Uniwersytet Warszawski
Wydział Fizyki



Renata Kasprzyk

Nr albumu: 307495

Metody badania białek związanych z metabolizmem końca 5’ mRNA oparte na nukleotydowych sondach molekularnych

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
prof dr hab. Jacka Jemielitego
Uniwersytet Warszawski, Centrum Nowych Technologii
oraz
prof. dr hab. Andrzeja Wysmołka
Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki, Zakład Fizyki Ciała Stałego

Warszawa 2021

Badania zrealizowano w ramach projektu Diamentowy Grant, finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (DI2013 016143), projektu PRELUDIUM 12, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (2016/23/N/ST4/03169) oraz stypendiów ETIUDA 7, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (2019/32/T/ST4/00091) i START 2020, finansowanego ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Promotorowi prof. dr hab. Jackowi Jemielitemu za umożliwienie realizacji badań w jego zespole, przekazaną wiedzę, cierpliwość oraz wsparcie sprawach merytorycznych i formalnych;

Promotorowi prof. dr hab. Andrzejowi Wysmołkowi za umożliwienie realizacji badań w jego zespole, pomoc w zaplanowaniu badań oraz interpretacji wyników;

dr hab. Joannie Kowalskiej za pomoc merytoryczną w planowaniu eksperymentów oraz analizie wyników, przekazaną wiedzę i doświadczenie;

dr Markusowi Pietschowi i dr Christopherowi Hauserowi za możliwość odbycia stażu w laboratorium Centrum Farmakologii Uniwersytetu w Kolonii, przekazaną wiedzę oraz pracę w miłej atmosferze;

dr Johannesowi Binderowi za pomoc w wykonaniu analizy modyfikowanych warstw grafenowych;

prof. dr hab. Romanowi Stępniewskiemu za wykonanie analizy PCA modyfikowanych warstw grafenowych;

dr Igorowi Własnemu za wykonanie pomiarów XPS modyfikowanych warstw grafenowych;

mgr Piotrowi Kazimierczakowi i mgr Krystianowi Ubychowi za pomoc w zapoznaniu się z pomiarami oraz analizą map ramanowskich;

mgr Przemysławowi Wanatowi za dostarczenie związków do badań oraz cenne wskazówki w zakresie syntezy organicznej;

mgr Michałowi Kopciałowi, mgr Adamowi Mamotowi, dr Sylwii Ciechanowicz, dr Natalii Kleczewskiej oraz Sebastianowi Gołojuchowi za dostarczenie związków do badań biofizycznych;

dr Dorocie Kubackiej, mgr Katarzynie Mokrzewskiej i dr Mirosławowi Śmietańskiemu za otrzymanie białek eIF4E, DcpS i Ecm1 stosowanych w badaniach;

mgr Karolinie Kaczmarskiej za otrzymanie lizatów komórkowych stosowanych w badaniach;

dr inż. Mikołajowi Chromińskiemu za sprawdzenie tekstu rozprawy doktorskiej;

prof. Victorii Cowling za udostępnienie ludzkiej N7–metylotransferazy RNMT-RAM;

mgr Markowi Baranowskimu za wykonanie widm NMR;

Moim podopiecznym studentom Jagodzie Starek i Mateuszowi Fido za zaangażowanie oraz wsparcie w prowadzonych badaniach;

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

Paulince i Lunie za wsparcie.

SPIS TREŚCI

I. Cel pracy 15

II. Przegląd literaturowy 19

II.1. Wstęp 19

II.2. Znaczenie biologiczne końca 5'mRNA 19

II.2.1. Struktura i właściwości końca 5' mRNA 19

II.2.2. Biosynteza kapu 23

II.2.3. Dojrzewanie mRNA 27

II.2.4. Transport do cytoplazmy 29

II.2.5. Inicjacja translacji 30

II.2.6. Degradacja mRNA 33

II.3. Białka związane z metabolizmem końca 5' mRNA 35

II.3.1. eIF4E 35

II.3.2. DcpS 39

II.3.3. mRNA kap N7–guanino metylotransferaza 44

II.4. Transglutaminaza II – białko wiążące nukleotydy guanozynowe 48

II.5. Terapeutyczne zastosowania analogów kapu 50

II.5.1. Małocząsteczkowe analogi kapu 50

II.5.2. Wpływ modyfikacji chemicznych kapu na właściwości mRNA 54

II.6. Narzędzia do badań oddziaływań białko–ligand 55

II.6.1. Sondy molekularne 56

II.6.2. Rodzaje reakcji bioortogonalnych 58

II.6.3. Znakowanie fluorescencyjne 60

III.6.3.1. Ekscymery 64

III.6.3.2. FRET 67

III.6.3.3. Fluorofor–wygaszacz 70

II.6.4. Koniugaty molekuł biologicznych z nanomateriałami 73

III. Metodyka badań 76

III.1. Metody spektroskopowe w charakterystyce fluorescencyjnych nukleotydów 76

III.1.1. Intensywność fluorescencji (FLINT) 76

III.1.2. Polaryzacja fluorescencji (FP) 78

III.1.3. Termoforeza mikroskalowa (MST) 80

III.1.4. Metody HTS 82

III.2. Metody spektroskopowe w charakterystyce koniugatów nukleotydów z nanomateriałami 83

III.2.1. Spektroskopia FTIR 83

III.2.2. Spektroskopia ramanowska 86

III.2.3. Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS) 88

IV. Badania własne 90

IV.1. Motywacja pracy 90

IV.2. Plan badań **92**
IV.3. Synteza fluorescencyjnych nukleotydów **95**
IV.3.1. Synteza analogów m^7GTP do badań białka eIF4E – seria A 96
IV.3.2. Synteza analogów m^7GTP do badań białka DcpS – Seria B 98
IV.3.3. Synteza analogów Gp_3A do badań białka N7–MTazy – Seria C 102
IV.3.4. Synteza analogów GTP do badań białka TG2 – Seria D 105
IV.4. Metoda fluorescencyjna do badań tworzenia kompleksu nukleotyd-eIF4E (PyFLINT-B) **108**
IV.4.1. Charakterystyka spektroskopowa – Seria A 108
IV.4.2. Optymalizacja struktury sondy – wyznaczanie K_D kompleksu nukleotyd-eIF4E 111
IV.4.3. Wyznaczanie K_D serii niefluoryzujących nukleotydów 113
IV.4.4. Walidacja metody 117
IV.4.5. Wyznaczanie K_D biblioteki analogów kapu modyfikowanych triazolem 117
IV.4.6. Zastosowanie metody PyFLINT-B do rutynowych pomiarów powinowactwa nukleotydów do eIF4E 120
IV.4.7. Podsumowanie 127
IV.5. Metoda fluorescencyjna do monitorowania degradacji kapu przez DcpS (PyFLINT-HA) **129**
IV.5.1. Optymalizacja struktury sondy w oparciu o czułość sygnału 129
IV.5.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji degradacji sondy przez DcpS 131
IV.5.3. Walidacja metody 132
IV.5.4. Wyznaczanie IC_{50} i K_I serii inhibitorów DcpS 133
IV.5.5. Monitorowanie degradacji sondy w ekstraktach komórkowych 136
IV.5.6. Zastosowanie metody do rutynowych pomiarów inhibicji DcpS 137
IV.5.7. Podsumowanie 137
IV.6. Metoda fluorescencyjna do badań tworzenia kompleksu nukleotyd-DcpS (PyFLINT-B) **138**
IV.6.1. Charakterystyka spektroskopowa – Seria B 139
IV.6.2. Optymalizacja struktury sondy – wyznaczanie K_D kompleksu nukleotyd-DcpS 140
IV.6.3. Walidacja metody 143
IV.6.4. Wyznaczanie K_D serii niefluoryzujących nukleotydów 144
IV.6.5. Podsumowanie 146
IV.7. Metoda fluorescencyjna do monitorowania aktywności N7–MTazy (PyFLINT-M) **147**
IV.7.1. Charakterystyka spektroskopowa (Seria C) i optymalizacja struktury sondy w oparciu o czułość sygnału 149
IV.7.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji N7–metylacji sondy przez białka Ecm1 i RNMT-RAM 152
IV.7.3. Walidacja metody 153
IV.7.4. Wyznaczanie IC_{50} serii analogów Gp_3A 154
IV.7.5. Screening biblioteki farmakologicznie czynnych związków LOPAC®1280 158
IV.7.6. Wyznaczanie IC_{50} inhibitorów wyselekcjonowanych z biblioteki LOPAC®1280 159
IV.7.7. Charakterystyka modelowej N7–MTazy wirusowej – VCE 163
IV.7.8. Odporna na hydrolizę sonda do badań N7–metylotransferaz 165
IV.7.9. Podsumowanie 168
IV.8. Metoda fluorescencyjna do badań tworzenia kompleksu nukleotyd-TG2 ..... **171**

IV.8.1. Charakterystyka spektroskopowa – Seria D 172
IV.8.2. Optymalizacja struktury sondy – wyznaczanie K_D kompleksu nukleotyd-TG2 173
IV.8.3. Walidacja metody 175
IV.8.4. Wyznaczanie K_D serii niefluoryzujących nukleotydów 176
IV.8.6. Podsumowanie 180
IV.9. Znakowane nukleotydy w pomiarach MST 181
IV.10. Podwójnie znakowane analogi nukleotydów 184
IV.10.1. Sondy ekscymerowe 185
IV.10.2. Sondy FRET i wygaszeniowe 193
IV.11. Modyfikacja podłoży grafenowych 200
IV.11.1. Charakterystyka monowarstwy grafenu odłożonej na SiC 201
IV.11.2. Utlenianie monowarstwy grafenu 204
IV.11.3. Modyfikacje monowarstwy grafenu grupą azydkową 210
IV.11.4. Podsumowanie 211
IV.12. Synteza koniugatów grafenu z nukleotydami 212
IV.12.1. Synteza tlenku grafenu (GO) 213
IV.12.2. Synteza GO modyfikowanego grupą alkinową (GO-alkynyl), azydkową wewnątrz (GO-N_3) oraz na krawędzi (GOpN_3) 214
IV.12.3. Przyłączenie nukleotydu w reakcji CuAAC 218
IV.12.4. Podsumowanie 220
V. Podsumowanie 221
VI. Część eksperymentalna 224
VI.1. Synteza modyfikowanych nukleotydów 224
VI.1.1. Informacje ogólne 224
VI.1.2. Podstawowe syntezy 224
VI.1.2.1. Wymiana soli 224
VI.1.2.2. Tiofosforylacja 225
VI.1.2.3. Synteza metylenobisfosfonianu guanozyny 225
VI.1.2.4. Synteza imidodifosforanu guanozyny 226
VI.1.2.5. Synteza *P*-imidazolidów 226
VI.1.2.6. Wydłużanie łańcucha fosforanowego i synteza dinukleotydów 226
VI.1.2.7. Synteza analogów kapu – selektywne metylowanie pozycji N7 227
VI.1.3. Analogi nukleotydów modyfikowane grupą alkinową 228
VI.1.3.1. Pentafosforan ε-*C*-(3-butynylo) guanozyny w postaci soli amonowej ($Gp_5C_4H_5$) 228
VI.1.3.2. Tetrafosforan δ-*C*-(3-butynylo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7Gp_4C_4H_5$; **A3**) 229
VI.1.3.3. Pentafosforan ε-*C*-(3-butynylo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7Gp_5C_4H_5$; **A4**) 229
VI.1.3.4. Trifosforan γ-*C*-(3-butynylo) α-β-metyleno guanozyny w postaci soli trietyloamoniowej ($GpCH_2ppC_4H_5$) 229
VI.1.3.5. Trifosforan γ-*C*-(3-butynylo) α-β-metyleno N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpCH_2ppC_4H_5$; **B1**) 230

