforanu¹⁷⁴ (sól Li⁺, 773 mg, 3,73 mmol). Do zawiesiny po 5 minutach mieszania dodano chlorek magnezu (591 mg, 6,22 mmol). Mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 12 godzin, po tym czasie stwierdzono 100% konwersję substratu (HPLC). Do mieszaniny dodano 18,4 ml DMF, 4,35 ml DBU oraz DTT (575 mg, 3,74 mmol). Uzyskaną mieszaninę podgrzano z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego (*P*_{max} = 5 W, *t* = 20 min, temp. = 40 °C). Po schłodzeniu do temperatury pokojowej, do mieszaniny dodano 200 ml 1% kwasu octowego, przemyto ją octanem etylu (2 x 300 ml), po czym produkt wyizolowano z techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex (gradient 0 – 1,0 M TEAB) w postaci soli trietyloamoniowej (0,59 mmol, 11 700 mODU, 47%). HRMS (-) ESI *m/z* obliczono dla [M-H]⁻ = C₁₃H₁₆N₅O₁₀P₂⁻: 464.0378, otrzymano 464.0375. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8.54 (1H, s), 8.34 (1H, s), 6.12 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 4.72 (1H, dd, *J* = 5.7, 5.5 Hz), 4.50 (1H, dd, *J* = 5.5, 3.1 Hz), 4.39 (2H, d, *J* = 2.5), 4.35 (1H, dt, *J* = 3.1, 3.0 Hz), 4.18 (2H, dd, *J* = 5.2, 3.0 Hz), 3.14 (13 H, q, *J* = 7.3 Hz, kation TEA), 2.63 (1H, t, *J* = 2.5 Hz), 1.22 (20 H, t, *J* = 7.3 Hz, kation TEA), ³¹P NMR (202 MHz, D₂O): -10.90 (1P, m), -10.41 (1P, m).



21.7.3. γ-(*O*-propargilo)-trifosforan 6-(*N*-propargilo)-adenozyny (**4p**)

6^{pr}ADP (sól TEA, 0,117 mmol, 2340 mODU) został rozpuszczony w DMF (2,45 ml) razem z *P*-imidazolidem fosforanu propargilu (78,8 mg, 0,410 mmol). Do zawiesiny po 5 minutach mieszania dodano chlorek magnezu (55,7 mg, 0,586 mmol). Mieszanina reakcyjna była mieszana w

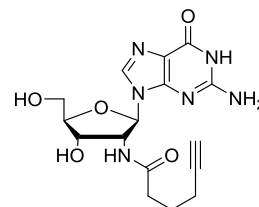


temperaturze pokojowej przez 3 dni, po tym czasie stwierdzono 100% konwersję substratu (HPLC). Reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie mieszaniny 25 ml wody. Produkt wyizolowano techniką chromatografii jonowymiennej DEAE Sephadex (gradient 0 – 1,0 M TEAB) w postaci soli trietyloamoniowej (0,967 mmol, 1 942 mODU, 83%). Produkt dodatkowo oczyszczono w układzie RP HPLC. HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{16}H_{19}N_5O_{13}P_3^-$: 582,0198, otrzymano: 582.0197. 1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.46 (1H, s), 8.27 (1H, s), 6.10 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.73 (1H, dd, $J = 6.0$, 5.0 Hz), 4.51 (1H, dd, $J = 5.0$, 3.5 Hz), 4.50 (2H, dd, $J = 9.3$, 2.5 Hz), 4.35 (1H, dd, $J = 3.5$, 2.8 Hz), 4.31 (2H, d, $J = 2.4$ Hz), 4.20 (2H, m), 2.72 (1H, t, $J = 2.5$ Hz), 2.56 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), ^{31}P NMR (160 MHz, D_2O): -10.73 (2P, m), -22.39 (1P, t, $J = 19.4$ Hz).

21.8. Ścieżka syntetyczna nukleotydu 4s.

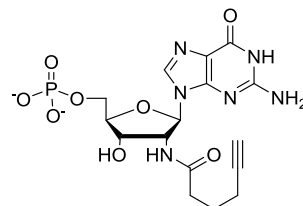
21.8.1. 2'-N-(heks-5-yn)-aminoguanozyna (2N(hex)Guo)

Kwas 5-heksynowy (371 μ l, 3,38 mmol) został rozpuszczony w DMSO (5,7 ml), a do uzyskanego roztworu dodano trietyloaminę (651 μ l, 4,64 mmol). Roztwór mieszano przez 5 minut, po czym dodano do niego TSTU (1 026 mg, 3,41 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, następnie do roztworu dodano 2'-amino, 2'-deoksyguanozynę (666 mg, 2,36 mmol) i mieszano go w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po tym czasie mieszanina została powoli wkroplona do octanu etylu (200 ml). Wytrącony osad zebrano, trzykrotnie przemyto octanem etylu i zwirowano. Po wysuszeniu osadu otrzymano produkt w postaci brązowego proszku (791 mg, 2,1 mmol, 89%). 1H NMR (500 MHz, DMSO): 10.63 (1H, s), 7.90 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.82 (1H, s), 6.40 (2H, s), 5.72 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 5.64 (1H, d, $J = 4.3$ Hz), 5.11 (1H, dd, $J = 5.9$, 5.2 Hz), 4.91 (1H, td, $J = 8.7$, 5.3 Hz), 4.16 (1H, ddd, $J = 5.3$, 4.3, 1.7 Hz), 3.92 (1H, t, $J = 4.3$, 1.7 Hz), 3.62–3.49 (2H, m), 2.72 (1H, t, $J = 2.6$ Hz), 2.17 (2H, m), 2.04 (2H, dt, $J = 7.3$, 2.6 Hz), 1.57 (2H, dtt, $J = 15.0$, 8.0, 7.3 Hz)



21.8.2. Monofosforan 2'-N-(heks-5-yn)-aminoguanozyny (2N(hex)GMP)

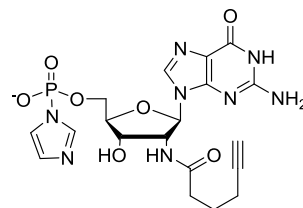
Nukleozyd 2N(hex)Guo (2,08 mmol, 25 094 mODU, 779 mg) został zawieszony w fosforanie trimetylu (11,69 ml), a mieszaninę schłodzono do temperatury 0 °C. Następnie dodano do niej chlorek fosforylu (270 μ l, 2,91 mmol). Uzyskany roztwór mieszano w temperaturze 0 °C przez 12 h, a następnie reakcję zakończono przez dodanie 110 ml wody, zneutralizowano 10% roztworem NaOH i oczyszczono techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex (gradient 0 – 0,7 M TEAB). Produkt



uzyskano w postaci soli trietyloamoniowej (1,27 mmol, 15 372 mODU, 62%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{16}H_{20}N_6O_8P^-$: 455.1086, otrzymano 455.1084. 1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.27 (1H, s), 5.95 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.91 (1H, dd, $J = 8.5, 5.4$ Hz), 4.46 (1H, dd, $J = 5.4, 1.3$ Hz), 4.38 (1H, m), 4.10 (2H, dd, $J = 5.1, 3.3$ Hz), 3.14 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, kation TEA) 2.30 (2H, m), 2.20 (1H, t, $J = 2.7$ Hz), 1.94 (2H, m), 1.61 (2H, m), 1.22 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, kation TEA); ^{31}P NMR (160 MHz, D_2O): 1.14 (1P, t, $J = 5.1$ Hz).

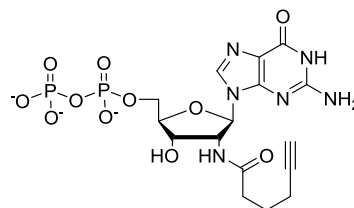
21.8.3. *P*-imidazolid monofosforanu 2'*N*-(heks-5-yn)-aminoguanozyny (2N(hex)GMP-Im)

Nukleotyd 2N(hex)GMP (sól TEA, 5 073 mODU, 0,41 mmol) został zawieszony w DMF (4,1 ml) razem z 2,2'-DTDP (277 mg, 1,25 mmol) oraz imidazolem (286 mg, 4,2 mmol). Następnie do zawiesiny dodano trietyloaminę (117 μ l, 0,84 mmol) oraz trifenylofosfinę (330 mg, 1,26 mmol). Reakcję mieszano przez 12 h, a po tym czasie produkt wytrącono roztworem nadchloranu litu (617 mg) w acetonie (50 ml). Produkt został trzykrotnie zwirowany i przemyty świeżymi porcjami acetonu, aż osad utracił żółty kolor. Po wysuszeniu uzyskano produkt w postaci soli litowej (0,33 mmol, 3 986 mODU, 79%). MS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{19}H_{22}N_8O_7P^-$: 505.1, otrzymano: 505.0.



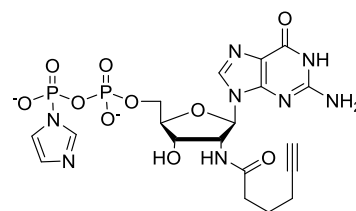
21.8.4. Difosforan 2'*N*-(heks-5-yn)-aminoguanozyny (2N(hex)GDP)

Fosforan trietyloamoniowy (301 mg, 1,51 mmol) został rozpuszczony w DMF (3,2 ml), do otrzymanego roztworu dodano trietyloaminę (210 μ l, 1,51 mmol). Roztwór mieszano przez 5 minut, po czym dodano do niego chlorek cynku (2,42 mmol, 329 mg). Po paru minutach do reakcji dodano 2N(hex)GMP-Im (161 mg, 0,3 mmol, 3 655 mODU). Uzyskany roztwór mieszano przez 12 godzin, a po tym czasie reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie 30 ml wodnego roztworu EDTA (900 mg, 2,42 mmol) oraz $NaHCO_3$ (450 mg). Produkt wyizolowano techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex (gradient 0 – 1,0 M) jako sól trietyloamoniową (0,23 mmol, 2 778 mODU, 77%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{16}H_{21}N_6O_{11}P_2^-$: 535.0749, otrzymano 535.0750. 1H NMR (500 MHz, D_2O): 8.14 (1H, s), 5.96 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 5.02 (1H, dd, $J = 8.5, 5.6$ Hz), 4.56 (1H, dd, $J = 5.6, 1.7$ Hz), 4.43 (1H, m), 4.24 (2H, m), 2.98 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 2.35 (2H, ddt, $J = 15.0, 9.0, 7.7$ Hz), 1.67 (2H, m), 0.99 (2H, m), ^{31}P NMR (160 MHz, D_2O): -9.88 (1P, d, $J = 19.8$ Hz), -10.41 (1P, dt, $J = 19.8, 6.3$ Hz).



21.8.5. *P*-imidazolid difosforanu 2'*N*-(heks-5-yn)-aminoguanozyny (2N(hex)GDP-Im)

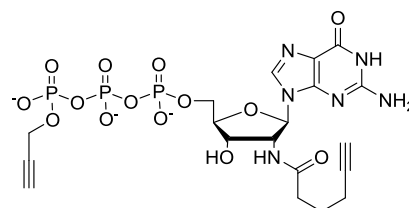
Nukleotyd 2N(hex)GDP (sól TEA, 2 778 mODU, 0,23 mmol) został zawieszony w DMF (2,3 ml) razem z 2,2'-DTDP (152 mg, 0,69 mmol) oraz imidazolem (157 mg, 2,31 mmol). Następnie do zawiesiny dodano trietyloaminę (117 μ l, 0,84 mmol) oraz trifenylofosfinę (181 mg, 0,69 mmol).



Reakcję mieszano przez 12 h, a po tym czasie produkt wytrącono roztworem nadchloranu litu (339 mg) w acetonie (27 ml). Produkt został trzykrotnie zwirowany i przemyty świeżymi porcjami acetonu, aż osad utracił żółty kolor. Po wysuszeniu uzyskano produkt w postaci soli litowej (0,18 mmol, 2 174 mODU, 78%). MS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^-$ = C₁₉H₂₃N₈O₁₀P₂⁻: 585.1, otrzymano 585.3.

21.8.6. γ -(O-propargilo) trifosforan 2'*N*-(heks-5-yn)-aminoguanozyny (**4r**)

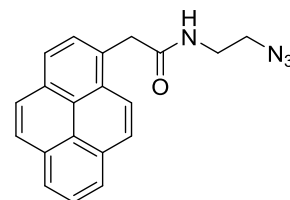
Nukleotyd 2N(hex)GDP-Im (167 μ mol, 2017 mODU), został rozpuszczony w DMF (2,14 ml) razem z fosforanem propargilu (**1c**, 159 mg, 0,668 mmol). Po 5 minutach mieszania do roztworu dodano chlorek magnezu (127 mg, 1,34 mmol). Mieszanina reakcyjna była mieszana przez 12 h w temperaturze pokojowej,



po czym rozcieńczono ją z użyciem 20 ml wody. Produkt wyizolowano techniką chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex (gradient 0 – 1,0 M) jako sól trietyloamoniową (0,129 mmol, 1 558 mODU, 77%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^-$ = C₁₉H₂₄N₆O₁₄P₃⁻: 653.0569, otrzymano 653.0572. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): 8.04 (1H, s), 5.88 (1H, d, J = 8.4 Hz), 5.00 (1H, dd, J = 8.4, 5.6 Hz), 4.54 (2H, dd, J = 9.3, 2.4 Hz), 4.52 (1H, m), 4.38 (1H, m), 4.23 (2H, m), 3.14 (3H, J = 7.3 Hz, TEA), 2.78 (1H, t, J = 2.4 Hz), 2.29 (2H, m), 2.21 (1H, t, J = 2.7 Hz), 1.95 (2H, m), 1.87 (2H, m), 1.61 (2H, m), 1.22 (6H, J = 7.3 Hz, TEA); ³¹P NMR (160 MHz, D₂O): -10.79 (2P, m), -22.47 (1P, t, J = 19.6 Hz).

21.9. Synteza barwnika **5c**

Kwas 1-pirenooctowy (150 mg, 0,58 mmol) rozpuszczono w DMSO (2,1 ml) razem z trietyloaminą (324 μ l, 2,3 mmol). Otrzymany roztwór mieszano przez 5 minut, a następnie dodano do niego TSTU (2,31 mmol, 695 mg). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 10 minut, następnie do reakcji



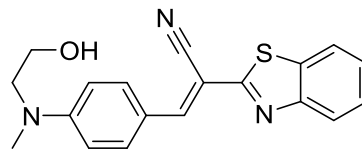
dodano 2-azydo-1-aminoetan (396 mg, 4,62 mmol). Otrzymany roztwór mieszano przez 1 h, a następnie rozcieńczono 40 ml wody. Powstały osad trzykrotnie przemyto wodą i odwirowano. Produkt został wysuszony pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie oczyszczony techniką chromatografii kolumnowej (gradient 0 – 10% MeCN/DCM). Produkt uzyskano w postaci proszku (127 mg, 0,39 mmol, 67%). ¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) 8.29–8.13 (5H, m), 8.12–7.99 (3H, m), 7.91 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.31 (2H, s), 3.28 (4H, m), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C) 171.33, 131.26,

131.18, 130.76, 129.55, 128.55, 128.53, 127.86, 127.71, 127.28, 126.29, 125.60, 125.50, 125.19, 125.16, 124.61, 122.73, 50.56, 41.93, 39.09.

21.10. Synteza barwnika cyjanowinylowego **5d**

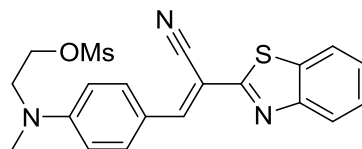
21.10.1. Barwnik cyjanowinylowy zawierający grupę hydroksylową (Cv-OH)

W 96% etanolu (12,8 ml) rozpuszczono 4-(*N*-metylo,*N*-etoksyamino)benzaldehyd (102 mg, 0,57 mmol) oraz 2-benzotiazoacetonitryl (103 mg, 0,59 mmol). Do otrzymanego roztworu dodano piperydynę (570 μ l, 5,74 mmol), a uzyskany roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 8 godzin. Po tym czasie powstały osad został zwirowany i przemyty zimnym etanolem. Po wysuszeniu otrzymano produkt (134 mg, 0,4 mmol, 70%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO): 8.27 (s, 1H), 8.08 (m, 1H), 7.97 (m, 3H), 7.51 (1H, ddd, $J = 8.5, 7.2, 1.2$ Hz), 7.42 (1H, ddd, $J = 8.5, 7.2, 1.2$ Hz), 6.86 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 4.76 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.57 (4H, m), 3.07 (3H, s), ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): 165.2, 153.7, 153.0, 148.1, 134.3, 133.4, 127.3, 125.8, 122.8, 122.6, 119.5, 118.4, 112.2, 96.3, 58.7, 54.3, 40.6, 40.3, 39.3, $R_f = 0.44$ w 0.5% MeOH/DCM



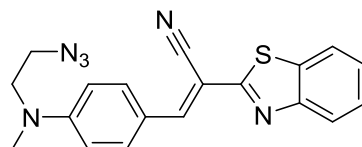
21.10.2. Barwnik cyjanowinylowy zawierający grupę metanosulfonową Cv-OMs.

Roztwór barwnika Cv-OH (0,2 g, 0,6 mmol) w bezwodnym DCM (6 ml) został schłodzony do 0 °C, a następnie do mieszaniny dodano DIPEA (1,56 ml, 8,96 mmol). Następnie rozpoczęto powolne wkraplanie roztworu chlorku mesylu (0,7 mmol, 8,96 ml) w DCM (1 ml). Postęp reakcji monitorowano z użyciem TLC (1% MeOH/DCM), po stwierdzeniu 100% konwersji substratu (~45 min) reakcję zakończono dodając 10 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7. Produkt został wyekstrahowany DCM (4 x 10 ml). Połączone frakcje organiczne wysuszono z użyciem bezwodnego siarczanu (VI) magnezu. Rozpuszczalnik został usunięty pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt po wysuszeniu uzyskano w formie ciemnoczerwonego osadu (0,24 g, 0,59 mmol, 98%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO): 8.07 (1H, s), 8.01 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.92 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.88 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.43 (1H, dd, $J = 7.8, 7.4$ Hz), 7.34 (1H, dd, $J = 7.8, 7.4$ Hz), 6.84 (2H, d, $J = 9.0$), 4.27 (2H, t, $J = 5.3$ Hz), 3.75 (2H, t, $J = 5.3$ Hz), 3.04 (3H, s), 3.00 (3H, s), $R_f = 0.22$ w 0.5% MeOH w DCM



21.10.3. Barwnik cyjanowinylowy zawierający azydek (**5d**)

Do roztworu barwnika Cv-OMs (200 g, 0,5 mmol) w DMF (6 ml) został dodany azydek sodu (157 mg, 2,4 mmol). Zawiesina została podgrzana do temperatury 60



°C i w tej temperaturze mieszana przez 6 godzin. Postęp reakcji sprawdzano z użyciem TLC (0,5% MeOH w DCM). Po stwierdzeniu 100% konwersji substratu, reakcję rozcieńczono wodą (90 ml), a produkt wyekstrahowano octanem etylu (3 x 90 ml). Połączone frakcje organiczne wysuszono z użyciem siarczanu (VI) magnezu, a rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt doczyszczono techniką chromatografii kolumnowej stosując elucję gradientową (50% – 100% heksan/DCM). Barwnik **5d** uzyskano w formie pomarańczowego proszku (110 mg, 0,306 mmol, 63%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO): 8.18 (1H, s), 8.14 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 8.05 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.02 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.56 (1H, dd, *J* = 8.2, 7.0 Hz), 7.47 (1H, dd, *J* = 8.2, 7.0 Hz), 6.97 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 3.74 (2H, t, *J* = 5.7 Hz), 3.59 (2H, t, *J* = 5.7 Hz), 3.12 (3H, s), ¹³C NMR (101 MHz, DMSO): 164.5, 153.1, 152.0, 147.6, 133.9, 132.9, 126.8, 125.4, 122.4, 122.2, 119.8, 117.7, 111.9, 96.8, 50.3, 48.3, *R*_f = 0.41 w 0.5% MeOH w DCM.

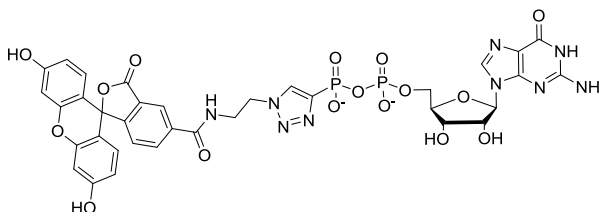
21.11. Synteza nukleotydów znakowanych w terminalnej pozycji łańcucha oligofosforanowego **6a-k**

21.11.1. Związek **6a**

Wodny roztwór nukleotydu **2g** (24,8 μmol, 300 mODU, 15 μl, 1,65 M) oraz roztwór

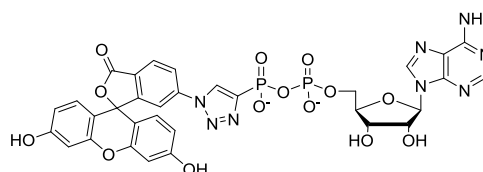
5-(*N*-azydoetylo)-amidofluoresceiny w mieszaninie *t*-BuOH/H₂O (2/1, v/v) (11,0 mg, 24,8 μmol, 30 μl, 0,83 M) zmieszano razem,

po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (5 μl, 5 μmol, 1.0 M) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (5 μl, 9,93 μmol, 1.97 M). Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 400 μl mieszaniną *t*-BuOH/H₂O (2/1, v/v) mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (1,7 mg, 4,97 μmol, 1 ml). Produkt oczyszczono techniką HPLC RP, a po 3-krotnej liofilizacji uzyskano 12,7 mg (12,8 mg, 13,9 μmol, 56%) produktu. HRMS (-) ESI *m/z* obliczono dla [M-H]⁻ = C₃₅H₃₀N₉O₁₆P₂⁻: 894.1291, otrzymano 894.1307.



21.11.2. Związek **6b**

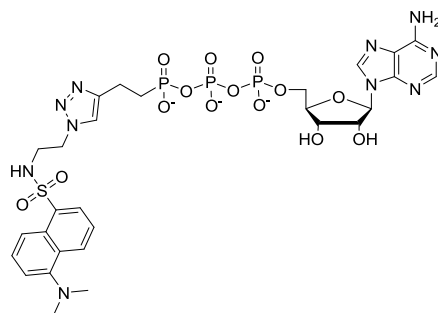
Wodny roztwór nukleotydu **2a** (10,0 μmol, 34 mODU, 20 μl, 500 mM) oraz roztwór 5-azydofluoresceiny w DMSO (1,29 mg, 3,4 μmol, 3,4 μl, 1 M) zmieszano razem, po czym dodano



do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (4,6 μmol , 0,46 μl , 1,0 M) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (0,92 μmol , 0,92 μl , 1,0 M). Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 60 μl DMSO, mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (1,5 mg, 4,60 μmol , 1 ml). Wydajność HPLC wyniosła 100% (produktu nie izolowano). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_{19}\text{P}_3^-$: 807.0971, otrzymano 807.0965.

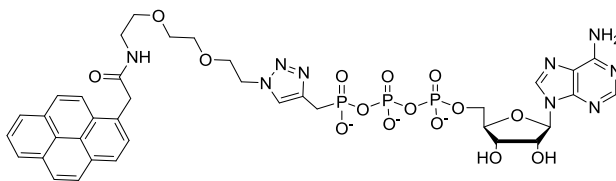
21.11.3. Związek 6c

Wodny roztwór nukleotydu **2m** (10,0 μmol , 150 mODU, 20 μl , 500 mM) oraz roztwór S-(N-azydoetylo)dansylu w *t*-BuOH (3,9 mg, 10,0 μmol , 40 μl , 250 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (0,50 μmol , 5 μl , 100 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (1,0 μmol , 5 μl , 200 mM). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (0,2 mg, 0,51 μmol , 1 ml). Wydajność HPLC wyniosła 100% (produktu nie izolowano). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_3\text{S}^-$: 861.1351, otrzymano 861.1364.



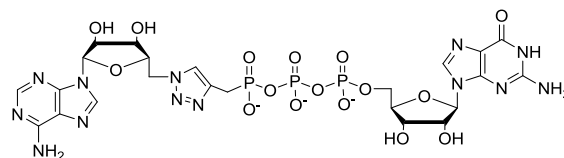
21.11.4. Związek 6d

Wodny roztwór nukleotydu **2f** (2,3 μmol , 35 mODU, 10 μl , 230 mM) oraz roztwór **5b** w DMSO (3,6 μmol , 30 μl , 120 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (0,7 μmol , 5 μl , 140 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (1,4 μmol , 5 μl , 280 mM). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1 godzinę, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (0,2 mg, 0,7 μmol , 0,5 ml). Produkt oczyszczono za pomocą HPLC RP, a po 3-krotnej liofilizacji uzyskano produkt (2,3 μmol , >99%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{P}_3^-$: 944.1940, otrzymano 944.1948.



21.11.5. Związek 6e

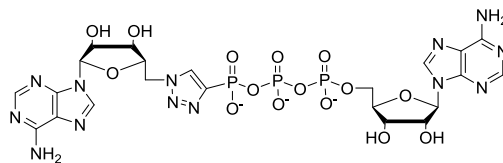
Wodny roztwór nukleotydu **2i** (24,8 μmol , 300 mODU, 18 μl , 1,38 mM) oraz roztwór 5'-azydo-5'-deoksyadenozyny w DMF (7,2 mg, 24,8 μmol , 40 μl , 620 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1,2 mg, 4,97 μmol , 5 μl , 990 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (1,96 mg, 10,0 μmol , 5 μl , 2 M). Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 300 μl roztworu DMF/ H_2O (2/1, v/v) mieszano przez 1 godzinę, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (16,7 mg, 4,97 μmol , 0,6 ml). Produkt oczyszczono za pomocą HPLC RP, a po 3-krotnej



liofilizacji uzyskano produkt (23,1 μmol , 346 mODU, 22,8 mg, 93%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_{13}\text{O}_{16}\text{P}_3^-$: 836.1074, otrzymano 836.1089.

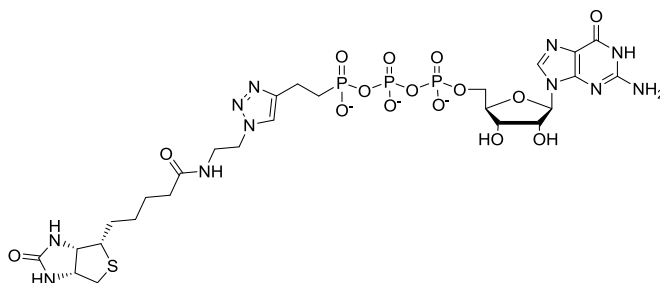
21.11.6. Związek 6f

Wodny roztwór nukleotydu **2d** (3,53 μmol , 53 mODU, 20 μl , 177 mM) oraz roztwór 5'-azydo-5'-deoksyadenozyny w DMF (1,6 mg, 5,3 μmol , 30 μl , 176 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (0,35 μmol , 5,0 μl , 70 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (0,71 μmol , 5 μl , 0,14 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (0,13 mg, 0,352 μmol , 0,6 ml). Wydajność HPLC wyniosła 100% (produktu nie izolowano). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_{13}\text{O}_{15}\text{P}_3^-$: 806.0968, otrzymano 806.0977.



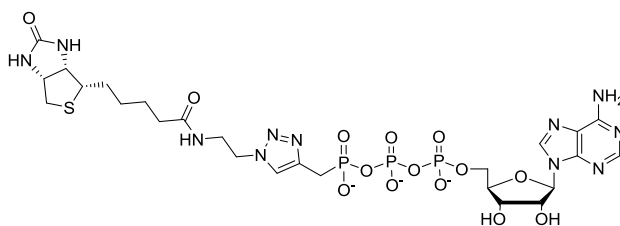
21.11.7. Związek 6g

Wodny roztwór nukleotydu **2n** (24,8 μmol , 300 mODU, 15 μl , 1,65 M) oraz roztwór *N*-(2-azydoetylo)-amidu biotyny w *t*-BuOH/H₂O (3/2, v/v) (7,7 mg, 24,8 μmol , 60 μl , 410 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1,2 mg, 4,97 μmol , 5 μl , 990 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (1,96 mg, 9,95 μmol , 5 μl , 1,99 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (1,4 mg, 4,97 μmol , 0,6 ml). Wydajność HPLC wyniosła 100% (produktu nie izolowano). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}^-$: 870.1566, otrzymano 870.1578.