VI.1.3.6. Trifosforan γ-*O*-(2-propargilo) α-β-metyleno N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpCH_2ppOC_3H_3$; **B2**) 230
VI.1.3.7. Trifosforan γ-*O*-(2-propargilo) α-β-imido N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpNHppOC_3H_3$; **B3**) 230
VI.1.3.8. α-*S*-tritiofosforan γ-*O*-(2-propargilo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7Gp_SppOC_3H_3$ D1; **B4**), α-*R*-tritiofosforan γ-*O*-(2-propargilo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7Gp_SppOC_3H_3$ D2; **B5**) 231
VI.1.3.9. Trifosforan P^1-5'-guanozyno-P^3-5'-(N-propargilo-3')- karbamoiloadenozyny w postaci soli amonowej (Gp_3A-3'-*O*-cp; **C1**) 231
VI.1.3.10. Trifosforan P^1-5'-(7-metylo)guanozyno-P^3-5'-(N-propargilo-3')-karbamoiloadenozyny w postaci soli amonowej (m^7Gp_3A-3'-*O*-cp; **C2**) 232
VI.1.3.11. Trifosforan P^1-5'-((N-propargilo)-2'(3')-karbamoilo)guanozyno-P^3-5'-adenozyny w postaci soli amonowej (2'-*O*/3'-*O*-cp-Gp_3A; **C3**) 232
VI.1.3.12. Trifosforan P^1-5'-guanozyno-P^3-5'-N6-propargiloadenozyny w postaci soli amonowej (Gp_3A(N6)prop; **C4**) 233
VI.1.3.13. Trifosforan P^1-5'-(β-γ-metyleno)guanozyno-P^3-5'-(N-propargilo-3')-P^3-5'-adenozyny w postaci soli amonowej ($GpCH_2ppA$-3'-*O*-cp; **C6**) 233
VI.1.3.14. Trifosforan (2-etynylo) α-β-metyleno guanozyny w postaci soli amonowej ($GpCH_2ppC_2H$; **D7**) 233
VI.1.3.15. α-*S*-tritiofosforan γ-*O*-(2-etynylo) metyloguanozyny w postaci soli amonowej (Gp_SppC_2H D1; **D8**) 234
VI.1.3.16. α-*R*-tritiofosforan γ-*O*-(2-etynylo) metyloguanozyny w postaci soli amonowej (Gp_SppC_2H D2; **D9**) 234
VI.1.3.17. Trifosforan γ-*O*-(3-propargilo) guanozyny w postaci soli trietyloamoniowej ($GTPOC_3H_3$) 234
VI.1.3.18. Trifosforan γ-*O*-(3-propargilo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GTPOC_3H_3$) 235
VI.1.4. Fluorescencyjnie znakowane nukleotydy 235
VI.1.4.1. $m^7Gp_2C_4Py$ (**A1-1**) 235
VI.1.4.2. $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) 235
VI.1.4.3. $m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**) 235
VI.1.4.4. $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**) 236
VI.1.4.5. $m^7Gp_3C_4PEP$ (**A2-2**) 236
VI.1.4.6. $m^7Gp_3C_4$BDP-FL (**A2-3**) 236
VI.1.4.7. $m^7Gp_3C_4$(6)FAM2 (**A2-4**) 237
VI.1.4.8. $m^7Gp_3C_4$Cy3 (**A2-5**) 237
VI.1.4.9. $m^7Gp_3C_4$Cy5 (**A2-6**) 237
VI.1.4.10. $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2 238
VI.1.4.11. $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2 238
VI.1.4.12. $m^7GpCH_2ppC_4Py$ (**B1-1**) 239
VI.1.4.13. $m^7GpCH_2ppOC_3Py$ (**B2-1**) 239
VI.1.4.14. $m^7GpNHppOC_3Py$ (**B3-1**) 239
VI.1.4.15. $m^7Gp_SppOC_3Py$ D1 (**B4-1**) 240
VI.1.4.16. $m^7Gp_SppOC_3Py$ D2 (**B5-1**) 240
VI.1.4.17. $GTPC_4Py$ 240

VI.1.4.18. $CTPC_4Py$ ... 241
VI.1.4.19. $ATPC_4Py$ ... 241
VI.1.4.20. pC_4Py ... 241
VI.1.4.21. Gp_3A-3'*O*-Py (**C1-1**) ... 242
VI.1.4.22. Gp_3A-3'*O*-Py3 (**C1-2**) ... 242
VI.1.4.23. Gp_3A-3'*O*-Pe (**C1-3**) ... 242
VI.1.4.24. Gp_3A-3'*O*-BDP-FL (**C1-4**) ... 243
VI.1.4.25. Gp_3A-3'*O*-(5)FAM2 (**C1-5**) ... 243
VI.1.4.26. Gp_3A-3'*O*-Cy3 (**C1-6**) ... 243
VI.1.4.27. Gp_3A-3'*O*-Cy5 (**C1-7**) ... 244
VI.1.4.28. m^7Gp_3A-3'*O*-Py (**C2-1**) ... 244
VI.1.4.29. m^7Gp_3A-3'*O*-Py3 (**C2-2**) ... 244
VI.1.4.30. 2'-*O*/3'-*O*-Py-Gp_3A (**C3-1**) ... 245
VI.1.4.31. Gp_3A(N6)-Py (**C4-1**) ... 245
VI.1.4.32. Gp_3G(N1)-Py (**C5-1**) ... 245
VI.1.4.33. $GpCH_2ppA$-3'-*O*-Py3 (**C6-1**) ... 246
VI.1.4.34. GTP_γSBDP-FL (**D1-1**) ... 246
VI.1.4.35. m^7GTP_γSBDP-FL (**D2-1**) ... 246
VI.1.4.36. Gp_2C_2(5)FAM2 (**D3-1**) ... 246
VI.1.4.37. Gp_2C_4(5)FAM2 (**D4-1**) ... 247
VI.1.4.38. Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**) ... 247
VI.1.4.39. Gp_3C_2(5)FAM4 (**D5-2**) ... 247
VI.1.4.40. Gp_3C_2(5)FAM6 (**D5-3**) ... 248
VI.1.4.41. Gp_3C_2(6)FAM6 (**D5-4**) ... 248
VI.1.4.42. Gp_3C_4(5)FAM2 (**D6-1**) ... 248
VI.1.4.43. $GpCH_2ppC_2$(5)FAM2 (**D7-1**) ... 249
VI.1.4.44. Gp_SppC_2(5)FAM2 D1 (**D8-1**) ... 249
VI.1.4.45. Gp_SppC_2(5)FAM2 D2 (**D9-1**) ... 249
VI.1.5. Znaczniki fluorescencyjne ... 250
VI.1.5.1. (5)FAM4-N_3 ... 250
VI.1.5.2. (5)FAM6-N_3 i (6)FAM6-N_3 ... 250
VI.2. Synteza modyfikowanych nanomateriałów ... 251
VI.2.1. Synteza tlenku grafenu (GO) ... 251
VI.2.2. Synteza GO modyfikowanego grupą alkinową(GO-alkynyl) ... 251
VI.2.3. Synteza GO modyfikowanego grupą azydkową (GO-N_3) ... 251
VI.2.4. Synteza GO modyfikowanego grupą azydkową na brzegach płatków ($GOpN_3$) ... 251
VI.2.5. Synteza koniugatu GO z m^7GTP ... 251
VI.2.6. Synteza koniugatu GO z GTP ... 251
VI.3. Materiały biologiczne ... 252
VI.3.1. eIF4E ... 252
VI.3.2. DcpS ... 252

VI.3.3. PDE-I 252
VI.3.4. Ecm1 252
VI.3.5. RNMT-RAM 253
VI.3.6. VCE 253
VI.3.7. TG2 253
VI.3.8. Lizaty komórkowe 254
VI.4. Pomiary spektroskopowe 254
VI.4.1. UV-Vis 254
VI.4.2. Czytnik płytek – pomiary FLINT 255
VI.4.3. Czytnik płytek – pomiary FA 257
VI.4.4. MST 257
VI.4.5. FTIR 258
VI.4.6. Spektroskopia ramanowska 258
VI.5. Wyznaczanie parametrów biofizycznych 258
VI.5.1. Wiązanie bezpośrednie (K_D) 258
VI.5.2. Wiązanie kompetycyjne (IC_{50}, K_D) 259
VI.5.3. Kinetyka enzymatyczna 260
VI.5.4. Inhibicja (IC_{50}, K_I) 260
VI.5.5. Parametr *z* 261
VI.5.6. Korekcja anizotropii 261
VII. Bibliografia 262

WYKAZ SKRÓTÓW

ARCA – ang. *Anti-reverse cap analog* **–** analog kapu zawierający grupę 3'-*O*-CH_3 w rybozie 7-metyloguanozyny

BSA – ang. *Bovine Serum Albumin* **–** albumina surowicy wołowej

Brij 35 – ang. *polyoxyethylene lauryl ether* **–** eter laurylowy polioksyetylenu

COSY – ang. *correlation spectroscopy* **–** spektroskopia korelacyjna

CuAAC – ang. *Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition* **–** katalizowana jonami miedzi (I) cykloaddycja azydkowo-alkinowa

DBU – 1,8-Diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en

DCC – ang. *N,N'-dicycloheksylcarbodiimide* **–** N,N'-dicykloheksylokarbodiimid

DcpS – ang. *Decapping Scavenger* – enzym degradacji kapu

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

DMEM – ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – zmodyfikowane podłoże Eagle Dulbecco

DMF – ang. *dimethylformamide* **–** dimetyloformamid

DMSO – ang. *dimethyl sulfoxide* **–** dimetylosulfotlenek

DTT – ang. *dithiothreitol* **–** ditiotreitol

Ecm1 – ang. *Encephalitozoon cuniculi methyltransferase* – RNA kap N7–guanine metylotransferaza z *Encephalitozoon cuniculi*

EDC – ang. *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide* **–** 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo) karbodiimid

EDTA – ang. *ethylenediaminetetraacetic acid* **–** kwas wersenowy

EGTA – ang. *ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* – kwas egtazowy

eIF4E – ang. *eukaryotic initiation translation factor 4E* – eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E

FLINT – ang. *fluorescence intensity* **–** intensywność fluorescencji

FP – ang. *fluorescence polarization* **–** polaryzacja fluorescencji

FRET – ang. *Förster Resonance Energy Transfer* **–** rezonansowy transfer energii Förstera

FTIR – ang. *Fourier Transform Infrared* **–** spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

HEPES – ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* **–** kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy

IPTG – ang. *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* **–** izopropylo-β-D-1-tiogalaktopiranozyd

mRNA – ang. *messenger RNA* – informacyjny RNA

MOPS – ang. *(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid* **–** kwas (3- (N-morfolino) propanosulfonowy

MST – ang. *microscale thermophoresis* **–** termoforeza mikroskalowa

N7–MTaza – ang. *mRNA cap N7–guanine methyltransferase* – mRNA kap N7–guanino metylotransferaza

NHS – ang. *N-Hydroxysuccinimide* –N-hydroksyimid kwasu bursztynowego

NMR – ang. *Nuclear Magnetic Resonance* **–** spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

PCA – ang. *Principal component analysis* – analiza głównych składowych

PyFLINT-A – ang. *pyrene-based fluorescence intensity activity assay*

PyFLINT-B – ang. *pyrene-based fluorescence intensity binding assay*

PyFLINT-M – ang. *pyrene-based fluorescence intensity methylation assay*

QS – ang. *quinine sulfate* – siarczan chininy

RAM – ang. *RNMT-activating mini protein* **–** podjednostka aktywująca enzym RNMT

RNMT – ang. *human mRNA cap N7–guanine methyltransferase* **–** ludzka RNA kap N7–guanino metylotransferaza

RP-HPLC – ang. *reversed-phase high-performance liquid chromatography* **–** wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych

SAH – ang. *S-adenosyl-L-homocysteine* **–** S-adenozylo-L-homocysteina

SAM – ang. *S-adenosyl-L-methionine* **–** S-adenozylo-L-metionina

SD – ang. *standard deviation* **–** odchylenie standardowe

SEM – ang. *standard error of the mean* **–** błąd standardowy średniej

TBTA – tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)metylo)amina

TEA – ang. *triethyl amine* **–** trietyloamina

TEAB – ang. *triethylammonium bicarbonate* – roztwór wodny wodorowęglanu trietyloamoniowego

TLC – ang. *thin-layer chromatography* – cienkowarstwowa chromatografia cieczowa

TMP – ang. *trimethyl phosphate* – fosforan trimetylu

Tris – ang. *tris(hydroxymethyl)aminomethane* – tris(hydroksymetylo)aminometan

TSTU – ang. *N,N,N′,N′-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate* – tetrafluoroboran *N,N,N′,N′*-tetrametylo-*O*-(N-sukcynoimidylo) uronium

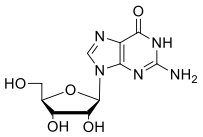
TG II – ang. *transglutaminase II* **–** transglutaminaza II

VCE – ang. *Vaccinia Capping Enzyme* **–** enzym kapujący z wirusa *Vaccinia*

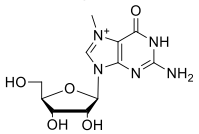
XPS – ang. *X-ray photoelectron spectroscopy* **–** spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X

ZAPIS STRUKTURY NUKLEOTYDOWEJ

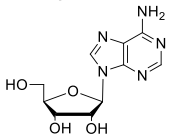
G – guanozyna



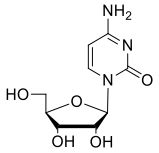
m^7G – 7-metyloguanozyna



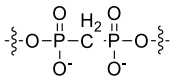
A – adenozyna



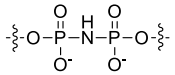
C – cytydyna



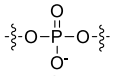
pCH_2p – grupa metylenobisfosfonianowa



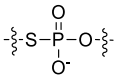
pNHp – grupa imidodifosforanowa



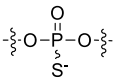
p – reszta fosforanowa



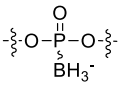
Sp – tiofosforan z siarką w pozycji 5’



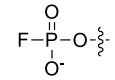
p_S – reszta tiofosforanowa



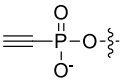
p_{BH_3} – reszta boranofosforanowa



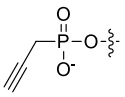
pF – reszta fluorosfosforanowa



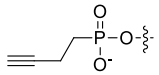
pC_2H – reszta etynylo-*C*-fosfonianowa



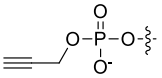
pC_3H_3 – reszta propynylo-*C*-fosfonianowa



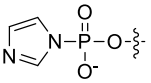
pC_4H_5 – reszta butynylo-*C*-fosfonianowa



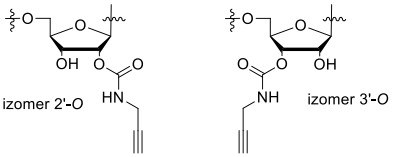
pOC_3H_3 – reszta propynylofosforanowa



p-Im – *P*-imidazolid



cp – grupa karbamoilowa



D1, D2 – diastereoizomery nukleotydów, zawierających modyfikację niemostkową, prowadzącą do powstania centrum chiralnego; numeracja w oparciu o czasy retencji RP HPLC; diastereoizomer D1 odpowiada konfiguracji S_p, a D2 konfiguracji R_p.[1]

I. Cel pracy

Celem projektu doktorskiego jest opracowanie nukleotydowych narzędzi służących do badań interakcji końca 5’ mRNA z wybranymi białkami, istotnymi z terapeutycznego punktu widzenia. Koniec 5’ mRNA (tzw. kap) jest nietypową strukturą nukleotydową zbudowaną z 7-metyloguanozyny, połączonej mostkiem 5’-5’ trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem. Ze względu na obecność ładunku dodatniego w pierścieniu 7-metyloguanozyny kap specyficznie oddziałuje z białkami, biorącymi udział w istotnych procesach biologicznych, takich jak dojrzewanie mRNA, transport nukleocytoplazmatyczny, inicjacja translacji, czy stabilność transkryptu. Białka oddziałujące z kapem pełnią istotną rolę regulatorową w ekspresji genów w związku, z czym stanowią cel terapeutyczny. Niniejsza praca w szczególności skupiona jest wokół oddziaływań modyfikowanych nukleotydów z takimi białkami, jak: eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (eIF4E), enzym degradujący kap DcpS (*Decapping Scavenger*) oraz mRNA kap N7–guanino metylotransferaza (N7–MTaza). Monitorowanie procesów, w które zaangażowana jest struktura kapu, jest możliwe między innymi dzięki znakowaniu fluorescencyjnemu. Zmiany właściwości fluorescencyjnych, będące skutkiem wiązania z białkiem, hydrolizy lub biosyntezy (m.in. N7–metylacja) kapu mogą posłużyć w celu wyznaczenia parametrów tego oddziaływania, co z kolei dostarcza informacji o mechanizmie interakcji białek z modyfikowanymi nukleotydami. Ponadto wysokoprzepustowe metody fluorescencyjne mogą zostać zastosowane do badań przesiewowych bibliotek małocząsteczkowych ligandów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym: przeciwnowotworowym (eIF4E, N7–MTaza) oraz przeciwwirusowym (N7–MTaza), bądź w leczeniu niektórych schorzeń genetycznych, takich jak rdzeniowy zanik mięśni SMA (DcpS).

Projekt doktorski jest interdyscyplinarny, łączący dziedziny nauki takie, jak synteza chemiczna, spektroskopia, biofizyka oraz fizyka nanostruktur węglowych. Początek rozprawy doktorskiej stanowi przegląd literaturowy zawierający ogólny opis struktury i funkcji końca 5’ mRNA, tzw. kapu, ze szczególnym uwzględnieniem takich białek, jak eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (eIF4E), enzym degradacji kapu DcpS oraz mRNA kap N7–guanino metylotransferaza (N7–MTaza). Omówiono także przykład białka oddziałującego z nukleotydami guanozynowymi, jakim jest transglutaminaza II. Kolejny rozdział służy przybliżeniu zasad działania metod eksperymentalnych stosowanych w projekcie doktorskim, z naciskiem na metody spektroskopowe. Opisano także metody syntetyczne stosowane w celu otrzymania modyfikowanych nukleotydów. W rozdziale „Badania własne” zostały zaprezentowane najważniejsze wyniki uzyskane w projekcie doktorskim. Scharakteryzowano kolejne opracowane metody biofizyczne, przeznaczone do badań wiązania kap–eIF4E, kap–DcpS, degradacji kapu katalizowanej przez DcpS oraz reakcji N7–metylacji katalizowanej przez N7–MTazę. Omówiono także wyniki uzyskane w ramach współpracy z grupą dr Markusa Pietscha z Uniwersytetu w Kolonii, włączając w to wyniki otrzymane w trakcie stażu odbytego przez Autorkę. Pokrótce opisane zostały także wyniki, które Autorka uzyskała w innych projektach prowadzonych w Laboratorium Chemii Bioorganicznych (sondy MST, ekscymerowe, FRET). Ostatnia część wyników obejmuje próby opracowania sondy molekularnej, przeznaczonej do oznaczania stężenia białek wiążących kap w oparciu o pomiary zmian parametrów elektrycznych. Ta część pracy w dużej mierze została wykonana w pod opieką prof. dr hab. Andrzeja Wysmołka w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego, Wydziału Fizyki UW. W ostatniej części pracy zostały przedstawione szczegóły wykonanych eksperymentów: synteza analogów

nukleotydów, charakterystyka spektroskopowa oraz badania oddziaływań z białkami. Jeśli nie określono inaczej rysunki występujące w pracy stanowią opracowanie własne Autorki.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy są przedmiotem 10 publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z dziedziny chemii i biologii, w tym 7 ściśle związanych z tematem rozprawy oraz 3 będące efektem współpracy w realizacji innych projektów. Ponadto Autorka wielokrotnie prezentowała wyniki na konferencjach międzynarodowych i krajowych w postaci komunikatów ustnych (2 w języku angielskim i 3 w jezyku polskim) lub plakatów.

Publikacje związane z tematem rozprawy

i) *Direct High-Throughput Screening Assay for mRNA Cap Guanine-N7 Methyltransferase Activity*; **Kasprzyk R.**, Fido M., Mamot A., Wanat P., Smietanski M., Kopcial M., Cowling V. H., Kowalska J., Jemielity J.; *Chem. Eur. J.*, 2020, **26(49)**, 11266–11275;

ii) *Exploring tryptamine-conjugates as pronucleotides of phosphate-modified 7-methylguanine nucleotides targeting eIF4E*; Golojuch S., Kopcial M., Strzelecka D., **Kasprzyk R.**, Baran N., Sikorski P. J., Kowalska J., Jemielity J.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2020, **28(13)**, 115523;

iii) *Fluorescent Turn-On Probes for the Development of Binding and Hydrolytic Activity Assays for mRNA Cap-Recognizing Proteins*; **Kasprzyk R.**, Starek B. J., Ciechanowicz S., Kubacka D., Kowalska J., Jemielity J.; *Chem. Eur. J.*; 2019, **25(27)**, 6728–6740;

iv) *N1-Propargylguanosine Modified mRNA Cap Analogs: Synthesis, Reactivity, and Applications to the Study of Cap-Binding Proteins*; Kopcial M., Wojtczak B. A., **Kasprzyk R.**, Kowalska J., Jemielity J.; *Molecules*, 2019, **24(10)**, 1899;

v) *ExciTides: NTP-derived probes for monitoring pyrophosphatase activity based on excimer-to-monomer transitions*; Wanat P., **Kasprzyk R.**, Kopcial M., Sikorski P. J., Strzelecka D., Jemielity J., Kowalska J.; *Chem. Commun.*, 2018, **54(70)**, 9773–9776;

vi) *Exploring the potential of phosphotriazole 5′ mRNA cap analogues as efficient translation initiators*; Walczak S., Sikorski P. J., **Kasprzyk R.**, Kowalska J., Jemielity J.; *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16(36)**, 6741–6748;

vii) *Acetylpyrene-labelled 7-methylguanine nucleotides: unusual fluorescence properties and application to decapping scavenger activity monitoring*; **Kasprzyk R.**, Kowalska J., Wieczorek Z., Szabelski M., Stolarski R., Jemielity J.; *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14(16)**, 3863–3868.

Pozostałe publikacje

i) *Structural insights into the interaction of clinically relevant phosphorothioate mRNA cap analogs with translation initiation factor 4E reveal stabilization via electrostatic thio-effect*; Warminski M., Kowalska J., Nowak E., Kubacka D., Tibble R., **Kasprzyk R.**, Sikorski P. J., Gross J. D., Nowotny M., Jemielity J.; *ACS Chem Biol*; 2021, zaakceptowana;

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

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

Patenty

i) *Fluorofosforanowe analogi końca 5’ mRNA (kapu), sposób ich otrzymywania i zastosowanie*; Kowalska J., Jemielity J., Baranowski M. R., Nowicka A., **Kasprzyk R.**; patent o numerze UOTT/498/2014, przyznany przez Urząd Patentowy RP (19.09.2017).

Komunikaty ustne

i) *Development of binding and hydrolytic activity assays for mRNA cap-recognising proteins using fluorescent turn-on probes*; Summer School 2019: Nucleic Acid Chemistry & Synthetic Biology, Würzburg, Niemcy (28.07–02.08.2019);
ii) *Opracowanie metod wysokoprzepustowych do badań białek wiążących koniec 5' mRNA w oparciu o fluorescencyjnie znakowane nukleotydy*; 60. Zjazd PTChem i SITPChem, Wrocław, Polska (17–21.09.2017);
iii) *Molecular probes based on mRNA cap analogs labeled with pyrene as a tools for studies on cap-binding proteins*; IV International Conference of Biophysics Students, Kraków, Polska (22–24.05.2015);
iv) *Analogi końca 5' mRNA znakowane pirenem, jako sondy molekularne do badań białek wiążących kap*; Sympozjum Młodych Naukowców Wydziału Fizyki UW, Warszawa, Polska (20.05.2015);
v) *Synteza, właściwości oraz potencjalne zastosowania mononukleotydowych analogów końca 5' mRNA znakowanych pirenem*; 56. Zjazd PTChem i SITPChem, Siedlce, Polska (16–20.09.2013).