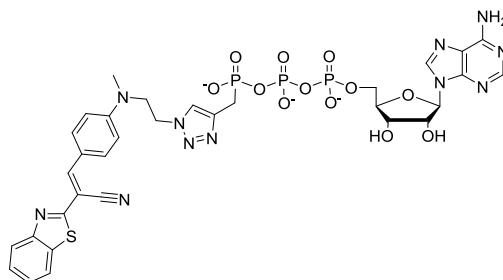
21.11.8. Związek 6h

Wodny roztwór nukleotydu **2f** (18,0 μmol , 270 mODU, 10 μl , 1,8 M) oraz roztwór *N*-(2-azydoetylo)-amidu biotyny w *t*-BuOH/H₂O (3/2, v/v) (8,3 mg, 27 μmol , 60 μl , 450 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (0,89 mg, 3,6 μmol , 5 μl , 720 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (1,4 mg, 7,2 μmol , 5,0 μl , 1,42 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono wodnym roztworem EDTA (1,3 mg, 3,6 μmol , 0,6 ml). Wydajność HPLC wyniosła 100% (produktu nie izolowano). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_{14}\text{P}_3\text{S}^-$: 840.1461, otrzymano 840.1472.



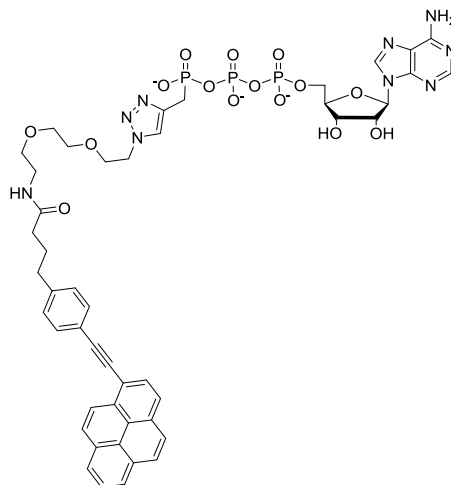
21.11.9. Związek 6i

Wodny roztwór nukleotydu **2f** (42,0 μmol , 630 mODU, 50 μl , 1,04 M) oraz roztwór barwnika **5d** w DMSO (63 μmol , 470 μl , 134 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (8,4 μmol , 15 μl , 560 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (16,8 μmol , 30 μl , 0,56 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1 godzinę, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda B), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (554 mODU, 37 μmol , 88%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{P}_3\text{S}^-$: 888.1249, otrzymano 888.1263.



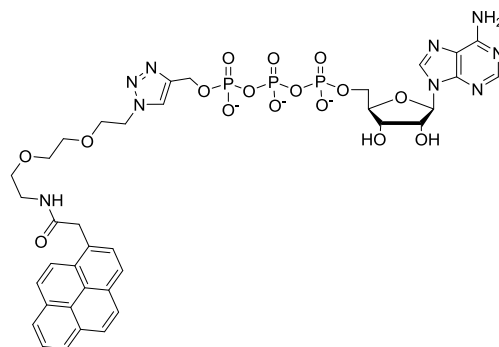
21.11.10. Związek 6j

Wodny roztwór nukleotydu **2f** (5,48 μmol , 82 mODU, 16 μl , 219 mM) oraz roztwór barwnika **5e** w DMSO (11 μmol , 275 μl , 40 mM) mieszało się razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (2,7 μmol , 2,5 μl , 1,1 M) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (5,5 μmol , 10 μl , 0,55 M). Mieszaninę reakcyjną mieszało się przez 1 godzinę, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (66 mODU, 4,38 μmol , 80%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{P}_3^-$: 1072.2566, otrzymano 1072.2587.



21.11.11. Związek 6k

Wodny roztwór nukleotydu **2o** (2,0 μmol , 30 mODU, 11,4 μl , 175 mM) oraz roztwór barwnika **5b** w DMSO (3,0 μmol , 16,0 μl , 188 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1,0 μmol , 2,3 μl , 435 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (20 μmol , 8 μl , 2,5 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1 godzinę, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (17 mODU, 1,12 μmol , 56%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^- = \text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{P}_3$: 960.1884, otrzymano 960.1899.

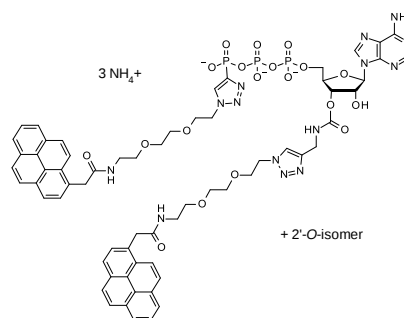


21.12. Synteza sond ekscymerowych **7a-t**

Do obliczenia wydajności otrzymanych związków wykorzystano pomiar jednostek optycznych. Współczynniki ekstynkcji sond zawierających dwa barwniki obliczono ze wzoru $2\epsilon \times 90\%$. Dla pirenu współczynnik ekstynkcji ϵ przyjęto jako $21\,000\text{ (cm} \times \text{M)}^{-1}$ (przy 335 nm), dla PEP współczynnik ekstynkcji ϵ przyjęto jako $45\,000\text{ (cm} \times \text{M)}^{-1}$ (przy 364 nm), dla barwnika cyjanowinylenowego współczynnik ekstynkcji ϵ przyjęto jako $77\,625\text{ (cm} \times \text{M)}^{-1}$ (przy 444 nm).

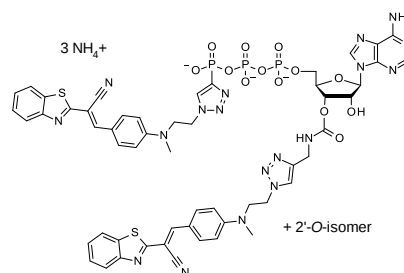
21.12.1. Sonda **7a**

Wodny roztwór nukleotydu **4a** (2,9 μmol , 44 mODU_(260nm), 10,0 μl , 290 mM) oraz roztwór barwnika **5b** w DMSO (8,8 μmol , 50 μl , 176 mM) mieszało się razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1,5 μmol , 5,0 μl , 300 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (15 μmol , 10 μl , 1,5 M). Mieszaninę reakcyjną mieszało się przez 1 godzinę, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO₃ (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (84 mODU_(335 nm), 2,23 μmol , 77%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^-$ = C₆₄H₆₆N₁₄O₁₉P₃⁻: 1427.3847, otrzymano 1427.3864.



21.12.2. Sonda **7b**

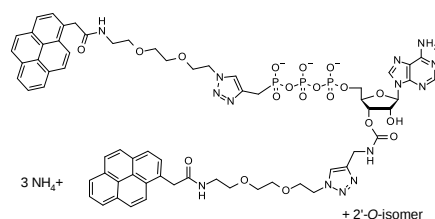
Wodny roztwór nukleotydu **4a** (4,6 μmol , 69 mODU_(260nm), 20,0 μl , 230 mM) oraz roztwór barwnika **5d** w DMSO (13,8 μmol , 130 μl , 106 mM) mieszało się razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (2,3 μmol , 5,0 μl , 460 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (23,3 μmol , 12 μl , 1,94 M). Mieszaninę reakcyjną mieszało się przez 1 godzinę, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO₃ (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (405 mODU_(444 nm), 2,9 μmol , 63%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M-H}]^-$ = C₅₄H₅₀N₁₈O₁₃P₃S₂⁻: 1315.2465, otrzymano 1315.2483.



21.12.3. Sonda **7c**

Wodny roztwór nukleotydu **4b** (6,9 μmol , 30,0 μl , 230 mM) oraz roztwór barwnika **5b** w DMSO (20,7 μmol , 200 μl , 103 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (3,5 μmol , 5,0 μl , 690 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (34,5 μmol , 20 μl , 1,73 M).

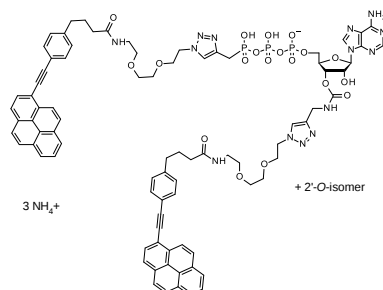
Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (190 mODU_(335 nm), 5,0 μmol , 73%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{65}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{P}_3^-$: 1441.4004, otrzymano 1441.4009.



21.12.4. Sonda **7d**

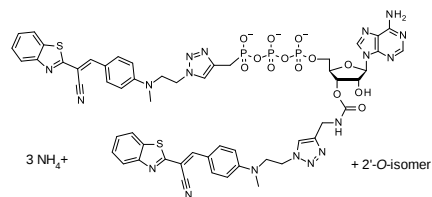
Wodny roztwór nukleotydu **4b** (7,6 μmol , 20,0 μl , 380 mM) oraz roztwór barwnika **5e** w DMSO (38 μmol , 550 μl , 69 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich zmieszane ze sobą wodne roztwory siarczanu (VI) miedzi (II) (3,5 μmol , 12,5 μl , 690 mM,) i THPTA (15,1 μmol , 15 μl , 1,0 M,). Reakcję zapoczątkowano poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (151 μmol , 50 μl , 3 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez

4 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml) i rozcieńczono z użyciem 2 ml DMSO. Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (560_(364 nm), 6,9 μmol , 91%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{85}\text{H}_{84}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{P}_3^-$: 1697.5256, otrzymano 1697.5287.



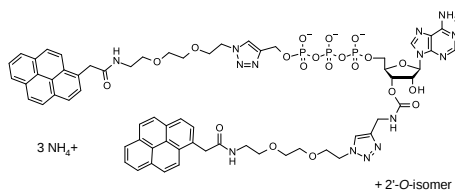
21.12.5. Sonda **7e**

Wodny roztwór nukleotydu **4b** (6,8 μmol , 20,0 μl , 340 mM) oraz roztwór barwnika **5d** w DMSO (20,5 μmol , 130 μl , 158 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (3,4 μmol , 5,0 μl , 680 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (34,2 μmol , 20 μl , 1,71 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (741 mODU_(444nm), 5,3 μmol , 78%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{55}\text{H}_{52}\text{N}_{18}\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}_2^-$: 1329.2621, otrzymano 1329.2639.



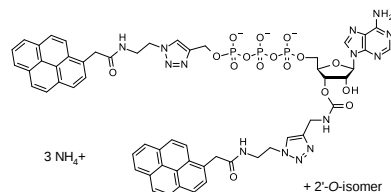
21.12.6. Sonda **7f**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (6,2 μmol , 20,0 μl , 310 mM) oraz roztwór barwnika **5b** w DMSO (18,6 μmol , 550 μl , 34 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (3,1 μmol , 5,0 μl , 620 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (31,0 μmol , 30 μl , 1,03 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (176 mODU_(335 nm), 4,7 μmol , 75%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{65}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{20}\text{P}_3^-$: 1457.3953, otrzymano 1457.3968.



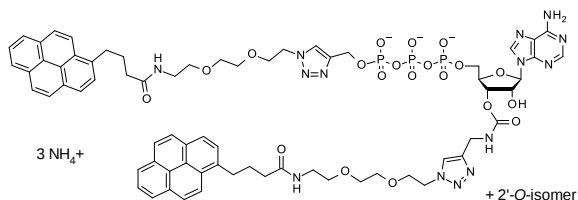
21.12.7. Sonda **7g**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (5,8 μmol , 20,0 μl , 290 mM) oraz roztwór barwnika **5c** w DMSO (17,4 μmol , 330 μl , 53 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (2,9 μmol , 6,0 μl , 483 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (29,0 μmol , 30 μl , 960 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (134 mODU_(335 nm), 3,5 μmol , 61%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{57}\text{H}_{52}\text{N}_{14}\text{O}_{16}\text{P}_3^-$: 1281.2904, otrzymano 1281.2926.



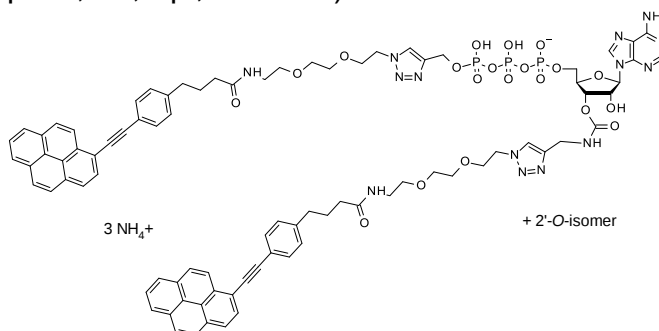
21.12.8. Sonda **7h**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (5,2 μmol , 20,0 μl , 260 mM) oraz roztwór barwnika **5a** w DMSO (15,6 μmol , 330 μl , 47 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (2,6 μmol , 6,0 μl , 433 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (26 μmol , 30 μl , 867 mM). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (136 mODU_(335 nm), 3,6 μmol , 69%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{69}\text{H}_{76}\text{N}_{14}\text{O}_{20}\text{P}_3^-$: 1513.4579, otrzymano 1513.4595.



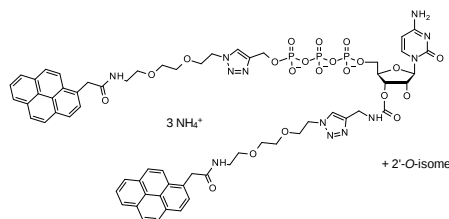
21.12.9. Sonda 7i

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (3,5 μmol , 20,0 μl , 175 mM) oraz roztwór barwnika **5e** w DMSO (17 μmol , 330 μl , 52 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich zmieszane ze sobą wodne roztwory siarczanu (VI) miedzi (II) (6,9 μmol , 6,0 μl , 1,15 M) i THPTA (6,9 μmol , 6 μl , 1,15 M). Reakcję zapoczątkowano poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (69 μmol , 18 μl , 2,3 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 5 godzin, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml) i rozcieńczono z użyciem 2 ml DMSO. Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (241 mODU_(364 nm), 2,97 μmol , 85%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{85}\text{H}_{84}\text{N}_{14}\text{O}_{20}\text{P}_3^-$: 1713.5205 otrzymano 1713.5227.



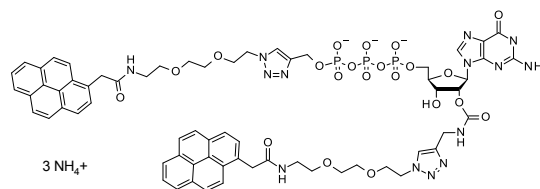
21.12.10. Sonda 7s

Wodny roztwór nukleotydu **4i** (2,8 μmol , 10 μl , 280 mM) oraz roztwór barwnika **5b** w DMSO (8,5 μmol , 330 μl , 25,6 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1,4 μmol , 2,5 μl , 560 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (14,0 μmol , 20 μl , 700 mM). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (55 mODU_(335 nm), 1,46 μmol , 52%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{64}\text{H}_{68}\text{N}_{12}\text{O}_{21}\text{P}_3^-$: 1433.3840, otrzymano 1433.3829.



21.12.11. Sonda 7t

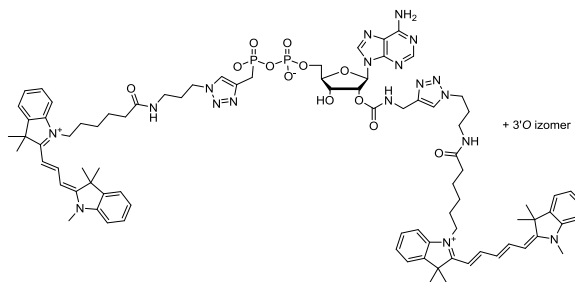
Wodny roztwór nukleotydu **4h** (0,83 μmol , 4,7 μl , 175 mM) oraz roztwór barwnika **5b** w DMSO (2,5 μmol , 13,2 μl , 190 mM) zmieszano razem, po czym dodano do nich wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (0,4 μmol , 0,9 μl , 430 mM) oraz wodny roztwór askorbinianu sodu (8,3 μmol , 1,7 μl , 5 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny, po czym rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (8 mODU_(335 nm), 0,21 μmol , 26%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^- = \text{C}_{65}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{21}\text{P}_3^-$: 1473.3896, otrzymano 1473.3917.



21.13. Synteza sond wykazujących efekt FRET **8a-s**

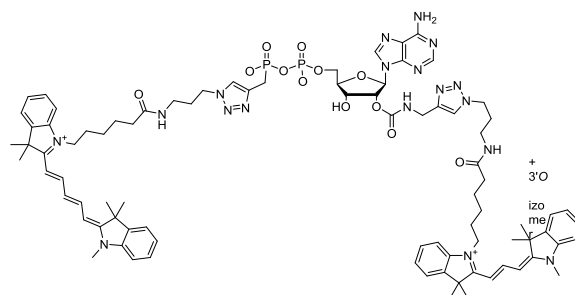
21.13.1. Sonda **8a**

Wodny roztwór nukleotydu **4d** (199 nmol, 1,3 μ l, 153 mM) oraz roztwór barwnika **5f** w DMSO (145 mM, 1,4 μ l, 199 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 3,4 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (20 nmol, 1 μ l, 20 mM), a następnie roztwór askorbinianu sodu (597 nmol, 1 μ l, 597 mM). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 2,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5h** (1,9 μ l, 107 mM, 199 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 79,6 mM, 79,6 nmol, THPTA: 159,2 mM, 159,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 796 mM, 796 nmol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (111 nmol, 56%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = \text{C}_{85}\text{H}_{108}\text{N}_{18}\text{O}_{12}\text{P}_2^{2+}$: 817.3929, otrzymano: 817.3936



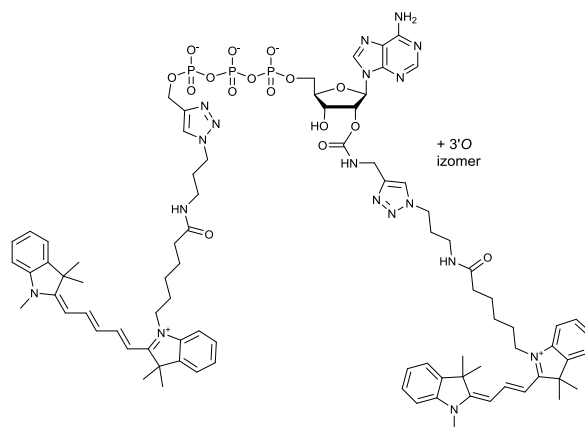
21.13.2. Sonda **8b**

Wodny roztwór nukleotydu **4d** (199 nmol, 153 mM, 1,3 μ l) oraz roztwór barwnika **5h** w DMSO (199 nM, 107 mM, 1,9 μ l) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 3,4 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (20 nmol, 20 mM, 1 μ l), a następnie roztwór askorbinianu sodu (597 nmol, 597 mM, 1 μ l). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 2,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (199 nmol, 145 mM, 1,4 μ l). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 79,6 mM, 79,6 nmol, THPTA: 159,2 mM, 159,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (796 nmol, 796 mM, 1 μ l). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (151,2 nmol, 76%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = \text{C}_{85}\text{H}_{108}\text{N}_{18}\text{O}_{12}\text{P}_2^{2+}$: 817.3935, otrzymano 817.3935.



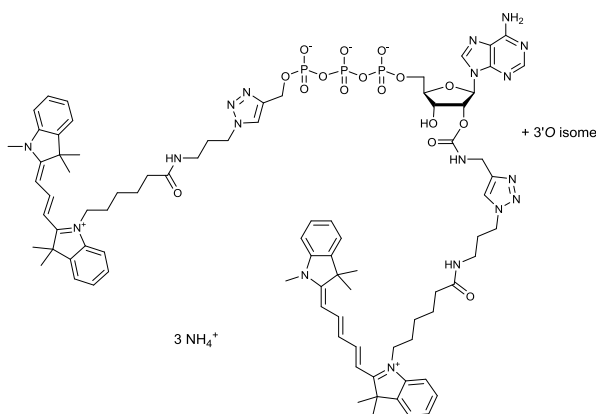
21.13.3. Sonda **8c**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (332 nmol, 84,4 mM, 3,9 μ l) oraz roztwór barwnika **5h** w DMSO (332 nmol, 145 mM, 2,3 μ l) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 5,7 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (33,2 nmol, 33,2 mM, 1 μ l), a następnie roztwór askorbinianu sodu (995 nmol, 995 mM, 1 μ l). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 4,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (332 nmol, 107 mM, 3,1 μ l). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 132,6 mM, 132,6 nmol, THPTA: 265,2 mM, 265,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1,33 μ mol, 1,33 M, 1 μ l). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (242,4 nmol, 73%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = \text{C}_{85}\text{H}_{109}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{P}_3^{2+}$: 865.3736, otrzymano 865.3747.



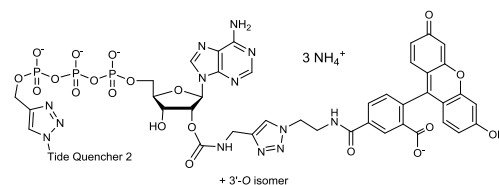
21.13.4. Sonda **8d**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (3,9 μ l, 84,4 mM, 332 nmol) oraz roztwór barwnika **5f** w DMSO (3,1 μ l, 107 mM, 332 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 5,7 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 33,2 mM, 33,2 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 995 mM, 995 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 4,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5h** (2,3 μ l, 145 mM, 332 nmol). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 132,6 mM, 132,6 nmol, THPTA: 265,2 mM, 265,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,33 M, 1,33 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (239,0 nmol, 72%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = \text{C}_{85}\text{H}_{109}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{P}_3^{2+}$: 865.3736, otrzymano: 865.3759.



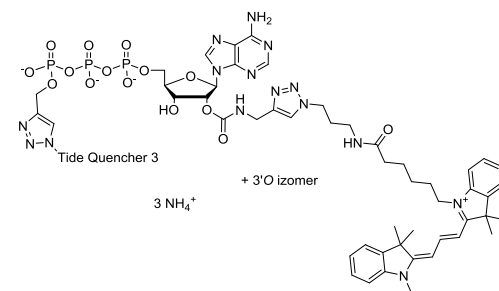
21.13.5. Sonda **8e**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (3,9 μ l, 84,4 mM, 332 nmol) oraz roztwór barwnika **5m** w DMSO (4,1 μ l, 81 mM, 332 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 5,7 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 33,2 mM, 33,2 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 995 mM, 995 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 4,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5j** (5,4 μ l, 107 mM, 332 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO₄ i THPTA (1 μ l, Cu²⁺: 132,6 mM, 132,6 nmol, THPTA: 265,2 mM, 265,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,33 M, 1,33 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO₃ (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (279,0 nmol, 84%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla [M-H] = C₆₂H₆₂N₁₈O₂₁P₃S⁻: 1519.3276, otrzymano 1519.3286.



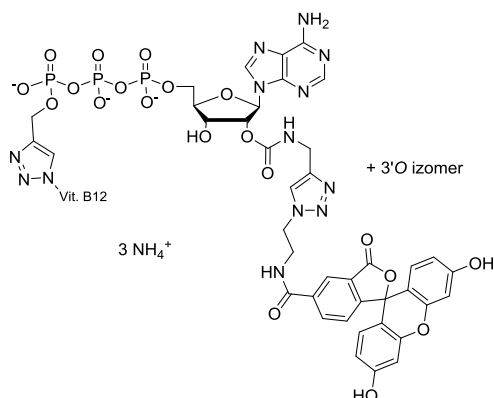
21.13.6. Sonda **8f**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (3,9 μ l, 84,4 mM, 332 nmol) oraz roztwór barwnika **5n** w DMSO (4,6 μ l, 72,5 mM, 332 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 5,7 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 33,2 mM, 33,2 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 995 mM, 995 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 4,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (3,1 μ l, 107 mM, 332 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO₄ i THPTA (1 μ l, Cu²⁺: 132,6 mM, 132,6 nmol, THPTA: 265,2 mM, 265,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,33 M, 1,33 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO₃ (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (159,0 nmol, 48%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla [M-H] = C₆₂H₆₂N₁₈O₂₁P₃S⁻: 1519.3276, otrzymano 1519.3286.



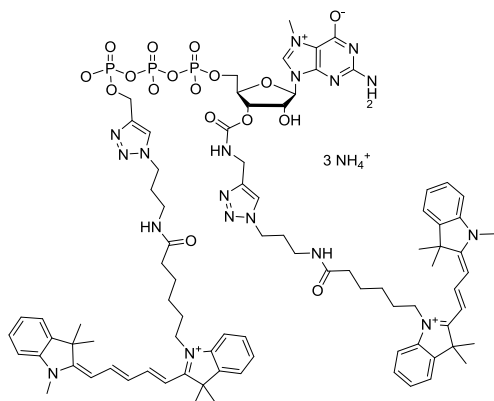
21.13.7. Sonda **8g**

Wodny roztwór nukleotydu **4c** (3,9 μ l, 84,4 mM, 332 nmol) oraz roztwór związku **5l** w DMSO (12,6 μ l, 26,3 mM, 332 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 5,7 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 33,2 mM, 33,2 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 995 mM, 995 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 4,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5j** (5,4 μ l, 61 mM, 332 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 132,6 mM, 132,6 nmol, THPTA: 265,2 mM, 265,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,33 M, 1,33 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda D), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (120 nmol, 36%). HRMS (+) ESI m/z obliczone dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = \text{C}_{103}\text{H}_{126}\text{CoN}_{27}\text{O}_{33}\text{P}_4^{2+}$: 1 225,8642, otrzymano 1 225.8636



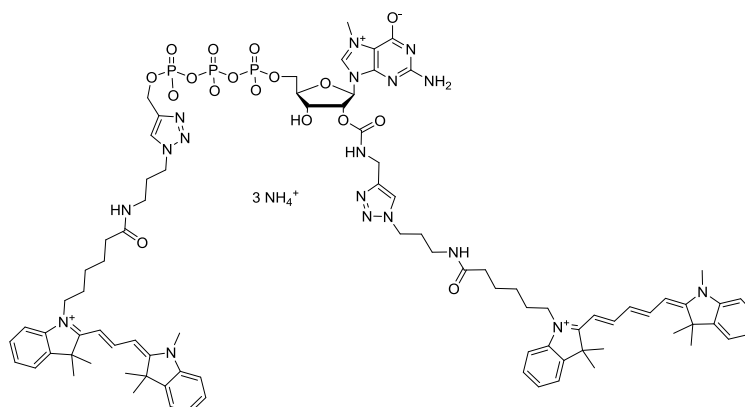
21.13.8. Sonda **8h**

Wodny roztwór nukleotydu **4o** (2,6 μ l, 100 mM, 263 nmol) oraz roztwór barwnika **5h** w DMSO (1,8 μ l, 145 mM, 263 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 4,6 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 26,3 mM, 26,3 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 790 mM, 790 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 3,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (2,5 μ l, 107 mM, 263 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 105,3 mM, 105,3 nmol, THPTA: 210,6 mM, 210,6 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,05 M, 1,05 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (118 nmol, 45%). HRMS (+) ESI m/z obliczone dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} \text{C}_{86}\text{H}_{111}\text{N}_{18}\text{O}_{17}\text{P}_3^{2+}$: 880.3788, otrzymano 880.3790.



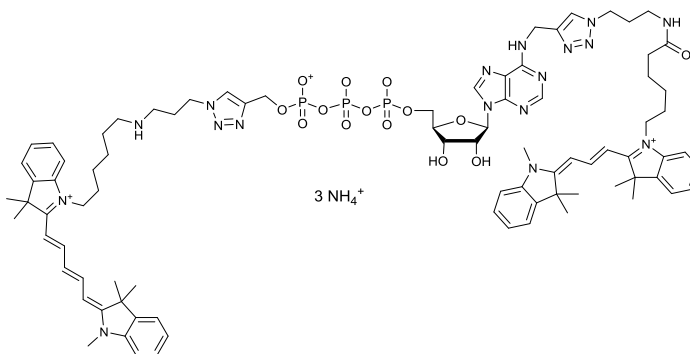
21.13.9. Sonda 8i

Wodny roztwór nukleotydu **4n** (1,3 μ l, 195 mM, 263 nmol) oraz roztwór barwnika **5f** w DMSO (2,5 μ l, 107 mM, 263 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 4,6 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 26,3 mM, 26,3 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 790 mM, 790 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 3,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5h** (1,8 μ l, 145 mM, 263 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 105,3 mM, 105,3 nmol, THPTA: 210,6 mM, 210,6 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,05 M, 1,05 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (113 nmol, 43%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^{2+}$ $\text{C}_{86}\text{H}_{111}\text{N}_{18}\text{O}_{17}\text{P}_3^{2+}$: 880.3788, otrzymano: 880.3802.