II. Przegląd literaturowy

II.1. Wstęp

Informacyjny RNA (mRNA, ang. *messenger RNA*) rezprezentuje kopię informacji genetycznej, przepisywanej w procesie transkrypcji z DNA w postaci komplementarnej sekwencji nukleotydów. Powstałe w ten sposób pre-mRNA zostaje poddane obróbce ko- i postranskrypcyjnej, tzw. dojrzewaniu. Na matrycy dojrzałego mRNA w procesie translacji syntetyzowany jest polimer aminokwasowy, stanowiący pierwszorzędową strukturę białka. Całość procesów transkrypcja → translacja → białko, odzwierciedlających przepływ informacji genetycznej, stanowi centralny dogmat biologii molekularnej. Koniec 5' mRNA (kap) bierze udział w wielu bardzo istotnych procesach biologicznych, niezbędnych do wzrostu i funkcjonowania komórek. Mnogość biologicznych funkcji 5' kapu oraz jego związek z rozwojem i leczeniem wielu chorób sprawia, że stanowi on interesujący cel badań.

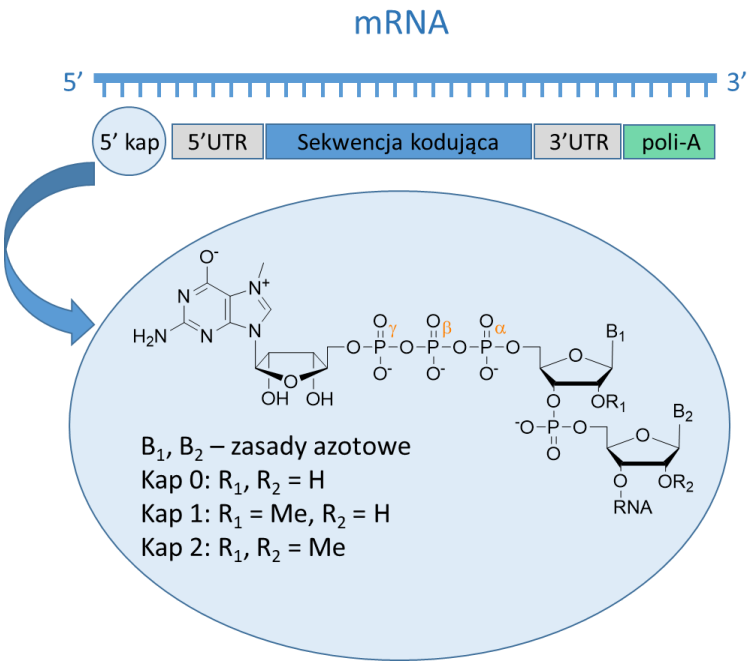
Jedną z najbardziej czułych technik pomiarowych oddziaływań białko-ligand jest spektroskopia fluorescencyjna. Dlatego też znakowanie fluorescencyjne molekuł biologicznie czynnych jest często wykorzystywanym podejściem do monitorowania ich oddziaływań z białkami. Układ tego typu nazywany jest sondą molekularną, gdzie struktura liganda odpowiada za specyficzność oddziaływania, a znacznik fluorescencyjny za generowanie mierzalnego sygnału analitycznego. Najprostszym zastosowaniem metod fluorescencyjnych jest pomiar zmian intensywności fluorescencji (FLINT), zachodzących trakcie procesu. Alternatywnym podejściem w wysokoprzepustowych pomiarach fluorescencyjnych jest metoda polaryzacji fluorescencji (FP) oraz mikroskalowej termoforezy (MST).

W ponższej części rozprawy doktorskiej omówiono właściwości chemiczne kapu, których konsekwencją jest specyficzność oddziaływań biologicznych. Ponadto scharakteryzowano podstawowe procesy biologiczne z udziałem kapu ze szczególnym naciskiem na białka rozponające koniec 5' mRNA. Przybliżono także podstawowe zagadnienia związane z wykorzystaniem fluorescencji oraz nanomateriałów w badaniach oddziaływań ligand–białko.

II.2. Znaczenie biologiczne końca 5'mRNA

II.2.1. Struktura i właściwości końca 5' mRNA

Makrocząsteczka mRNA posiada złożoną strukturę, obejmującą różne obszary nukleotydowe. Centralną część sekwencji mRNA stanowi fragment kodujący białko, który z dwóch stron otoczony jest obszarami 5' i 3' niepodlegającymi translacji (5' UTR i 3' UTR). Na 3' końcu mRNA ulokowana jest sekwencja poliadenylowa, zwana końcem poli-A. Koniec 5' mRNA eukariontów modyfikowany jest nietypową strukturą nukleotydową, nazywaną 5' kapem (ang. *cap* – czapeczka). Struktura 5' kapu zbudowana jest z 7-metyloguanozyny połączonej mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem (kap 0; Rys. II.1).



Rys. II.1. Struktura końca 5' mRNA (kapu).

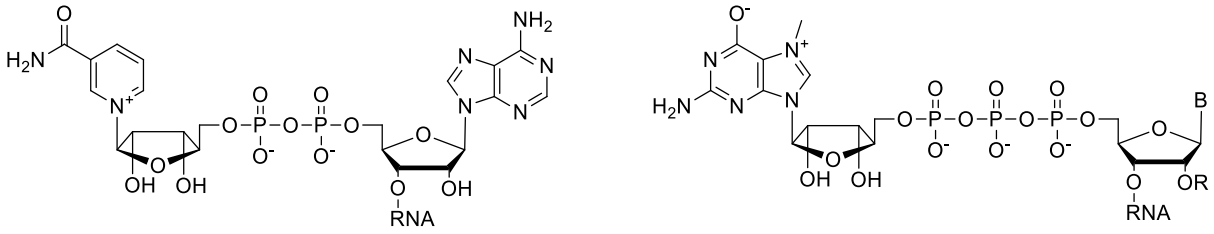
Kap 0 jest dominującą formą występującą u prostych eukariontów, m. in. drożdży. W przypadku wyższych organizmów, w tym ludzi, cząsteczki mRNA posiadają dodatkową metylację pozycji 2'-*O* pierwszego (kap 1) i drugiego (kap 2) transkrybowanego nukleotydu (Rys. II.1). Metylacja pozycji N7 i 2'-*O*, prowadząca do otrzymania kapu 1, zachodzi w jądrze komórkowym, podczas gdy kap 2 powstaje w cytoplazmie. Pomimo różnic w stopniu zmetylowania kapów 0, 1 i 2 kluczowe funkcje biologiczne są zasadniczo konsekwencją N7–metylacji 5'-terminalnej guanozyny oraz obecności ujemnie naładowanego łańcucha 5'5'-trifosforanowego. 2'-*O* metylacja pierwszego nukleotydu transkryptu (kap 1) jest jednym z czynników umożliwiających odróżnienie własnych mRNA od wirusowych. Receptory RIG-I i MDA5 oraz efektory IFIT1 i IFIT5 ścieżki sygnalizacji interferonu typu I specyficznie odróżniają RNA z kap 1 od pozostałych, przez co stanowią część wrodzonego układu odpornościowego, nakierowanego na obce RNA, nieposiadające właściwej modyfikacji 5'.[2]

W organizmie ludzkim wszystkie kapowane molekuły z poli-A posiadają kap 0 i kap 1, jednak tyko połowa zawiera kap 2. Przypuszczalnie kap 2 przyczynia się do nasilenia translacji poprzez zwiększenie powinowactwa do rybosomów, bądź powstaje dopiero po związaniu mRNA z rybosomem, stabilizując transkrypt.[3] Niektóre eukarionty, jak kinetoplastydy (wiciowce) posiadają mRNA z jeszcze większą ilością 2'-*O*-metylowanych pierwszych nukleotydów transkryptu, tworząc odpowiednio kap 3 i 4, a także dodatkową metylację pierwszej i czwartej zasady azotowej.[4]

Dodatkowa metylacja końca 5' mRNA, obecna w do 30% kapów, znajduje się w pozycji N6-adenozyny, będącej pierwszym transkrybowanym nukleozydem.[5] Także 2'-*O* metyloadenozyna (A_m), może ulec dalszej modyfikacji do N6, 2'-*O*-dimetyloadenozyny (m^6A_m). Pierwszy transkrybowany nukleotyd mRNA wyższych organizmów może zawierać A_m, bądź m^6A_m ale nie A lub m^6A, gdyż ich mRNA posiada przynajmniej kap 1.[6] Transkrypty inicjowane przez m^6A_m są bardziej stabilne od mRNA rozpoczętych innymi nukleotydami, co wynika ze zwiększonej odporności na degradację przez enzym Dcp2. Za selektywną demetylację pozycji N6 opowiada białko FTO (ang. *fat mass and obesity-associated protein*). Odwracalna metylacja

i demetylacja A_m w obrębie struktury kapu umożliwia dynamiczny wpływ na stabilność mRNA.[7] Niedawno wykazano także, iż rodzaj zasady azotowej pierwszego transkrybowanego nukleotydu (A, G, C, U, m^6A) oraz stopień jego metylacji mają wpływ na wydajność translacji białka, jednak w badaniach wykorzystujących IVT mRNA (ang. *in vitro transcribed mRNA*) jest on także zależny od stopnia czystości mRNA oraz linii komórkowej.[8]

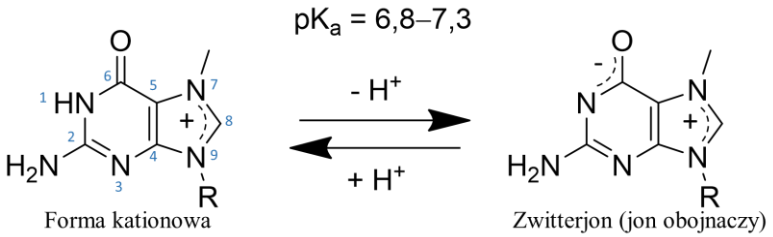
Makrocząsteczki mRNA, produkowane przez komórki prokariotyczne nie zawierają struktury kapu. Jednakże niedawno odkryto, że bakterie oraz niektóre organizmy wyższe, w tym drożdże, rośliny oraz komórki ssaków produkują także RNA, zawierające NAD^+ (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) na końcu 5' (Rys. II.2).[9] Zidentyfikowano także enzymy odpowiedzialne za usuwanie NAD^+ z końca 5' RNA o aktywności pirofosfatazy (np. NudC, DXO).[10] Znaczenie i funkcja NAD-RNA nadal pozostaje nieznana – przypuszczalnie mogą one być zaangażowane w proces translacji. Transkryptom *Arabidopsis* zawiera NAD^+-kapowane transkrypty, które ulegają splicingowi i poliadenylacji oraz mogą wiązać się z prowadzącymi translację polisomami.[11]



Rys. II.2. Porównanie końca 5' RNA, zakończonego NAD i m^7GpppX (X – pierwszy transkrybowany nukleotyd, zawierający zasadę azotową B oraz R = H lub CH_3).