21.13.10. Sonda 8j

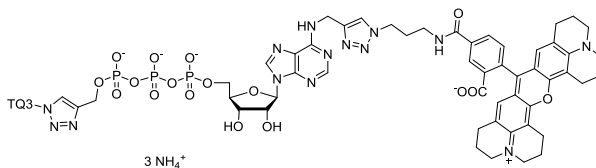
Wodny roztwór nukleotydu **4p** (5,9 μ l, 55,8 mM, 332 nmol) oraz roztwór barwnika **5h** w DMSO (2,3 μ l, 145 mM, 332 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 5,7 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 33,2 mM, 33,2 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 995 mM, 995 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 4,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (3,1 μ l, 107 mM, 332 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 132,6 mM, 132,6 nmol, THPTA: 265,2 mM, 265,2 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,33 M, 1,33 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (189



nmol, 57%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[M+3H]^{3+} = C_{84}H_{109}N_{17}O_{15}P_3^{3+}$: 562.9162, otrzymano 562.9162.

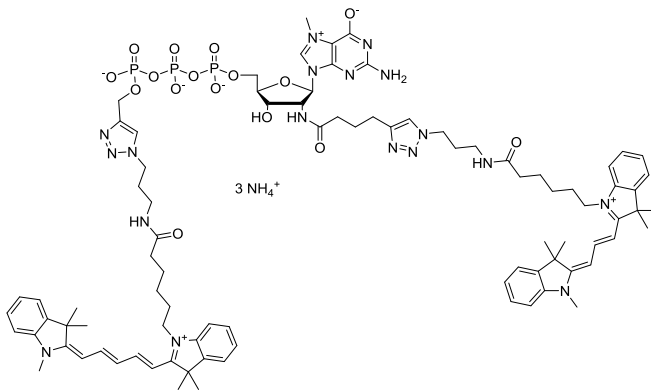
21.13.11. Sonda **8k**

Wodny roztwór nukleotydu **4p** (2,7 μ l, 55,8 mM, 150 nmol) oraz roztwór barwnika **5n** w DMSO (2,5 μ l, 60,4 mM, 150 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 3 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (0,5 μ l, 120,0 mM, 60,0 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (0,5 μ l, 962 mM, 481 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 7 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5k** (1,6 μ l, 94 mM, 150 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór $CuSO_4$ i THPTA (0,5 μ l, Cu^{2+} : 240 mM, 120 nmol, THPTA: 480 mM, 240 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,2 M, 1,2 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i $NaHCO_3$ (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (36 nmol, 24%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[M-H]^- = C_{76}H_{82}N_{20}O_{20}P_3S^-$: 1719.4948, otrzymano 1719.4989



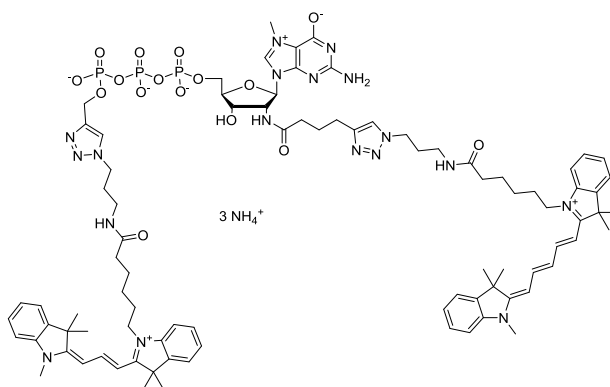
21.13.12. Sonda **8l**

Wodny roztwór nukleotydu **4s** (2,7 μ l, 98,3 mM, 263 nmol) oraz roztwór barwnika **5h** w DMSO (1,8 μ l, 145 mM, 263 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 4,6 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 26,3 mM, 26,3 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 790 mM, 790 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 3,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (2,5 μ l, 107 mM, 263 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór $CuSO_4$ i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 105,3 mM, 105,3 nmol, THPTA: 210,6 mM, 210,6 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,05 M, 1,05 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i $NaHCO_3$ (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (121 nmol, 46%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[M+2H]^{2+} = C_{88}H_{114}N_{18}O_{16}P_3^{2+}$: 886.3970, otrzymano 886.3962.



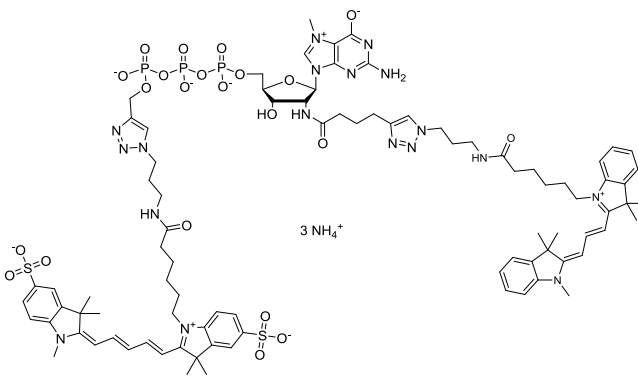
21.13.13. Sonda 8m

Wodny roztwór nukleotydu **4s** (2,7 μl , 98,3 mM, 263 nmol) oraz roztwór barwnika **5f** w DMSO (2,5 μl , 107 mM, 263 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 4,6 μl DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczuanu (VI) miedzi (II) (1 μl , 26,3 mM, 26,3 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μl , 790 mM, 790 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 3,9 μl DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5h** (1,8 μl , 145 mM, 263 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μl , Cu^{2+} : 105,3 mM, 105,3 nmol, THPTA: 210,6 mM, 210,6 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μl , 1,05 M, 1,05 μmol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (129 nmol, 49%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ $\text{C}_{88}\text{H}_{115}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{P}_3^{2+}$: 886.3970, otrzymano 886.3962.



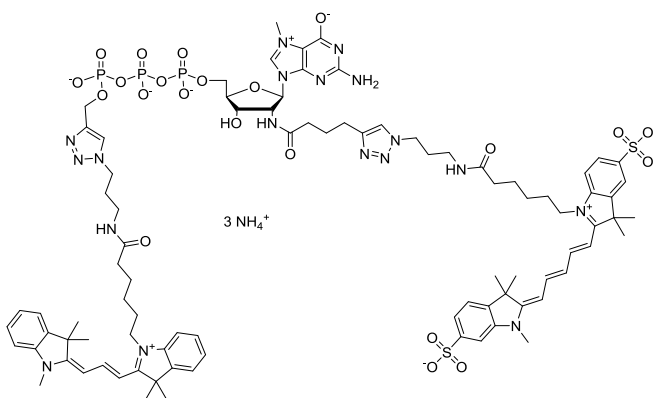
21.13.14. Sonda 8n

Wodny roztwór nukleotydu **4s** (2,7 μl , 98,3 mM, 263 nmol) oraz roztwór barwnika **5i** w DMSO (1,6 μl , 168 mM, 263 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 4,6 μl DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μl , 26,3 mM, 26,3 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μl , 790 mM, 790 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 3,9 μl DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (1,8 μl , 145 mM, 263 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μl , Cu^{2+} : 105,3 mM, 105,3 nmol, THPTA: 210,6 mM, 210,6 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μl , 1,05 M, 1,05 μmol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (129 nmol, 45%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$: $\text{C}_{88}\text{H}_{111}\text{N}_{18}\text{O}_{22}\text{P}_3\text{S}_2^{2-}$: 964.3393 otrzymano 964.3412.



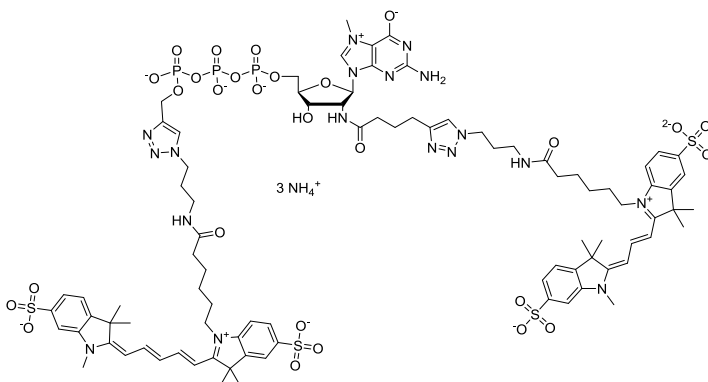
21.13.15. Sonda **8o**

Wodny roztwór nukleotydu **4s** (3,6 μ l, 98,3 mM, 351 nmol) oraz roztwór barwnika **5f** w DMSO (3,3 μ l, 107 mM, 351 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 6,0 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 35,1 mM, 35,1 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 1,05 M, 1,05 μ mol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 5,1 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5i** (2,1 μ l, 168 mM, 351 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 140,4 mM, 140,4 nmol, THPTA: 280,8 mM, 280,8 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,4 M, 1,4 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (77,2 nmol, 22%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ $\text{C}_{88}\text{H}_{111}\text{N}_{18}\text{O}_{22}\text{P}_3\text{S}_2^{2-}$: 964.3393 otrzymano 964.3412.



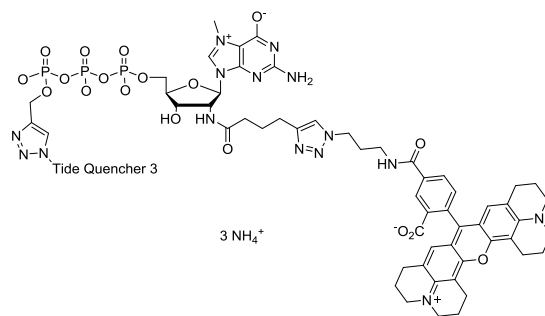
21.13.16. Sonda **8p**

Wodny roztwór nukleotydu **4s** (2,7 μ l, 98,3 mM, 263 nmol) oraz roztwór barwnika **5i** w DMSO (1,6 μ l, 168 mM, 263 nmol) zmieszano razem i rozcieńczono z użyciem 4,6 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 26,0 mM, 26,0 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 789 mM, 789 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 3,9 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5g** (3,4 μ l, 77,1 mM, 263 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 105 mM, 105 nmol, THPTA: 210 mM, 210 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 1,05 M, 1,05 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (89,4 nmol, 34%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: $\text{C}_{88}\text{H}_{115}\text{N}_{18}\text{O}_{28}\text{P}_3\text{S}_4^{2+}$: 1046.3107, otrzymano 1046.3115.



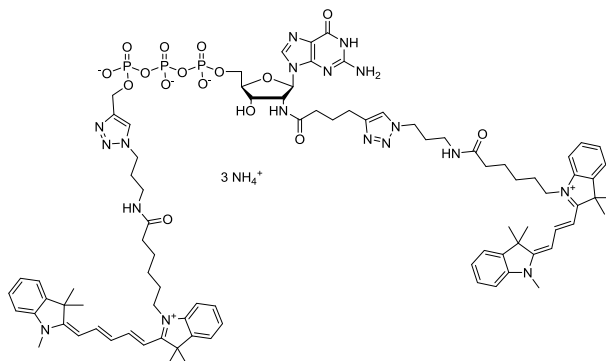
21.13.17. Sonda **8r**

Wodny roztwór nukleotydu **4s** (2,6 μ l, 67,0 mM, 175 nmol) oraz roztwór barwnika **5n** w DMSO (2,1 μ l, 83 mM, 175 nmol) mieszano razem i rozcieńczono z użyciem 10 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczynu (VI) miedzi (II) (0,5 μ l, 351 mM, 175 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (0,5 μ l, 877 mM, 439 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano roztwór w DMSO barwnika **5k** (1,9 μ l, 94 mM, 175 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (0,5 μ l, Cu^{2+} : 280 mM, 140 nmol, THPTA: 560 mM, 280 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (0,5 μ l, 2,8 M, 1,4 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (84 nmol, 48%). HRMS (-) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{80}\text{H}_{89}\text{N}_{21}\text{O}_{21}\text{P}_3\text{S}^-$: 1804.5481 otrzymano 1804.5518.



21.13.18. Sonda **8s**

Wodny roztwór nukleotydu **4r** (3,0 μ l, 82,1 mM, 248 nmol) oraz roztwór barwnika **5h** w DMSO (1,7 μ l, 145 mM, 248 nmol) mieszano razem i rozcieńczono z użyciem 4,3 μ l DMSO. Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór siarczynu (VI) miedzi (II) (1 μ l, 24,8 mM, 24,8 nmol), a następnie roztwór askorbinianu sodu (1 μ l, 745 mM, 745 nmol). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono z użyciem 4,3 μ l DMSO, a następnie dodano do niej roztwór w DMSO barwnika **5f** (2,3 μ l, 107 mM, 248 nM). Do otrzymanego roztworu dodano wodny roztwór CuSO_4 i THPTA (1 μ l, Cu^{2+} : 99,3 mM, 99,3 nmol, THPTA: 198,6 mM, 198,6 nmol). Reakcję rozpoczęto poprzez dodanie wodnego roztworu askorbinianu sodu (1 μ l, 0,993 M, 0,993 μ mol). Po 1,5 godziny reakcji mieszaninę rozcieńczono 0,5 ml wodnego roztworu EDTA (20 mg/ml) i NaHCO_3 (10 mg/ml). Produkt oczyszczono z użyciem HPLC RP (metoda A), a po trzykrotnej liofilizacji uzyskano produkt w postaci soli amonowej (117 nmol, 47%). HRMS (+) ESI m/z obliczono dla $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ $\text{C}_{87}\text{H}_{113}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{P}_3^{2+}$: 879.3892, otrzymano 879.3880.



Bibliografia

1. Gerweck, L.; Seetharaman, K., Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Research* 1996, 56 (6), 1194-1198.
2. Tang, C.; Alexov, E.; Pyle, A.; Honig, B., Calculation of pK(a)s in RNA: On the structural origins and functional roles of protonated nucleotides. *Journal of Molecular Biology* 2007, 366 (5), 1475-1496.
3. Knox, J.; Jurand, J., Zwitterion-pair chromatography of nucleotides and related species. *Journal of chromatography* 1981, 203 (jan), 85-92.
4. Neidle, S., *Principles of Nucleic Acid Structure* 2008.
5. Sokoloski, J.; Godfrey, S.; Dombrowski, S.; Bevilacqua, P., Prevalence of syn nucleobases in the active sites of functional RNAs. *RNA* 2011, 17 (10), 1775-1787.
6. Vangalen, P.; Ijzerman, A.; Soudijn, W., Xanthine-7-ribosides as adenosine-a1 receptor antagonists - further evidence for adenosines anti mode of binding. *Nucleosides & Nucleotides* 1990, 9 (2), 275-291.
7. Schweizer, M.; Broom, A.; Tso, P.; Hollis, D., Studies of inter- and intramolecular interaction in mononucleotides by proton magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society* 1968, 90 (4), 1042-+.
8. Belmont, P.; Constant, J.; Demeunynck, M., Nucleic acid conformation diversity: from structure to function and regulation. *Chemical Society Reviews* 2001, 30 (1), 70-81.
9. Schultz, C., Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2003, 11 (6), 885-898.
10. Balzarini, J., Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine-derivatives. *Pharmacy World & Science* 1994, 16 (2), 113-126.
11. Balzarini, J.; Herdewijn, P.; Declercq, E., Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, 2 potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *Journal of Biological Chemistry* 1989, 264 (11), 6127-6133.
12. Harrington, J.; Reardon, J.; Spector, T., 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) monophosphate - an inhibitor of exonucleolytic repair of AZT-terminated DNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993, 37 (4), 918-920.
13. Pinho, P.; Kalayanov, G.; Westerlind, H.; Rosenquist, A.; Wahling, H.; Sund, C.; Almeida, M.; Ayesa, S.; Tejbrant, J.; Targett-Adams, P.; Eneroth, A.; Lindqvist, A., Discovery of beta-D-2 '-deoxy-2 '-dichlorouridine nucleotide prodrugs as potent inhibitors of hepatitis C virus replication. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2017, 27 (15), 3468-3471.
14. Pertusati, F.; McGuigan, C., Diastereoselective synthesis of P-chirogenic phosphoramidate prodrugs of nucleoside analogues (protides) via copper catalysed reaction. *Chemical Communications* 2015, 51 (38), 8070-8073.
15. Traut, T., Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1994, 140 (1), 1-22.
16. Moyer, J.; Henderson, J., Compartmentation of intracellular nucleotides in mammalian-cells. *Crc Critical Reviews in Biochemistry* 1985, 19 (1), 45-61.
17. Ho, C.; Sriskanda, V.; McCracken, S.; Bentley, D.; Schwer, B.; Shuman, S., The guanylyltransferase domain of mammalian mRNA capping enzyme binds to the phosphorylated

carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273 (16), 9577-9585.

18. Sydow, J.; Cramer, P., RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Current Opinion in Structural Biology* 2009, 19 (6), 732-739.

19. Wang, D.; Bushnell, D.; Westover, K.; Kaplan, C.; Kornberg, R., Structural basis of transcription: Role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* 2006, 127 (5), 941-954.

20. Albert, D.; Gudas, L., Ribonucleotide reductase-activity and deoxyribonucleoside triphosphate metabolism during the cell-cycle of s49 wild-type and mutant mouse T-lymphoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 1985, 260 (1), 679-684.

21. Eastoe, J.; Hatzopoulos, M.; Dowding, P., Action of hydrotropes and alkyl-hydrotropes. *Soft Matter* 2011, 7 (13), 5917-5925.

22. Glenner, G.; Wong, C., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein (Reprinted from *Biochemical And Biophysical Research Communications*, vol 120, pg 885-890, 1984). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012, 425 (3), 534-539.

23. Doi, H.; Okamura, K.; Bauer, P.; Furukawa, Y.; Shimizu, H.; Kurosawa, M.; Machida, Y.; Miyazaki, H.; Mitsui, K.; Kuroiwa, Y.; Nukina, N., RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283 (10), 6489-6500.

24. Patel, A.; Malinowska, L.; Saha, S.; Wang, J.; Alberti, S.; Krishnan, Y.; Hyman, A., ATP as a biological hydrotrope. *Science* 2017, 356 (6339), 753-756.

25. Abbracchio, M.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.; Barnard, E.; Boyer, J.; Kennedy, C.; Knight, G.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K.; Weisman, G., International union of pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews* 2006, 58 (3), 281-341.

26. Darby, M.; Kuzmiski, J.; Panenka, W.; Feighan, D.; macvicar, B., ATP released from Astrocytes during swelling activates chloride channels. *Journal of Neurophysiology* 2003, 89 (4), 1870-1877.

27. Placido, R.; Auricchio, G.; Falzoni, S.; Battistini, L.; Colizzi, V.; Brunetti, E.; Di Virgilio, F.; Mancino, G., P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. *Cellular Immunology* 2006, 244 (1), 10-18.

28. Sorensen, C.; Novak, I., Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus - Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276 (35), 32925-32932.

29. Erlinge, D.; Olivecrona, G.; Gotberg, M.; Olsson, M.; Winsell, M.; Wang, L., ADP acting on P2Y13 receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells. *Faseb Journal* 2005, 19 (5), A1258-A1258.

30. Dietrich, H.; Ellsworth, M.; Sprague, R.; Dacey, R., Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2000, 278 (4), H1294-H1298.

31. Corriden, R.; Insel, P., Basal Release of ATP: An Autocrine-Paracrine Mechanism for Cell Regulation. *Science Signaling* 2010, 3 (104).

32. Kim, M.; Kuruvilla, H.; Raghu, S.; Hennessey, T., ATP reception and chemosensory adaptation in *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Experimental Biology* 1999, 202 (4), 407-416.

33. Tornroth-Horsefield, S.; Neutze, R., Opening and closing the metabolite gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105 (50), 19565-19566.
34. Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L., *Biochemistry*. 2002.
35. Saurin, W.; Hofnung, M.; Dassa, E., Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Journal of Molecular Evolution* 1999, 48 (1), 22-41.
36. Kerr, I.; Jones, P.; George, A., Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *Febs Journal* 2010, 277 (3), 550-563.
37. Locher, K., Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* 2016, 23 (6), 487-493.
38. Lymn, R.; Taylor, E., Transient state phosphate production in hydrolysis of nucleoside triphosphates by myosin. *Biochemistry* 1970, 9 (15), 2975-&.
39. Antonellis, A.; Green, E., The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2008, 9, 87-107.
40. Glickman, M.; Ciechanover, A., The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* 2002, 82 (2), 373-428.
41. Tokgoz, Z.; Bohnsack, R.; Haas, A., Pleiotropic effects of ATP center dot Mg²⁺ binding in the catalytic cycle of ubiquitin-activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281 (21), 14729-14737.
42. Ravid, T.; Hochstrasser, M., Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, 9 (9), 679-U25.
43. Zhu, Q.; Zhuang, W.; Niu, H.; Ge, L.; Hernandez, B.; Wu, J.; Wang, K.; Liu, D.; Chen, Y.; Zhu, C.; Ying, H., Affinity induced immobilization of adenylate cyclase from the crude cell lysate for ATP conversion. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2018, 164, 155-164.
44. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P.; Steitz, T., The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution. *Science* 2000, 289 (5481), 905-920.
45. Nishi, T.; Forgac, M., The vacuolar (H⁺)-atpases - Nature's most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002, 3 (2), 94-103.
46. Hu, Y.; Dammer, E.; Ren, R.; Wang, G., The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration* 2015, 4.
47. Vaananen, H.; Zhao, H.; Mulari, M.; Halleen, J., The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science* 2000, 113 (3), 377-381.
48. Karet, F.; Finberg, K.; Nelson, R.; Nayir, A.; Mocan, H.; Sanjad, S.; Rodriguez-Soriano, J.; Santos, F.; Cremers, C.; Di Pietro, A.; Hoffbrand, B.; Winiarski, J.; Bakaloglu, A.; Ozen, S.; Dusunsal, R.; Goodyer, P.; Hulton, S.; Wu, D.; Skvorak, A.; Morton, C.; Cunningham, M.; Jha, V.; Lifton, R., Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-atpase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nature Genetics* 1999, 21 (1), 84-90.
49. Alfarouk, K.; Muddathir, A. K.; Shayoub, M., Tumor Acidity as Evolutionary Spite. *Cancers* 2011; Vol. 3.
50. Sennoune, S.; Bakunts, K.; Martinez, G.; Chua-Tuan, J.; Kebir, Y.; Attaya, M.; Martinez-Zaguilan, R., Vacuolar H⁺-atpase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2004, 286 (6), C1443-C1452.

51. Schirmer, E.; Queitsch, C.; Kowall, A.; Parsell, D.; Lindquist, S., The ATPase activity of Hsp104, effects of environmental conditions and mutations. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273 (25), 15546-15552.
52. Vabulas, R.; Raychaudhuri, S.; Hayer-Hartl, M.; Hartl, F., Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010, 2 (12).
53. Maiti, P.; Manna, J.; Veleri, S.; Frautschy, S., Molecular Chaperone Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Effects of Curcumin. *Biomed Research International* 2014.
54. Pedersen, J.; Sigurdsson, E., Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* 2015, 21 (6), 394-402.
55. Jameson, L.; Frey, T.; Zeeberg, B.; Dalldorf, F.; Caplow, M., Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 1980, 19 (11), 2472-2479.
56. Litersky, J.; Johnson, G., Phosphorylation by camp-dependent protein-kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *Journal of Biological Chemistry* 1992, 267 (3), 1563-1568.
57. Lindwall, G.; Cole, R., Phosphorylation affects the ability of tau-protein to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry* 1984, 259 (8), 5301-5305.
58. Kenessey, A.; Yen, S.; Liu, W.; Yang, X.; Dunlop, D., Detection of d-aspartate in tau-proteins associated with alzheimer paired helical filaments. *Brain Research* 1995, 675 (1-2), 183-189.
59. Crews, L.; Masliah, E., Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 2010, 19, R12-R20.
60. Gabarra-Niecko, V.; Schaller, M.; Dunty, J., FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2003, 22 (4), 359-374.
61. Cohen, L.; Guan, J., Mechanisms of focal adhesion kinase regulation. *Current Cancer Drug Targets* 2005, 5 (8), 629-643.
62. Roskoski, R., Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 331 (1), 1-14.
63. Toutant, M.; Costa, A.; Studler, J.; Kadare, G.; Carnaud, M.; Girault, J., Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 2002, 22 (22), 7731-7743.
64. Schlaepfer, D.; Mitra, S.; Ilic, D., Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 2004, 1692 (2-3), 77-102.
65. Eddy, R.; Weidmann, M.; Sharma, V.; Condeelis, J., Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. *Trends in Cell Biology* 2017, 27 (8), 595-607.
66. Schlaepfer, D.; Mitra, S., Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current Opinion in Genetics & Development* 2004, 14 (1), 92-101.
67. Mclean, G.; Komiyama, N.; Serrels, B.; Asano, H.; Reynolds, L.; Conti, F.; Hodivala-Dilke, K.; Metzger, D.; Chambon, P.; Grant, S.; Frame, M., Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes & Development* 2004, 18 (24), 2998-3003.
68. Lim, S.; Chen, X.; Lim, Y.; Hanson, D.; Vo, T.; Howerton, K.; Larocque, N.; Fisher, S.; Schlaepfer, D.; Ilic, D., Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular Cell* 2008, 29 (1), 9-22.
69. Kim, N.; Gumbiner, B., Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *Journal of Cell Biology* 2015, 210 (3), 503-515.

70. Liu, H.; Jiang, Y.; Luo, Y.; Jiang, W., A simple and rapid determination of ATP, ADP and AMP concentrations in pericarp tissue of litchi fruit by high performance liquid chromatography. *Food Technology and Biotechnology* 2006, 44 (4), 531-534.
71. Qian, T.; Cai, Z.; Yang, M., Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2004, 325 (1), 77-84.
72. Compagnone, D.; Guilbault, G., Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP. *Analytica Chimica Acta* 1997, 340 (1-3), 109-113.
73. Wang, Y.; Tang, L.; Li, Z.; Lin, Y.; Li, J., In situ simultaneous monitoring of ATP and GTP using a graphene oxide nanosheet-based sensing platform in living cells. *Nature Protocols* 2014, 9 (8), 1944-1955.
74. Hazama, A.; Hayashi, S.; Okada, Y., Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 1998, 437 (1), 31-35.
75. Neher, E.; Sakmann, B., The patch clamp technique. *Scientific American* 1992, 266 (3), 44-51.
76. Zuo, X.; Song, S.; Zhang, J.; Pan, D.; Wang, L.; Fan, C., A target-responsive electrochemical aptamer switch (TREAS) for reagentless detection of nanomolar ATP. *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129 (5), 1042-1043.
77. Vancraenenbroeck, R.; Webb, M., A fluorescent, reagentless biosensor for ATP. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters* 2015, 44, S65-S65.
78. Leyssens, A.; Nowicky, A.; Patterson, L.; Crompton, M.; Duchen, M., The relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis, [Mg²⁺], and [Ca²⁺](i) studied in isolated rat cardiomyocytes. *Journal of Physiology-London* 1996, 496 (1), 111-128.
79. Chinopoulos, C.; Vajda, S.; Csanady, L.; Mandi, M.; Mathe, K.; Adam-Vizi, V., A Novel Kinetic Assay of Mitochondrial ATP-ADP Exchange Rate Mediated by the ANT. *Biophysical Journal* 2009, 96 (6), 2490-2504.
80. Irvin, J.; Irvin, E., The interaction of quinacrine with adenine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry* 1954, 210 (1), 45-56.
81. To, W.; Kumar, P.; Marshall, J., Hypoxia is an effective stimulus for vesicular release of ATP from human umbilical vein endothelial cells. *Placenta* 2015, 36 (7), 759-766.
82. Xu, Z.; Singh, N.; Lim, J.; Pan, J.; Kim, H.; Park, S.; Kim, K.; Yoon, J., Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at Physiological pH. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131 (42), 15528-15533.
83. Qiang, W.; Hu, H.; Sun, L.; Li, H.; Xu, D., Aptamer/Polydopamine Nanospheres Nanocomplex for in Situ Molecular Sensing in Living Cells. *Analytical Chemistry* 2015, 87 (24), 12190-12196.
84. Zheng, D.; Seferos, D.; Giljohann, D.; Patel, P.; Mirkin, C., Aptamer Nano-flares for Molecular Detection in Living Cells. *Nano Letters* 2009, 9 (9), 3258-3261.
85. Hacker, S.; Hardt, N.; Buntru, A.; Pagliarini, D.; Mockel, M.; Mayer, T.; Scheffner, M.; Hauck, C.; Marx, A., Fingerprinting differential active site constraints of ATPases. *Chemical Science* 2013, 4 (4), 1588-1596.
86. Hiratsuka, T., New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine-nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1983, 742 (3), 496-508.
87. Szulc, A.; Appelhans, D.; Voit, B.; Bryszewska, M.; Klajnert, B., Studying Complexes Between PPI Dendrimers and Mant-ATP. *Journal of Fluorescence* 2013, 23 (2), 349-356.