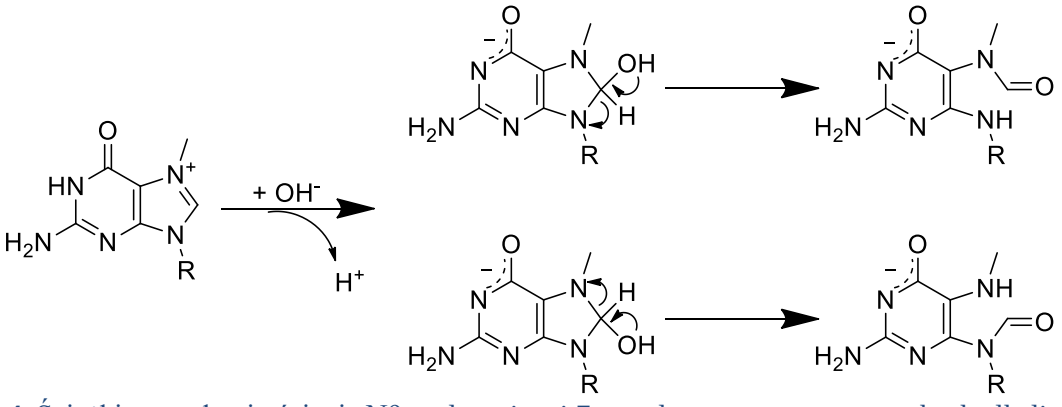
Metylacja w pozycji N7 guanozyny prowadzi do powstania ładunku dodatniego, któremu cząsteczka kapu zawdzięcza unikalne właściwości fizykochemiczne. Obecność ładunku dodatniego w pierścieniu 7-metyloguanozyny sprawia, że kap może w sposób specyficzny być rozpoznawany przez białka, na skutek tworzenia oddziaływań warstwowych z aminokwasami w miejscu wiążącym. Poprzez oddziaływania z wieloma jądrowymi i cytoplazmatycznymi białkami kap bierze udział w istotnych procesach biologicznych, takich jak dojrzewanie mRNA (wzrost dokładności oraz wydajności splicingu[12]), transport nukleocytoplazmatyczny oraz inicjacja translacji, a także zwiększa stabilność transkryptu chroniąc go przed działaniem egzonukleaz.[13]

N9-podstawiona 7-metyloguanina występuje w dwóch stanach protonacyjnych, przyjmując formę monokationową w środowisku kwasowym oraz zwitterjonu (jonu obojnaczego) w zasadowym, na skutek reakcji kwas-zasada protonu N1 (Rys. II.3). Proces ten opisuje stała równowagi kwasowo-zasadowej K_a. Wartości pK_a obejmują zakres 6,8–7,3, w zależności od ilości grup fosforanowych oraz obecności drugiego nukleotydu. W temperaturze 30°C pK_a 7-metyloguanozyny wynosi 6,8, m^7GMP – 7,2, a m^7GTP i m^7GpppA – 7,3.[14]



Rys. II.3. Równowaga kwasowo-zasadowa N9-podstawionej 7-metyloguaniny.

Alkilacja pozycji N7 guanozyny prowadzi do zmiany rozkładu gęstości elektronowej, skutkując osłabieniem wiązania glikozydowgo i spontaniczną depurynacją w środowisku kwasowym.[15] Z kolei w warunkach alkalicznych pH > 8,0 pierścień imidazolowy ulega rozpadowi. Jon hydroksylowy (OH^-) atakuje nukleofilowo pozycję C8. W efekcie powstaje karbinoloamina z grupą hydroksylową i protonem w pozycji C8 oraz wiązaniem pojedynczym pomiędzy N7 i C8. Przegrupowanie elektronów prowadzi do odkształcenia i otwarcia pierścienia imidazolowego (Rys. II.4). [16] Otwarcie pierścienia może następować zarówno poprzez rozpad wiązania N7–C8, jak i C8–N9.[17]

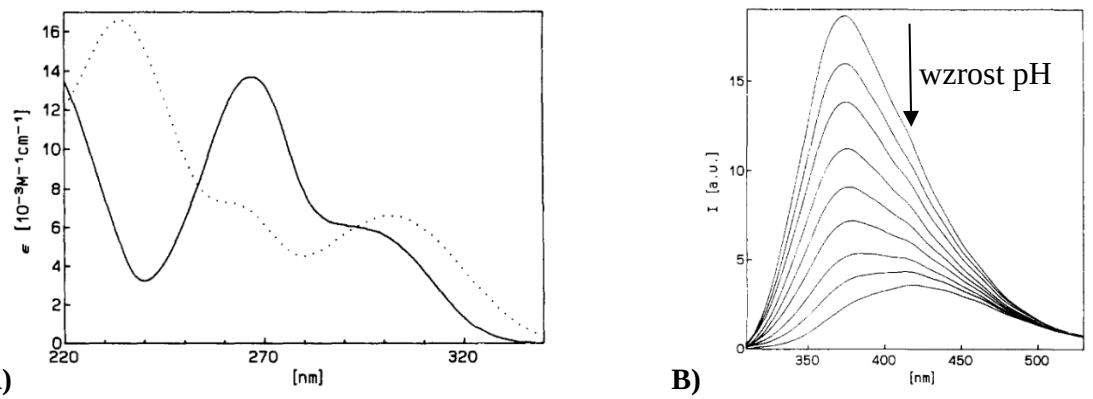


Rys. II.4. Ścieżki rozpadu pierścienia N9-podstawionej 7-metyloguanozyny w warunkach alkalicznych.

Kolejną unikalną cechą strukturalną nukleotydów 7-metyloguanozynowych jest konformacja 3'-*endo* pierścienia D-rybozy, podczas gdy w innych nukleotydach i nukleozydach purynowych preferowana jest konformacja 2'-*endo*. Ponadto na skutek odziaływań elektrostatycznych pomiędzy zasadą azotową (+) i łańcuchem fosforanowym (-), m^7G nukleotydy preferują konformację *anti* wokół wiązania *N*-glikozydowego oraz orientację *synclinical* wokół wiązania C4'–C5', w której atom tlenu 5'-*O* ulokowany jest ponad pierścieniem cukrowym stabilizując konformację.[18] Konformacja kapu jest kolejnym czynnikiem istotnym w specyficznym oddziaływaniu z białkami.

Deficyt elektronów w pierścieniu 7-metyloguanozyny umożliwia interakcję kapu z innymi układami aromatycznymi poprzez oddziaływania warstwowe (stackingowe). Silne właściwości polaryzacyjne 7-metyloguanozyny sprawiają, iż oddziałuje ona z molekułami łatwo polaryzowalnymi, np. aminokwasami aromatycznymi (tryptofan, fenyloalanina i tyrozyna)[19] oraz pierścieniami indolowymi (tryptamina).[20] Oddziaływania warstwowe obecne są także pomiędzy zasadami azotowymi kapu: 7-metyloguaniną i zasadą pierwszego transkrybowanego nukleotydu, np. m^7GpppG.[21]

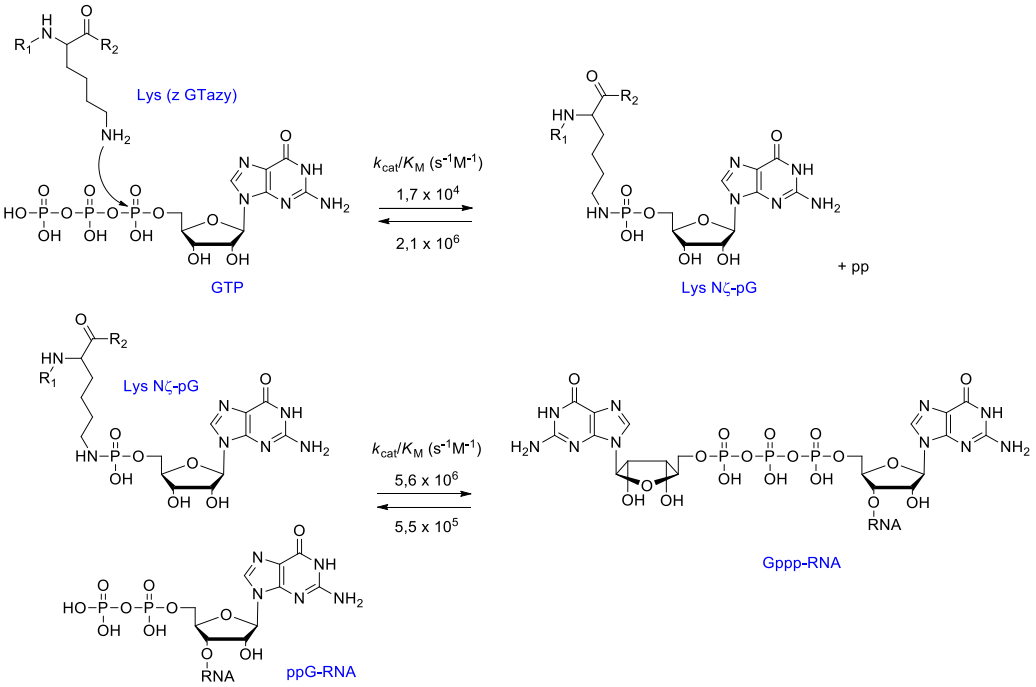
Nukleotydy 7-metyloguanozynowe, podobnie do innych nukleotydów, posiadają właściwości absorpcyjne w zakresie światła UV. Kształt i położenie maksimów widma absorpcji zależy od stanu protonacyjnego m^7G. Maksimum absorpcji formy monokationowej znajduje się w 260 nm, natomiast zwitterjonu jest przesunięte hipsochromowo o 30 nm (Rys. II.5A), a intensywność pasma wzrasta. Ponadto m^7G nukleotydy posiadają słabe właściwości fluorescencyjne o wydajności kwantowej rzędu kilku procent.[22] Pasmo emisji fluorescencji ma maksimum w 370 nm i jest wrażliwe na czynniki zewnętrzne, w tym zmiany pH. Wzrost pH powoduje zmniejszenie intensywności pasma fluorescencji układu wzbudzanego w punkcie izozbestycznym form protonacyjnych (280 nm; Rys. II.5B). Wydajność kwantowa 7-metyloguanozyny w pH 5,0 wynosi 1,5%, a w pH 9,2 spada do 0,3%.[23] Fluorescencja m^7G nukleotydów może zanikać także na skutek otwarcia pierścienia imidazolowego w warunkach alkalicznych, bądź odziaływań warstwowych.



Rys. II.5. A) Widma absorpcji formy kationowej (linia ciągła) i zwitterjonu (linia przerywana) N^2, N^2, 7-trimetyloguanozyny w 20°C; **B)** Widma emisji (wzbudzanie w 280 nm – punkcie izozbestycznym monokationu i zwitterjonu) 7-metyloguanozyny, zarejestrowane w buforach o różnym pH w 20°C. Rysunki zaczerpnięty z pracy Wieczorek, et al. 1995.[23]

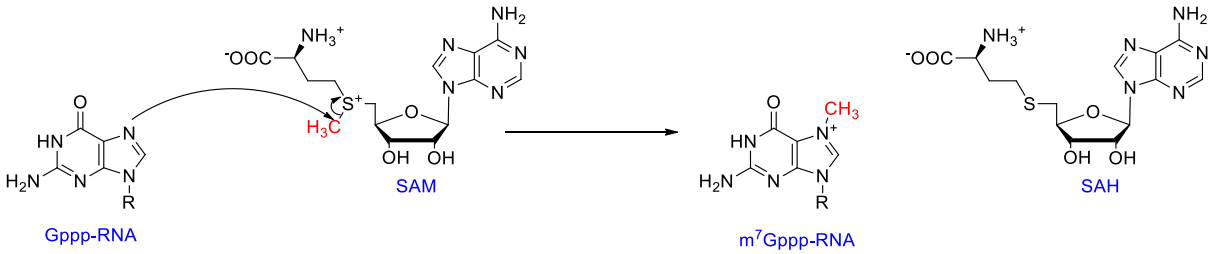
II.2.2. Biosynteza kapu

Biosynteza kapu w komórkach eukariotycznych jest jednym z etapów dojrzewania mRNA, który zachodzi kotranskrypcyjnie. Kapowanie jest pierwszą modyfikacją transkrybowanego przez polimerazę II RNA i zachodzi w jądrze komórkowym już po przyłączeniu 25–30 nukleotydów do powstającego transkryptu.[24, 25] Proces ten obejmuje aktywność trzech enzymów. Pierwszy, RNA 5'-trifosfataza (TPaza) hydrolizuje wiązanie pomiędzy α i β fosforanem w 5'–trifosforanie RNA. Następnie guanylylotransferaza (GTaza) przenosi cząsteczkę GMP z GTP na koniec 5' RNA z utworzeniem Gppp–RNA.[26] Lizyna GTazy atakuje nukleofilowo α–fosforan cząsteczki GTP, prowadząc do pęknięcia wiązania α–β pirofosforanowego oraz powstania kowalencyjnego produktu przejściowego. Następnie cząsteczka GMP przenoszona jest na 5'–difosforan RNA (Rys. II.6). Proces ten jest odwracalny.



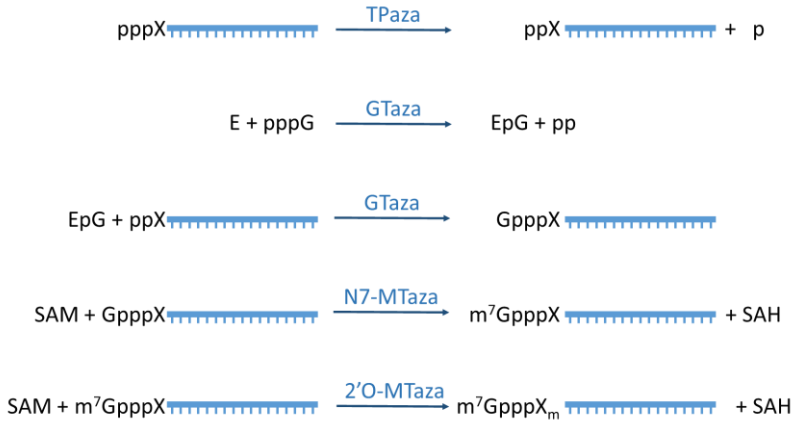
Rys. II.6. Mechanizm reakcji guanylylotransferazy. Rysunek przygotowany na podstawie Ramanathan et al. 2016.[27]

Ostatnim etapem jest specyficzna metylacja guanozyny w pozycji N7 przez mRNA kap N7–guanino metylotransferazę (N7–MTazę), która przenosi grupę metylową z *S*-adenozylo-L-metioniny (SAM) na Gppp–kapowane RNA z jednoczesnym uwolnieniem *S*-adenozylo-L-homocysteiny (SAH). Mechanizm ten jest zachowany u wszystkich organizmów eukariotycznych i obemuje substytucję nukleofilową S_N2 z cząsteczką SAM pełniącą rolę elektrofila dostarczającego grupę metylową oraz pozycją N7 guaniny, jako nukleofilem (Rys. II.7).[28] Katalityczny mechanizm wymaga zbliżenia przestrzennego substratów oraz właściwą orientację N7–nukleofilu kapu względem S-CH_3 w SAM.[29]



Rys. II.7. Mechanizm substytucji nukleofilowej procesu N7–metylacji.

Otrzymana w ten sposób struktura kapu 0 może zostać poddana dalszym metylacjom w pozycji 2'-*O* pierwszego i kolejnych transkrybowanych nukleotydów. Syntezę kapu 1 katalizuje enzym mRNA kap 2'-*O*-metylotransferaza (2'-*O*-MTaza), dla kórego donorem grupy metylowej również jest cząsteczka SAM (Rys. II.8).



Rys. II.8. Schematyczne przedstawienie etapów biosyntezy kapu (E – enzym).

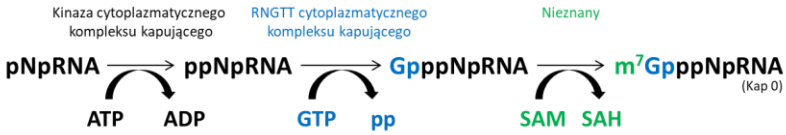
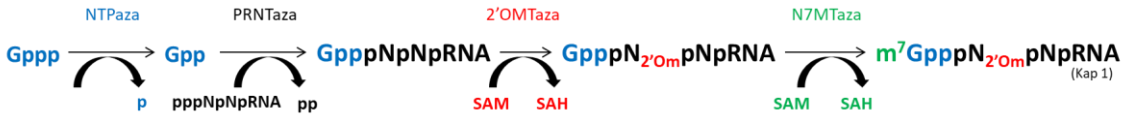
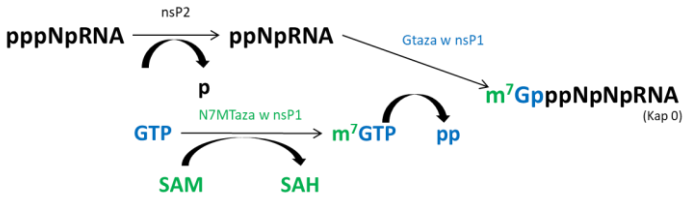
Powszechnie uważano, że proces kapowania RNA zachodzi jedynie w jądrze komórkowym. Jednak komórki eukariotyczne posiadają także pulę niekapowanego mRNA w cytoplazmie, w formie informacyjnej rybonukleoproteiny mRNP (ang. *messenger Ribonucleoprotein*) w P-ciałach (ang. *P-bodies*), w których to odbywa się kapowanie, poliadenylacja oraz przechowywanie mRNA.[30] W komórkach ludzkich kostniakomięsaka U-2 OS cytoplamatyczny kompleks zawierający kinazę 5'-monofosforanu RNGTT oraz białko adaptorowe Nck1, odpowiadają za rekaping RNA.[31] Rekaping cytoplazmatyczny przypuszczalnie reprezentuje mechnizm aktywacji–reaktywacji mRNA, który wspomaga regulację syntezy białek.

Istnieją także inne mechanizmy kapowania końca 5' RNA, często stosowane przez wirusy.[32] Wirusy eukariotyczne kapują swoje mRNA, aby zamaskować je przed rozpoznaniem przez wrodzony układ odpornościowy oraz zwiększyć ekspresję białek patogennych.[33] Niektóre wirusy wykorzystują enzymy gospodarza by kapować swoje mRNA (np. adenowirusy i

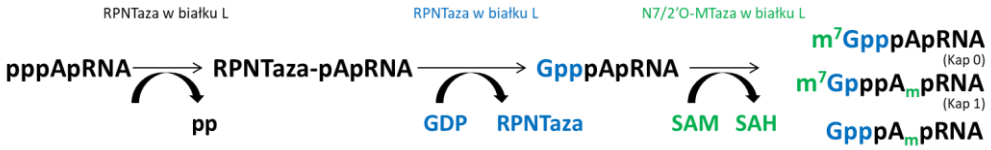
herpeswirusy),[28, 34] podczas gdy inne kodują swoje własne białka kapujące. Te ostatnie wykorzystują mechanizmy kapowania analogiczne do organizmów eukariotycznych lub korzystają z mechanistycznie odrębnych ścieżek.[35] Przykładowo N7–metylotransferaza alfawirusów przenosi grupę metylową bezpośrednio do molekuły GTP z utworzeniem m^7GTP, które jest wprowadzane na koniec 5'mRNA (Tabela II.1).[32] Niesegmentowane wirusy negatywnego sensu włączają GDP zamiast GMP do końca 5' mRNA w trakcie biosyntezy kapu.[36] Rabdowirusy zamiast GTazy formującej przejściowy kompleks z enzymem i kowalencyjnie przyłączoną molekułą GMP posiadają enzym RNA:GDP polirybonukleotydotransferazę (PRNTazę), która tworzy kowalencyjne wiązanie z monofosforanem na końcu 5' wirusowego RNA (Tabela II.1). Enzym transferuje następnie 5'-monofosforan RNA na molekułę GDP tworząc Gppp–RNA, dalej modyfikowane do kapu 0 i 1.[36, 37] Istnieją także wirusy, które bezpośrednio pobierają kap z mRNA gospodarza w procesie zwanym *cap snatching*. Wirus grypy posiada polimerazę RNA RdRp, będącą kompleksem trzech białek, w tym polimerazy PA (ang. *polymerase acidic protein*), odcinającej pierwszych 10–15 nukleotydów od kapowanego RNA gospodarza, które następnie są wykorzystywane do rozpoczęcia transkrypcji wirusowej.[38] Totiwirusy drożdżowe L-A i L-BC stosują jeszcze bardziej bezpośrednie podejście *cap snatching*. Wirusowe białko Gag (zbliżone do GTazy kanonicznego mechanizmu kapowania) odcina cząsteczkę m^7GMP z mRNA gospodarza, formując kowalencyjny produkt przejściowy histydylo-m^7GMP. Następnie m^7GMP przenoszone jest kotranskrypcyjnie na 5'-difosforan RNA wirusowego transkryptu.[39]

Tabela II.1. Rodzaje mechanizmów biosyntezy kapu.

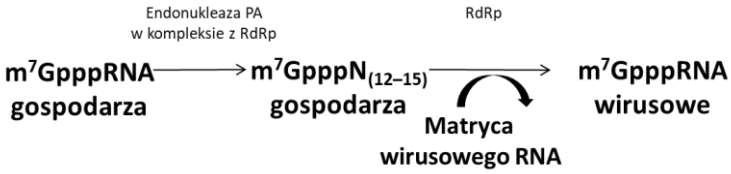
Kanoniczny (eukarionty wyższe, niektóre wirusy eukariotyczne jak wirus *Vaccinia* lub chlorowirus)

Kaping cytoplazmatyczny (komórki ssacze, przypuszczalnie także inne eukarionty wyższe, świdrowce)

Ścieżka kapowania GDP RNA (niesegmentowane wirusy negatywnego sensu)

Ścieżka kapowania m^7GTP RNA – nsP1 w alfawirusach (alfawirusy ss(+)RNA, np. wirus chikungunya, wirus Sindbis)


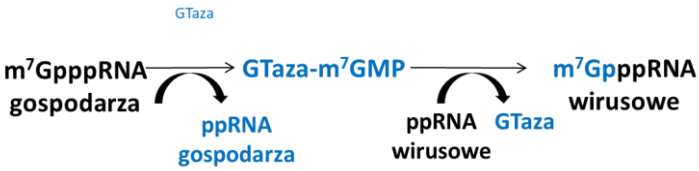
Preintermediat enzym–pRNA (ss(-)RNA rabdowirusy, np. wirus wścieklizny)



Cap snatching – kapowane 5' RNA gospodarza jako starter transkrypcji (segmentowane ss(-)RNA wirusy, np. wirus grypy, ortomyksowirusy)

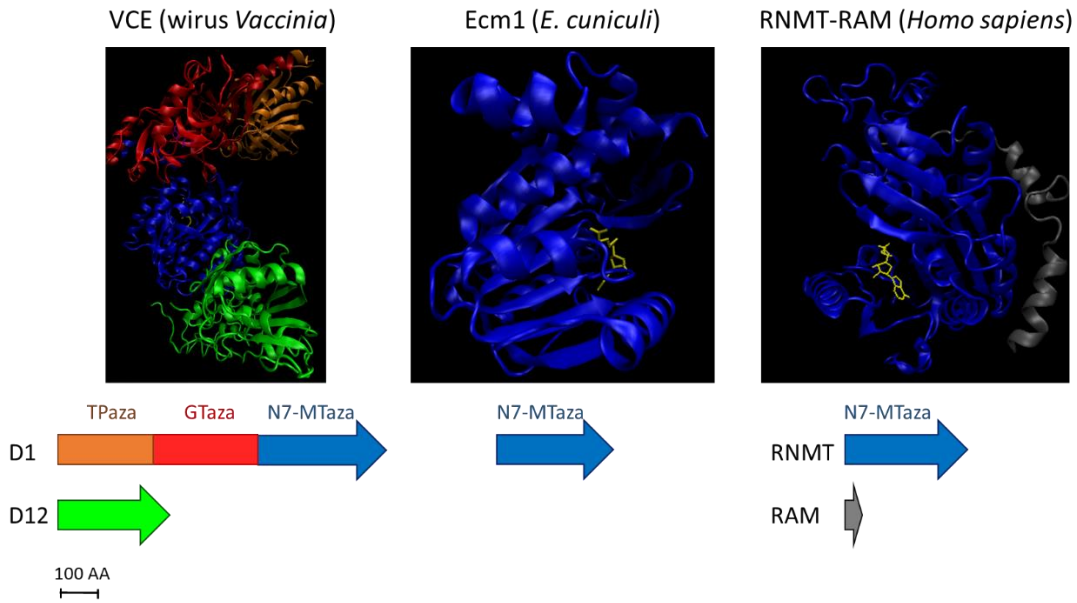


Cap snatching – przeniesienie molekuły m^7GMP z mRNA gospodarza na wirusowe RNA (totiwirus drożdżowy L-A i L-BC)