88. Nanjwade, B.; Bechra, H.; Derkar, G.; Manvi, F.; Nanjwade, V., Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 38 (3), 185-196.
89. Ho, T.; Jobling, A.; Greferath, U.; Chuang, T.; Ramesh, A.; Fletcher, E.; Vessey, K., Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015, 9.
90. Oiwa, K.; Eccleston, J.; Anson, M.; Kikumoto, M.; Davis, C.; Reid, G.; Ferenczi, M.; Corrie, J.; Yamada, A.; Nakayama, H.; Trentham, D., Comparative single-molecule and ensemble myosin enzymology: Sulfoindocyanine ATP and ADP derivatives. *Biophysical Journal* 2000, 78 (6), 3048-3071.
91. Schax, E.; Walter, J.; Mazhauser, H.; Stahl, F.; Scheper, T.; Agard, D.; Eichner, S.; Kirschning, A.; Zeilinger, C., Microarray-based screening of heat shock protein inhibitors. *Journal of Biotechnology* 2014, 180, 1-9.
92. Halle, F.; Fin, A.; Rovira, A.; Tor, Y., Emissive Synthetic Cofactors: Enzymatic Interconversions of (tz)A Analogues of ATP, NAD(+), NADH, NADP(+), and NADPH. *Angewandte Chemie-International Edition* 2018, 57 (4), 1087-1090.
93. Kwon, S.; Kim, S.; Jaunbergs, J.; Falck, J.; Zhao, Y., Selective enrichment of thiophosphorylated polypeptides as a tool for the analysis of protein phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics* 2003, 2 (4), 242-247.
94. Kinzel, V.; Mueller, G., Phosphorylation of surface proteins of HeLa-cells using an exogenous protein kinase and [γ -P-32]ATP. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1973, 322 (2), 337-351.
95. Lee, S.; Elphick, L.; Anderson, A.; Bonnac, L.; Child, E.; Mann, D.; Gouverneur, V., Synthesis and reactivity of novel gamma-phosphate modified ATP analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, 19 (14), 3804-3807.
96. Ishida, N.; Hara, T.; Kamura, T.; Yoshida, M.; Nakayama, K.; Nakayama, K., Phosphorylation of p27(Kip1) on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277 (17), 14355-14358.
97. Singh, S.; Dubinsky-Davidchik, I.; Kluger, R., Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition for protein-protein coupling in the formation of a bis-hemoglobin as a copper-free oxygen carrier. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2016, 14 (42), 10011-10017.
98. Green, K.; Pflum, M., Exploring Kinase Cosubstrate Promiscuity: Monitoring Kinase Activity through Dansylation. *Chembiochem* 2009, 10 (2), 234-237.
99. Fouda, A.; Pflum, M., A Cell-Permeable ATP Analogue for Kinase-Catalyzed Biotinylation. *Angewandte Chemie-International Edition* 2015, 54 (33), 9618-9621.
100. Duan, S.; Ge, X.; Lu, N.; Wu, F.; Yuan, W.; Jin, T., Synthetic polyspermine imidazole-4, 5-amide as an efficient and cytotoxicity-free gene delivery system. *International Journal of Nanomedicine* 2012, 7, 3813-3822.
101. Birks, J., Excimers. *Reports on Progress in Physics* 1975, 38 (8), 903-974.
102. Forster, T., Excimers. *Angewandte Chemie-International Edition* 1969, 8 (5), 333-&.
103. Wang, C.; Wu, C.; Chen, Y.; Song, Y.; Tan, W.; Yang, C., Pyrene Excimer for DNA Sensors. *Current Organic Chemistry* 2011, 15 (4), 465-476.
104. Nakagawa, K.; Numata, Y.; Ishino, H.; Tanaka, D.; Kobayashi, T.; Tokunaga, E., Excimer Luminescence From Nonresonantly Excited Pyrene and Perylene Molecules in Solution. *Journal of Physical Chemistry a* 2013, 117 (45), 11449-11455.

105. Katoh, R.; Sinha, S.; Murata, S.; Tachiya, M., Origin of the stabilization energy of perylene excimer as studied by fluorescence and near-IR transient absorption spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 2001, 145 (1-2), 23-34.
106. Bains, G.; Patel, A.; Narayanaswami, V., Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes. *Molecules* 2011, 16 (9), 7909-7935.
107. Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M., Unambiguous detection of target DNAs by excimer-monomer switching molecular beacons. *Journal of Organic Chemistry* 2004, 69 (10), 3271-3275.
108. Huang, J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Yang, X.; Yang, C.; Wang, K.; Tan, W., Pyrene-Excimer Probes Based on the Hybridization Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Fluids. *Angewandte Chemie-International Edition* 2011, 50 (2), 401-404.
109. Svoboda, P.; Di Cara, A., Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006, 63 (7-8), 901-918.
110. Astakhova, K.; Golovin, A.; Prokhorenko, I.; Ustinov, A.; Stepanova, I.; Zatsepin, T.; Korshun, V., Design of 2'-phenylethynylpyrene excimer forming DNA/RNA probes for homogeneous SNP detection: The attachment manner matters. *Tetrahedron* 2017, 73 (23), 3220-3230.
111. Han, G.; Kim, D.; Park, Y.; Bouffard, J.; Kim, Y., Excimers Beyond Pyrene: A Far-Red Optical Proximity Reporter and its Application to the Label-Free Detection of DNA. *Angewandte Chemie-International Edition* 2015, 54 (13), 3912-3916.
112. Mooney, A. M., FRET Jablonski diagram with typical timescales. *Diagram.svg*, F. J., Ed. https://en.wikipedia.org/wiki/F%C3%b6rster_resonance_energy_transfer, 2012.
113. Hillisch, A.; Lorenz, M.; Diekmann, S., Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes. *Current Opinion in Structural Biology* 2001, 11 (2), 201-207.
114. Yuan, F.; Griffin, L.; Phelps, L.; Buschmann, V.; Weston, K.; Greenbaum, N., Use of a novel Forster resonance energy transfer method to identify locations of site-bound metal ions in the U2-U6 snRNA complex. *Nucleic Acids Research* 2007, 35 (9), 2833-2845.
115. Kuscu, M.; Akan, O., A Physical Channel Model and Analysis for Nanoscale Molecular Communications With Forster Resonance Energy Transfer (FRET). *Transactions on Nanotechnology* 2012, 11 (1), 200-207.
116. Dale, R.; Eisinger, J., Intramolecular distances determined by energy-transfer - dependence on orientational freedom of donor and acceptor. *Biopolymers* 1974, 13 (8), 1573-1605.
117. Ishikawa-Ankerhold, H.; Ankerhold, R.; Drummen, G., Advanced Fluorescence Microscopy Techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 2012, 17 (4), 4047-4132.
118. Quan, K.; Huang, J.; Yang, X.; Yang, Y.; Ying, L.; Wang, H.; Xie, N.; Ou, M.; Wang, K., Powerful Amplification Cascades of FRET-Based Two-Layer Nonenzymatic Nucleic Acid Circuits. *Analytical Chemistry* 2016, 88 (11), 5857-5864.
119. Sharma, K.; Przybilla, F.; Restle, T.; Godet, J.; Mely, Y., FRET-based assay to screen inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Research* 2016, 44 (8).
120. Acosta, O.; Hardt, N.; Hacker, S.; Strittmatter, T.; Schink, B.; Marx, A., Thiamine Pyrophosphate Stimulates Acetone Activation by *Desulfococcus biacutus* As Monitored by a Fluorogenic ATP Analogue. *Acs Chemical Biology* 2014, 9 (6), 1263-1266.
121. Hardt, N.; Hacker, S.; Marx, A., Synthesis and fluorescence characteristics of ATP-based FRET probes. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2013, 11 (48), 8298-8305.
122. Hacker, S.; Pagliarini, D.; Tischer, T.; Hardt, N.; Schneider, D.; Mex, M.; Mayer, T.; Scheffner, M.; Marx, A., Fluorogenic ATP Analogues for Online Monitoring of ATP Consumption:

Observing Ubiquitin Activation in Real Time. *Angewandte Chemie-International Edition* 2013, 52 (45), 11916-11919.

123. Kolb, H.; Finn, M.; Sharpless, K., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition* 2001, 40 (11), 2004-+.

124. Rostovtsev, V.; Green, L.; Fokin, V.; Sharpless, K., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* 2002, 41 (14), 2596-+.

125. Tornøe, C.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* 2002, 67 (9), 3057-3064.

126. Zhu, L.; Brassard, C.; Zhang, X.; Guha, P.; Clark, R., On the Mechanism of Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chemical Record* 2016, 16 (3), 1501-1517.

127. Angell, Y.; Burgess, K., Base dependence in copper-catalyzed Huisgen reactions: Efficient formation of bistriazoles. *Angewandte Chemie-International Edition* 2007, 46 (20), 3649-3651.

128. Hein, J.; Tripp, J.; Krasnova, L.; Sharpless, K.; Fokin, V., Copper(I)-Catalyzed Cycloaddition of Organic Azides and 1-Iodoalkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* 2009, 48 (43), 8018-8021.

129. MOUNTS, R.; OGURA, T.; FERNANDO, Q., CRYSTAL-STRUCTURE OF COPPER(I) ACETATE. *Inorganic Chemistry* 1974, 13 (4), 802-805.

130. Ahlquist, M.; Fokin, V., Enhanced reactivity of dinuclear Copper(I) acetylides in dipolar cycloadditions. *Organometallics* 2007, 26 (18), 4389-4391.

131. Shao, C.; Cheng, G.; Su, D.; Xu, J.; Wang, X.; Hu, Y., Copper(I) Acetate: A Structurally Simple but Highly Efficient Dinuclear Catalyst for Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2010, 352 (10), 1587-1592.

132. Lewis, W.; Magallon, F.; Fokin, V.; Finn, M., Discovery and characterization of catalysts for azide-alkyne cycloaddition by fluorescence quenching. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126 (30), 9152-9153.

133. Wang, Q.; Chan, T.; Hilgraf, R.; Fokin, V.; Sharpless, K.; Finn, M., Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125 (11), 3192-3193.

134. Chan, T.; Hilgraf, R.; Sharpless, K.; Fokin, V., Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Organic Letters* 2004, 6 (17), 2853-2855.

135. Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H.; Williams, I.; Sharpless, K.; Fokin, V.; Jia, G., Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127 (46), 15998-15999.

136. McNulty, J.; Keskar, K.; Vemula, R., The First Well-Defined Silver(I)-Complex-Catalyzed Cycloaddition of Azides onto Terminal Alkynes at Room Temperature. *Chemistry-a European Journal* 2011, 17 (52), 14727-14730.

137. El-Sagheer, A.; Brown, T., Click chemistry with DNA. *Chemical Society Reviews* 2010, 39 (4), 1388-1405.

138. Kolb, H.; Sharpless, K., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* 2003, 8 (24), 1128-1137.

139. Rozkiewicz, D.; Gierlich, J.; Burley, G.; Gutsmedl, K.; Carell, T.; Ravoo, B.; Reinhoudt, D., Transfer printing of DNA by "Click" chemistry. *Chembiochem* 2007, 8 (16), 1997-2002.

140. Fischler, M.; Sologubenko, A.; Mayer, J.; Clever, G.; Burley, G.; Gierlich, J.; Carell, T.; Simon, U., Chain-like assembly of gold nanoparticles on artificial DNA templates via 'click chemistry'. *Chemical Communications* 2008, (2), 169-171.
141. Isobe, H.; Fujino, T.; Yamazaki, N.; Guillot-Nieckowski, M.; Nakamura, E., Triazole-linked analogue of deoxyribonucleic acid ((TL)DNA): Design, synthesis, and double-strand formation with natural DNA. *Organic Letters* 2008, 10 (17), 3729-3732.
142. Seela, F.; Sirivolu, V., Pyrrolo-dc oligonucleotides bearing alkynyl side chains with terminal triple bonds: synthesis, base pairing and fluorescent dye conjugates prepared by the azide-alkyne "click" reaction. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2008, 6 (9), 1674-1687.
143. Vasilyeva, S.; Budilkin, B.; Konevets, D.; Silnikov, V., Synthesis of novel nucleoside 5'-triphosphates and phosphoramidites containing alkyne or amino groups for the postsynthetic functionalization of nucleic acids. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 2011, 30 (10), 753-767.
144. Lee, L.; Mitchell, M.; Huang, S.; Fokin, V.; Sharpless, K.; Wong, C., A potent and highly selective inhibitor of human α -1,3-fucosyltransferase via click chemistry. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125 (32), 9588-9589.
145. Sears, P.; Wong, C., Enzyme action in glycoprotein synthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1998, 54 (3), 223-252.
146. Staudacher, E., α 1,3-fucosyltransferases. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 1996, 8 (44), 391-408.
147. El Akri, K.; Bougrin, K.; Balzarini, J.; Faraj, A.; Benhida, R., Efficient synthesis and in vitro cytostatic activity of 4-substituted triazolyl-nucleosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007, 17 (23), 6656-6659.
148. Petrie, C.; Revankar, G.; Dalley, N.; George, R.; Mckernan, P.; Hamill, R.; Robins, R., Synthesis and biological-activity of certain nucleoside and nucleotide derivatives of pyrazofurin. *Journal of Medicinal Chemistry* 1986, 29 (2), 268-278.
149. Krajczyk, A.; Kulinska, K.; Zeidler, J., Antivirally Active Ribavirin Analogues – 4,5-disubstituted 1,2,3-triazole Nucleosides: Biological Evaluation against Certain Respiratory Viruses and Computational Modelling. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*: 2014; pp 161–171.
150. Ostrowski, T.; Januszczak, P.; Cieslak, M.; Kazmierczak-Baranska, J.; Nawrot, B.; Bartoszak-Adamska, E.; Zeidler, J., 5-Ethynyl-1-beta-D-ribofuranosyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide (ETCAR) and its analogues: Synthesis and cytotoxic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011, 19 (14), 4386-4398.
151. Wilkinson, B.; Long, H.; Sim, E.; Fairbanks, A., Synthesis of Arabino glycosyl triazoles as potential inhibitors of mycobacterial cell wall biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008, 18 (23), 6265-6267.
152. Chaudhary, P.; Chavan, S.; Shirazi, F.; Razdan, M.; Nimkar, P.; Maybhate, S.; Likhite, A.; Gonnade, R.; Hazara, B.; Deshpande, M.; Deshpande, S., Exploration of click reaction for the synthesis of modified nucleosides as chitin synthase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009, 17 (6), 2433-2440.
153. Godeau, G.; Staedel, C.; Barthelemy, P., Lipid-conjugated oligonucleotides via "click chemistry" efficiently inhibit hepatitis C virus translation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008, 51 (15), 4374-4376.
154. Burley, G.; Gierlich, J.; Mofid, M.; Nir, H.; Tal, S.; Eichen, Y.; Carell, T., Directed DNA metallization. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128 (5), 1398-1399.
155. Seela, F.; Sirivolu, V., DNA containing side chains with terminal triple bonds: Base-pair stability and functionalization of alkynylated pyrimidines and 7-deazapurines. *Chemistry & Biodiversity* 2006, 3 (5), 509-514.