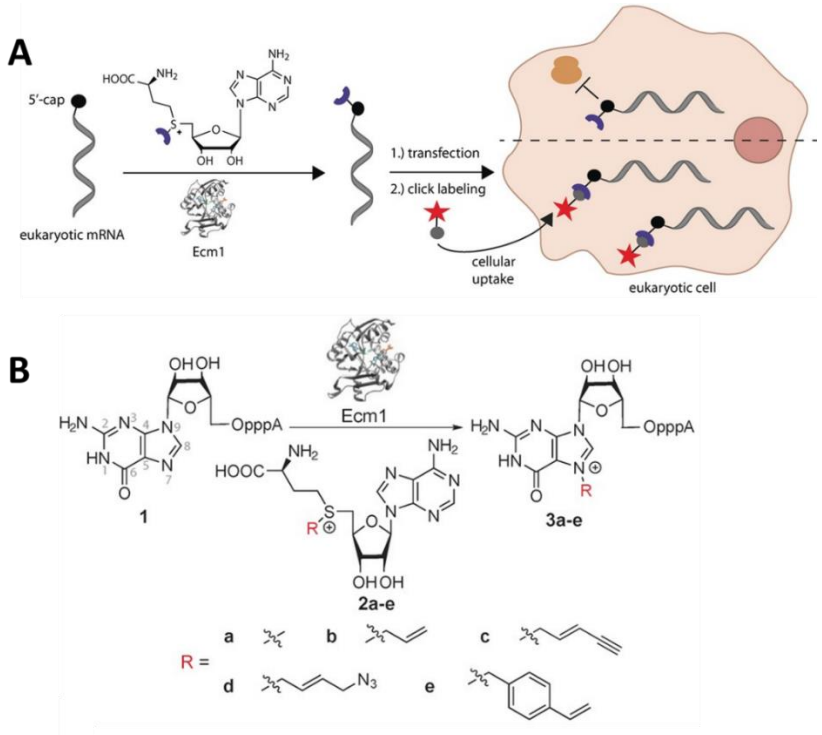


U ssaków pierwsze dwa etapy kapowania katalizowane są przez bifunkcyjny enzym kapujący CE (ang. *Capping Enzyme*), posiadający aktywność zarówno 5'-trifosfatazy, jak i guanylylotransferazy.[24] Ludzka mRNA kap N7–guanino mertylotransferaza (RNMT) jest białkiem jądrowym, zbudowanym z domeny katalitycznej oraz domeny N-końcowej.[40] Domena N-końcowa nie jest wymagana do aktywności katalitycznej, ale odpowiada za wiązanie białka RAM (ang. *RNMT-Activating Miniprotein*), które stabilizuje katalitycznie optymalną strukturę RNMT (Rys. II.9).[41] Pokswirusy (w tym wirus *Vaccinia* oraz wirus afrykańskiego pomoru świń ASFV) kodują trzyfunkcyjny enzym kapujący mRNA, posiadający wszystkie trzy aktywności enzymatyczne – TPazy, GTazy i N7–MTazy.[35, 42] Enzym kapujący wirusa *Vaccinia* VCE (ang. *Vaccinia Capping Enzyme*) jest białkiem heterodimerycznym, składającym się z dwóch podjednostek: D1, odpowiedzialnej za aktywność oraz D12 stymulującej wiązanie substratu przez D1 (Rys. II.9).[43] Podjednostka D12 oddziałuje z domeną D1 o aktywności N7–guanino metylotransferazy indukując zmiany konformacyjne niezbędne do wydajnej katalizy.[44] Mechanizm kapowania u koronawirusów (CoV) wciąż nie jest znany. Przypuszczalnie stosują mechanizm zbliżony do alfawirusów, bądź kanoniczną ścieżkę kapowania.[45] Aktywność N7–MTazy została zidentyfikowana w białku nsp14 wirusa ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej SARS (ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome*). [46]

Jedną z najlepiej scharakteryzowanych N7–MTaz jest enzym Ecm1 z pasożyta *Encephalitozoon cuniculi*. Ecm1 jest najmniejszą ze znanych N7–MTaz, przez co często stosowany jest, jako białko modelowe (Rys. II.9).[47] Białko to jest również znane ze zdolności do transferu grup większych niż metylowa, co pozwala na modyfikowanie pozycji N7 kapu np. bioortogonalnymi grupami funkcyjnymi, jak allilowa, alkinowa lub azydkowa, które mogą być dalej wykorzystane w znakowaniu fluorescencyjnym (addycja Michaela lub reakcja „click") w celu obrazowania mRNA w komórkach (Rys.II.10).[48, 49]



Rys. II.9. Porównanie struktur N7–metylotransferaz VCE (kod PDB 4CKB), Ecm1 (kod PDB 1RI1) i RNMT-RAM (kod PDB 5E8J). Długość fragmentów strzałki jest proporcjonalna do ilości aminokwasów (AA) w sekwencji.

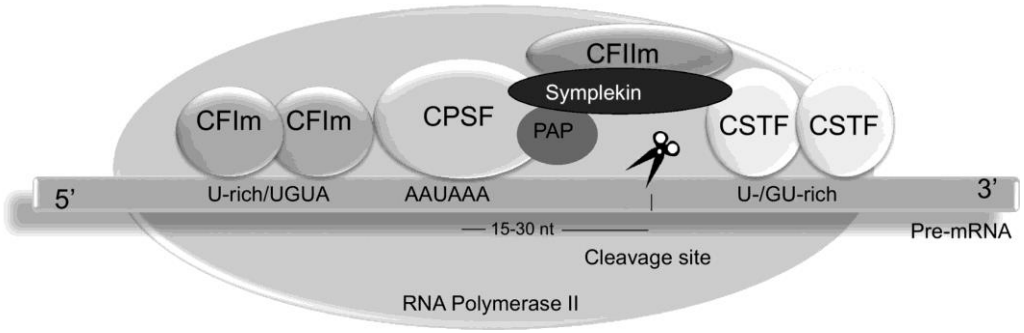


Rys. II.10. A) Schematyczne przedstawienie zastosowania znakowania RNA w pozycji N7 kapu z użyciem enzymu Ecm1; **B)** Schemat reakcji transferu grup metylowej (**a**), allilowej (**b**), pent-2-en-4-ynylowej (**c**), 4-azydobut-2-enylowej (**d**) i 4-winylobenzylowej (**e**) w pozycję N7 dinukleotydu GpppA. Rysunek zaczerpnięto z pracy Holstein et al. 2016.[48]

II.2.3. Dojrzewanie mRNA

Po przyłączeniu struktury kapu na końcu 5' mRNA, przeprowadzane są kolejne etapy procesu dojrzewania: poliadenylacja i splicing. Eukariotyczne mRNA w większości posiadają na końcu 3' sekwencję do 250 nukleotydów adenozynowych, które nie są kodowane przez DNA. Za proces przyłączenia adenozyn do końca 3' transkryptu odpowiada niezależna od matrycy

polimeraza poli-A (PAP). Polimeraza wchodzi w skład wielobiałkowego kompleksu, który wiąże się w miejscu sekwencji sygnałowej poliadenylacji (u ludzi najczęściej AAUAAA) oraz rejonu bogatego w GU (Rys. II.11). Inną składową kompleksu stanowi czynnik specyficzności cięcia i poliadenylacji CPSF (ang. *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), który katalizuje cięcie mRNA między 10, a 30 nukleotydem od jego miejsca wiązania.[50] Czynnik stymulacji cięcia CSTF (ang. *Cleavage Stimulation Factor*) oraz czynniki cięcia CFI (ang. *Cleavage Factor I*; CFIm i CFIIm) zwiększają selektywność wiązania kompleksu z RNA.[51] Po przecięciu mRNA polimeraza poli-A przyłącza kolejne podjednostki AMP, którego źródłem są cząsteczki ATP. Po włączeniu odpowiedniej liczby nukleotydów adeninowych polimeraza przestaje być związana z CPSF, co skutkuje terminacją poliadenylacji. Warto jednak pokreślić, iż nie wszystkie eukariotyczne mRNA posiadają ogon poli-A. Przykładem są mRNA kodujące białka histonowe.[52]



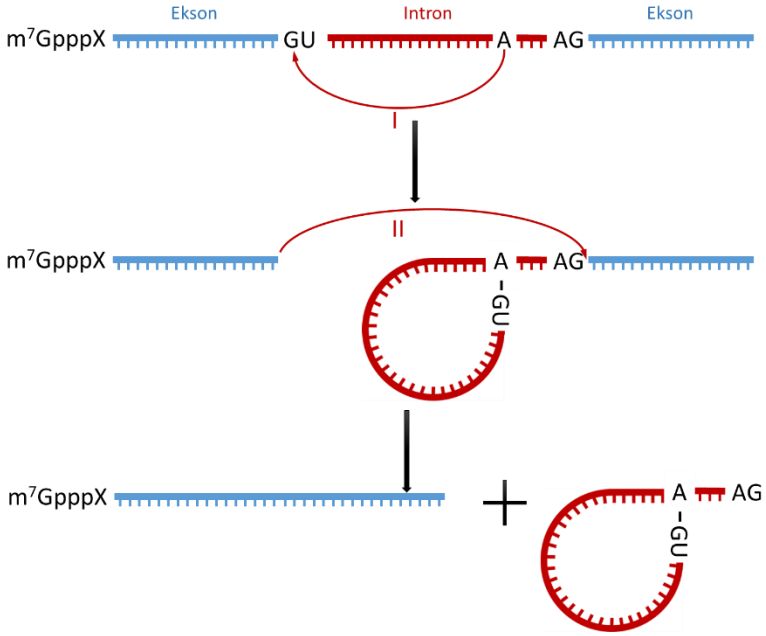
Rys. II.11. Białkowy kompleks odpowiedzialny za przeprowadzenie poliadenylacji końca 3' mRNA. Rysunek zaczerpnięty z pracy Erson-Bensan, et al. 2016.[53]

Poliadenylacja jest ściśle związana z terminacją transkrypcji. Czynnik CPSF oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym TFIID już w trakcie inicjacji transkrypcji. Następnie przemieszcza się wzdłuż matrycy razem z polimerazą RNA II, aż do momentu wykrycia sekwencji sygnałowej poliadenylacji.[54] Ponadto ogon poli-A jest miejscem wiązania białka PABP (ang. *Poly(A)-Binding Protein*), które pełni szereg różnych funkcji, takich jak stabilizacja transkryptu oraz inicjacja translacji. Białko PABP oraz kap działają synergistycznie, wzmacniając translację białek.[55]