156. Seela, F.; Sirivolu, V., Nucleosides and oligonucleotides with diyne side chains: Base pairing and functionalization of 2'-deoxyuridine derivatives by the copper(I)-catalyzed alkyne-azide 'click' cycloaddition. *Helvetica Chimica Acta* 2007, 90 (3), 535-552.
157. Schulz, D.; Holstein, J.; Rentmeister, A., A Chemo-Enzymatic Approach for Site-Specific Modification of the RNA Cap. *Angewandte Chemie-International Edition* 2013, 52 (30), 7874-7878.
158. Gramlich, P.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T., Click-click-click: Single to triple modification of DNA. *Angewandte Chemie-International Edition* 2008, 47 (18), 3442-3444.
159. Ghosh, A.; Lima, C., Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* 2010, 1 (1), 152-172.
160. Roje, S., S-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 2006, 67 (15), 1686-1698.
161. Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T., A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides. *Tetrahedron Letters* 1967, (50), 5065-+.
162. Arabshahi, A.; Frey, P., A simplified procedure for synthesizing nucleoside 1-thiotriphosphates - dATP(alpha)s, dGTP(alpha)s, UTP-alpha-s, and dTTP (alpha)s. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994, 204 (1), 150-155.
163. Kalek, M.; Jemielity, J.; Stepinski, J.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E., A direct method for the synthesis of nucleoside 5'-methylenebis(phosphonate)s from nucleosides. *Tetrahedron Letters* 2005, 46 (14), 2417-2421.
164. Jenö, T.; Morteza M, V.; Ratsep, P.; Willis, R., C.; Robins, R., K, Nucleoside imidodiphosphates synthesis and biological activities. *Nucleic Acids Research*: 1988; Vol. 16, pp 8645–8664.
165. Moffatt, J.; Khorana, H., Nucleoside polyphosphates .10. Synthesis and some reactions of nucleoside-5' phosphoromorpholidates and related compounds - improved methods for preparation of nucleoside-5' polyphosphates. *Journal of the American Chemical Society* 1961, 83 (3), 649-&.
166. Mishra, N.; Broom, A., A novel synthesis of nucleoside 5'-triphosphates. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 1991, (18), 1276-1277.
167. Mukaiyama, T.; Hashimoto, M., Phosphorylation of alcohols and phosphates by oxidation-reduction condensation. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1971, 44 (1), 196-+.
168. Hoard, D.; Ott, D., Conversion of mono- and oligodeoxyribonucleotides to 5'-triphosphates. *Journal of the American Chemical Society* 1965, 87 (8), 1785-&.
169. Tanaka, H.; Yoshimura, Y.; Jorgensen, M.; Cuesta-Seijo, J.; Hindsgaul, O., A Simple Synthesis of Sugar Nucleoside Diphosphates by Chemical Coupling in Water. *Angewandte Chemie-International Edition* 2012, 51 (46), 11531-11534.
170. HIGHSmith, S.; Kubinec, M.; Jaiswal, D.; Morimoto, H.; Williams, P.; Wemmer, D., [2-H-3]ATP synthesis and h-3 nmr-spectroscopy of enzyme-nucleotide complexes - ADP AND ADP.VI bound to myosin subfragment-1. *Journal of Biomolecular Nmr* 1993, 3 (3), 325-334.
171. Allen, K.; Dunaway-Mariano, D., Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trends in Biochemical Sciences* 2004, 29 (9), 495-503.
172. Duarte, F.; Barrozo, A.; Aqvist, J.; Williams, N.; Kamerlin, S., The Competing Mechanisms of Phosphate Monoester Dianion Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* 2016, 138 (33), 10664-10673.
173. Kadokura, M.; Wada, T.; Urashima, C.; Sekine, M., Efficient synthesis of gamma-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 ZnCl_2 as a catalyst in DMF under anhydrous conditions. *Tetrahedron Letters* 1997, 38 (48), 8359-8362.

174. Strenkowska, M.; Wanat, P.; Ziemniak, M.; Jemielity, J.; Kowalska, J., Preparation of Synthetically Challenging Nucleotides Using Cyanoethyl P-Imidazolides and Microwaves. *Organic Letters* 2012, 14 (18), 4782-4785.

175. Kowalska, J.; Wypijewska del Nogal, A.; Darzynkiewicz, Z.; Buck, J.; Nicola, C.; Kuhn, A.; Lukaszewicz, M.; Zuberek, J.; Strenkowska, M.; Ziemniak, M.; Maciejczyk, M.; Bojarska, E.; Rhoads, R.; Darzynkiewicz, E.; Sahin, U.; Jemielity, J., Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes. *Nucleic Acids Research* 2014, 42 (16), 10245-10264.

176. Strenkowska, M.; Grzela, R.; Majewski, M.; Wnek, K.; Kowalska, J.; Lukaszewicz, M.; Zuberek, J.; Darzynkiewicz, E.; Kuhn, A.; Sahin, U.; Jemielity, J., Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Research* 2016, 44 (20), 9578-9590.

177. Jemielity, J.; Fowler, T.; Zuberek, J.; Stepinski, J.; Lewdorowicz, M.; Niedzwiecka, A.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R., Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties. *Rna* 2003, 9 (9), 1108-1122.

178. Guranowski, A.; Wojdyla, A.; Rydzik, A.; Stepinski, J.; Jemielity, J., Plant nucleoside 5'-phosphoramidate hydrolase; simple purification from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds and properties of homogeneous enzyme. *Acta Biochimica Polonica* 2011, 58 (1), 131-136.

179. Baranowski, M.; Nowicka, A.; Rydzik, A.; Warminski, M.; Kasprzyk, R.; Wojtczak, B.; Wojcik, J.; Claridge, T.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Synthesis of Fluorophosphate Nucleotide Analogues and Their Characterization as Tools for ^{19}F NMR Studies. *Journal of Organic Chemistry* 2015, 80 (8), 3982-3997.

180. Kowalska, J.; Osowniak, A.; Zuberek, J.; Jemielity, J., Synthesis of nucleoside phosphosulfates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012, 22 (11), 3661-3664.

181. Cline, G.; Hanna, S., The aminolysis of n-hydroxysuccinimide esters - a structure reactivity study. *Journal of the American Chemical Society* 1987, 109 (10), 3087-3091.

182. Xiao, S.; Brunner, S.; Wieland, M., Reactions of surface amines with heterobifunctional cross-linkers bearing both succinimidyl ester and maleimide for grafting biomolecules. *Journal of Physical Chemistry B* 2004, 108 (42), 16508-16517.

183. Zhu, J.; Yudasaka, M.; Zhang, M.; Kasuya, D.; Iijima, S., Surface modification approach to the patterned assembly of single-walled carbon nanomaterials. *Nano Letters* 2003, 3 (9), 1239-1243.

184. Boucher, J.; Simard, E.; Froehlich, U.; D'Orleans-Juste, P.; Grandbois, M., Using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester to monitor intracellular protein glycation. *Analytical Biochemistry* 2015, 478, 73-81.

185. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D., New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* 1989, 30 (15), 1927-1930.

186. 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 Journal of Organic Chemistry* 2015, (28), 6153-6169.

187. Bryant, F.; Benkovic, S., Stereochemical course of the reaction catalyzed by 5'-nucleotide phosphodiesterase from snake-venom. *Biochemistry* 1979, 18 (13), 2825-2828.

188. Sillero, M.; Madrid, O.; Zaera, E.; Sillero, A., 2',3'-Dideoxynucleoside triphosphates (ddNTP) and di-2',3'-dideoxynucleoside tetraphosphates (ddnp(4)ddn) behave differently to the corresponding

NTP and Np4N counterparts as substrates of firefly luciferase, dinucleoside tetraphosphatase and phosphodiesterases. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1997, 1334 (2-3), 191-199.

189. Philipps, G., Purification and characterization of phosphodiesterase from crotalus venom. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 1975, 356 (7), 1085-1096.

190. Kisielewski, A.; Xiao, G.; Liu, S.; Klein-Szanto, A.; Novara, M.; Sina, J.; Bleicher, K.; Yeung, R.; Goodrow, T., Analysis of the FHIT gene and its product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncogene* 1998, 17 (1), 83-91.

191. Waters, C.; Saldivar, J.; Hosseini, S.; Huebner, K., The FHIT gene product: tumor suppressor and genome "caretaker". *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014, 71 (23), 4577-4587.

192. Baffa, R.; Veronese, M.; Santoro, R.; Mandes, B.; Palazzo, J.; Rugge, M.; Santoro, E.; Croce, C.; Huebner, K., Loss of FHIT expression in gastric carcinoma. *Cancer Research* 1998, 58 (20), 4708-4714.

193. Bianchi, F.; Tagliabue, E.; Menard, S.; Campiglio, M., Fhit expression protects against HER2-driven breast tumor development - Unraveling the molecular interconnections. *Cell Cycle* 2007, 6 (6), 643-646.

194. Virgilio, L.; Shuster, M.; Gollin, S.; Veronese, M.; Ohta, M.; Huebner, K.; Croce, C., FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93 (18), 9770-9775.

195. Ji, L.; Fang, B.; Yen, N.; Fong, K.; Minna, J.; Roth, J., Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Research* 1999, 59 (14), 3333-3339.

196. Barnes, L.; Garrison, P.; Siprashvili, Z.; Guranowski, A.; Robinson, A.; Ingram, S.; Croce, C.; Ohta, M.; Huebner, F., Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P-1,P-3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 1996, 35 (36), 11529-11535.

197. Kisselev, L.; Justesen, J.; Wolfson, A.; Frolova, L., Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules? *Febs Letters* 1998, 427 (2), 157-163.

198. Hacker, S.; Mortensen, F.; Scheffner, M.; Marx, A., Selective Monitoring of the Enzymatic Activity of the Tumor Suppressor Fhit. *Angewandte Chemie-International Edition* 2014, 53 (38), 10247-10250.

199. Guranowski, A.; Wojdyla, A.; Pietrowska-Borek, M.; Bieganski, P.; Khurs, E.; Cliff, M.; Blackburn, G.; Blaziak, D.; Stec, W., Fhit proteins can also recognize substrates other than dinucleoside polyphosphates. *Febs Letters* 2008, 582 (20), 3152-3158.

200. Pace, H.; Garrison, P.; Robinson, A.; Barnes, L.; Draganescu, A.; Rosler, A.; Blackburn, G.; Siprashvili, Z.; Croce, C.; Huebner, K.; Brenner, C., Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of Fhit-substrate complexes as the active signaling form of Fhit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95 (10), 5484-5489.

201. Wanat, P., Synteza i badanie właściwości C-fosfonianowych i amidofosforanowych pochodnych nukleotydów zawierających grupę alkinową w terminalnej pozycji łańcucha fosforanowego jako substratów do reakcji cykloaddycji azydowo-alkinowej. Warszawa, 2014.

202. Chen, N.; Walsh, M.; Liu, Y.; Parker, R.; Song, H., Crystal structures of human dcps in ligand-free and m(7) GDP-bound forms suggest a dynamic mechanism for scavenger mRNA decapping. *Journal of Molecular Biology* 2005, 347 (4), 707-718.

203. Walczak, S.; Nowicka, A.; Kubacka, D.; Fac, K.; Wanat, P.; Mroczek, S.; Kowalska, J.; Jemielity, J., A novel route for preparing 5' cap mimics and capped RNAs: phosphate-modified cap analogues obtained via click chemistry. *Chemical Science* 2017, 8 (1), 260-267.

204. Walczak, S.; Sikorski, P.; Kasprzyk, R.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Exploring the potential of phosphotriazole 5' mRNA cap analogues as efficient translation initiators. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2018, 16 (36), 6741-6748.
205. Kozarski, M.; Kubacka, D.; Baranowski, M.; Strzelecka, D.; Wojtczak, A.; Doniek, K.; Jemielity, J.; Kowalska, J., 7-methylguanosine 5'-monophosphate analogues as molecular tools to investigate the role of human cytosolic 5' nucleotidase IIIb (cniib). *European Biophysics Journal With Biophysics Letters* 2019, 48, S144-S144.
206. Kasprzyk, R.; Starek, B.; Ciechanowicz, S.; Kubacka, D.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Fluorescent Turn-On Probes for the Development of Binding and Hydrolytic Activity Assays for mRNA Cap-Recognizing Proteins. *Chemistry-a European Journal* 2019, 25 (27), 6728-6740.
207. Strzelecka, D.; Chmielinski, S.; Bednarek, S.; Jemielity, J.; Kowalska, J., Analysis of mononucleotides by tandem mass spectrometry: investigation of fragmentation pathways for phosphate- and ribose-modified nucleotide analogues. *Scientific Reports* 2017, 7.
208. Baranowski, M.; Nowicka, A.; Jemielity, J.; Kowalska, J., A fluorescent HTS assay for phosphohydrolases based on nucleoside 5'-fluorophosphates: its application in screening for inhibitors of mRNA decapping scavenger and PDE-I. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2016, 14 (20), 4595-4604.
209. Carter-O'Connell, I.; Jin, H.; Morgan, R.; David, L.; Cohen, M., Engineering the Substrate Specificity of ADP-Ribosyltransferases for Identifying Direct Protein Targets. *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136 (14), 5201-5204.