Sekwencja genu eukariontów jest zbudowana z fragmentów kodujących – eksonów oraz niekodujących – intronów, które przepisywane są na sekwencję transkryptu. W trakcie dojrzewania pre-mRNA do mRNA dochodzi do usunięcia intronów oraz łączenia eksonów w procesie zwanym splicingiem (składaniem), który w dużej mierze zachodzi kotranskrypcyjnie.[56] Splicing jest katalizowany przez spliceosom, będący wieloskładnikowym kompleksem do pięciu małych jądrowych rybonukleoprotein snRNP (ang. *small nuclear Ribonucleoprotein*) oraz ponad stu białek. Istnieją także przesłanki, sugerujące udział chromatyny w splicingu.[57] Spliceosom rozpoznaje granicę między intronem, a eksonem oraz przeprowadza reakcję transestryfikacji, w której usuwane są introny i łączone eksony. Jest to proces dwuetapowy, rozpoczynający się od ataku nukleofilowego grupy 2'OH pierwszego nukleotydu określonego podczas przyłączenia spliceosomu, na grupę 5' fosforanową pierwszego nukleotydu intronu tworząc produkt przejściowy (reakcja I na Rys. II.12). Następnie grupa 3'OH uwolnionego eksonu, poprzedzającego wycinany intron przeprowadza atak nukleofilowy na 5'-fosforan pierwszego nukleotydu za intronem w miejscu 3' splicingu wraz z uwolnieniem intronu (reakcja II na Rys. II.12).[58]

Eksony nie zawsze łączone są w kolejności występowania w sekwencji genu. Możliwość łączenia eksonów w różnej kolejności nazywana jest alternatywnym splicingiem. Dzięki istnieniu alternatywnych ścieżek składania transkryptu z jednego genu może powstać wiele różnych mRNA, co stanowi jedno ze źródeł różnorodności proteomu.[59]

Splicing oraz poliadenylacja mRNA związane są z mechanizmem kontroli jakości kapu. W komórkach ssaków trzyfunkcyjne białko DXO/Dom3Z o aktywności pirofosfohyrdolazy i 5' do 3' egzonukleazy, odpowiada za dekapowanie niemetylowanego kapu (GpppX) oraz dalszą degradację RNA. Ograniczenie ekspresji genu (ang. *gene knockdown*) DXO/Dom3Z skutkuje zwiększeniem poziomu mRNA niezawierających N7–metylowanego kapu, wadliwym splicingiem pierwszego i kolejnych intronów oraz wadliwym cięciem miejsca 3' poliadenylacji.[60] Wynik ten dowodzi, że N7–metylacja kapu, splicing mRNA i poliadenylacja są ze sobą powiązane.



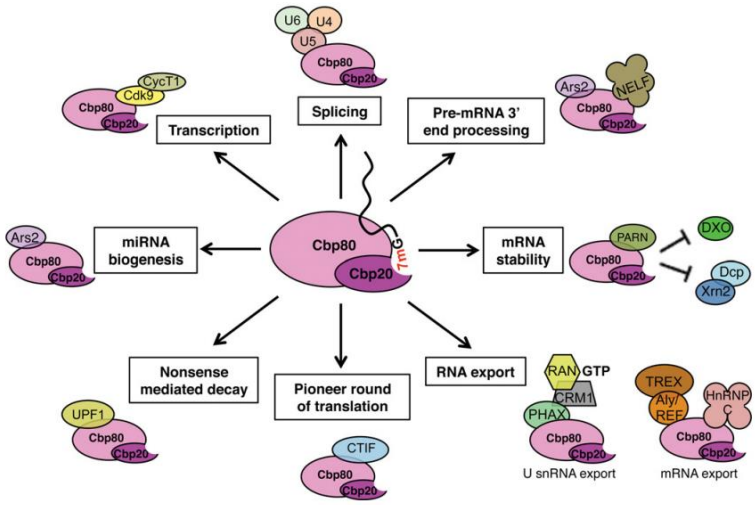
Rys. II.12. Schematyczne przedstawienie mechanizmu splicingu.

II.2.4. Transport do cytoplazmy

Dojrzały transkrypt komórek eukariotycznych ulega translacji w cytoplazmie. W tym celu mRNA musi zostać przetransportowane przez pory jądrowe z wnętrza jądra komórkowego. Funkcję tą pełni jądrowy kompleks białkowy wiążący kap CBC (ang. *Cap-Binding Complex*), będący niezbędnym czynnikiem ekspresji genu, integrującym procesowanie RNA, transport nukleocytoplazmatyczny oraz translację. Kompleks CBC składa się z dwóch polipeptydów, których nazwy związane są z ich masą cząsteczkową: Cbp20 (ang. *Cap-binding protein*) o masie 20 kDa oraz Cbp80 o masie 80kDa. Białko Cbp20 jest niestabilne bez podjednostki Cbp80 i nie występuje w postaci monomeru.[61] Kompleks CBC wiąże kap tuż po transkrypcji w jądrze komórkowym. Wiązanie odbywa się synergistycznie z udziałem obydwu polipeptydów,[62] jednak to Cbp20 posiada miejsce wiążące strukturę kapu.[63] Rolą Cbp80, którego struktura jest wysoce uporządkowana, jest indukcja zmiany konformacyjnej Cbp20, prowadzącej do związania końca 5' mRNA. Obydwie podjednostki dodatkowo wiążą RNA poprzez domeny RRM (ang. *RNA-Recognition Motif*). CBC odpowiada za transport nukleocytoplazmatyczny mRNA oraz snRNA, które rozróżniane są na podstawie długości łańcucha nukleotydowego i mają inny mechanizm transportu. W przypadku transkryptów mRNA (powyżej 300 nukleotydów) CBC

stymuluje transport oddziałując z Aly/REF, będącego elementem wielobiałkowgo kompleksu TREX (ang. *Transcription Export complex*).[64] TREX z kolei oddziałuje z receptorem eksportu mRNA TAP.[65]

Kompleks CBC pełni także wiele kluczowych funkcji w post-transkrypcyjnym procesowaniu RNA. Bierze udział między innymi w procesowaniu końca 3' pre-mRNA,[66] splicingu[62] oraz stabilizuje mRNA[60] (Rys. II.13). Po przeniesieniu mRNA przez pory jądrowe CBC może brać udział w pierwszej rundzie translacji. Mechanizm tego procesu nie jest całkowicie wyjaśniony, jednak zidentyfikowane zostało białko CTIF (ang. *CBC-dependent Translation Initiation Factor*), które jest zaangażowane w pierwszą rundę translacji, jednak nie bierze udziału w standardowej procedurze translacji.[67] Przejście od pierwszej rundy do modu standardowego jest regulowane przez importyny. Do importyny α oddziałującej z Cbp80,[68] przyłącza się importyna β, która promuje dysocjację mRNA od CBC.[67] Proces translacji został szczegółowo scharakteryzowany w kolejnym rozdziale.

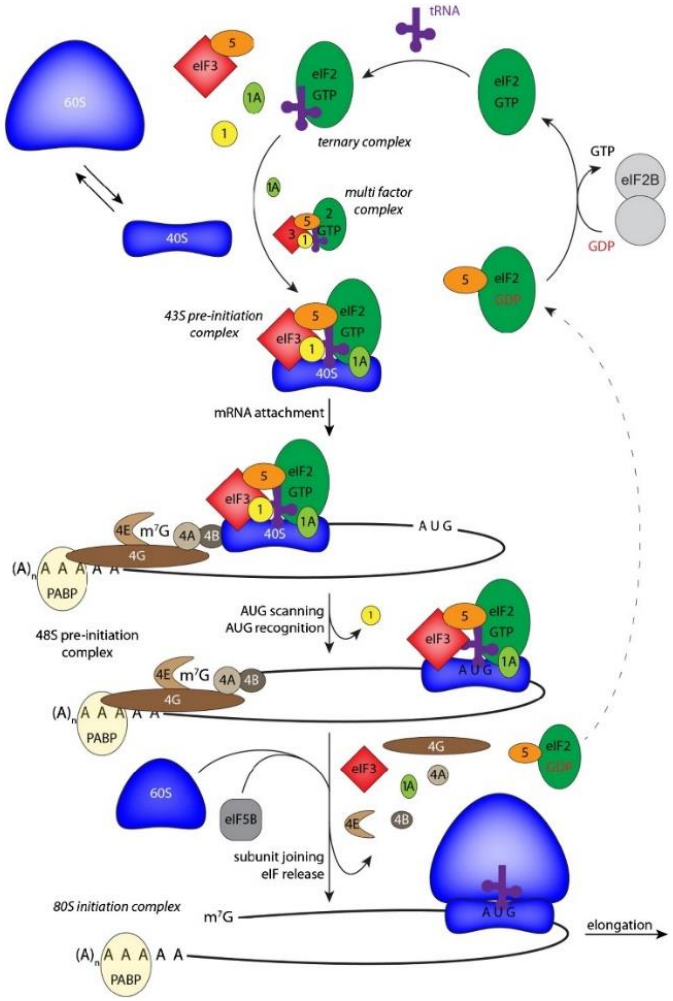


Rys. II.13. Schematyczne przedstawienie funkcji CBC. Rysunek zaczerpnięto z pracy Gonatopoulos-Pournatzis, et al. 2014.[69]

II.2.5. Inicjacja translacji

Makrocząsteczka mRNA jest matrycą, na której syntetyzowany jest łańcuch aminokwasowy w procesie zwanym translacją. Proces ten zachodzi w cytoplazmie, gdzie podjednostki rybosomu rozpoznają i odszyfrowują matrycę mRNA w cyklu obejmującym fazy inicjacji translacji, elongacji oraz terminacji. Pierwszy etap – inicjacji translacji, jest etapem limitującym szybkość całej translacji oraz najczęstszym celem jej kontroli.[70] Inicjacja translacji rozpoczyna się po utworzeniu kompleksu preinicjacyjnego: tRNA (Met–tRNA), mRNA oraz rozdzielonych podjednostek rybosomowych 40S i 60S, tworzących rybosom 80S. Proces ten składa się z kilku etapów, w których pośredniczą tzw. eukariotyczne czynniki inicjujące (Rys. II.14). Jednym z nich jest specyficzne rozpoznanie 5' kapu przez heterotrimeryczny kompleks białkowy eIF4F. Centrum kompleksu stanowi białko eIF4G wiążące dwa kolejne czynniki inicjujące: eIF4A – helikazę RNA umożliwiającą związanie rybosomu oraz jego przejście wzdłuż 5' UTR w kierunku kodonu inicjującego, oraz eIF4E bezpośrednio odpowiedzalne za rozpoznanie i związanie strukturu kapu. Przyłączenie kompleksu eIF4F do końca 5' mRNA jest dodatkowo wspomagane przez ogon poli-A na końcu 3' poprzez białko PABP (ang. *Poly-A-Binding Protein*). Obydwa końce mRNA tworzą zamkniętą pętlę mRNA, stymulowaną oddziaływaniem eIF4G–PABP.

Oddziaływanie eIF4E–eIF4G jest istotnym elementem kontroli translacji. Białko eIF4G oddziałuje z eIF4E fragmentem jedynie 15 aminokwasów.[71] Kilka innych białek zawierających podobny motyw może konkurować o miejsce wiążące z eIF4G, kontrolując w ten sposób przyłączenie mniejszej podjednostki rybosomu. Przykładem są białka 4E-BP (ang. *4E-Binding Protein*), które wiążą się z eIF4E prowadząc do inhibicji translacji. Proces związania 4E-BP jest kontrolowany przez fosforylację. Hipofosforylowane 4E-BP silnie wiążą się z eIF4E, natomiast fosforylacja 4E-BP prowadzi do osłabienia oddziaływania.[72] Za fosforylację 4E-BP odpowiada kinaza białkowa seryny/treoniny mTOR (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*). Białko mTOR bezpośrednio lub pośrednio poprzez kinazę S6K prowadzi do fosforylacji wielu białek zaangażowanych w inicjację translacji, w tym eIF4G. Czynniki wzrostu oraz mitogeny promują inicjację translacji przez aktywację mTOR prowadzącą do sekwencji fosforylacji w ścieżce sygnalizacyjnej PI3K/Akt lub RAS/MAPK.[72]

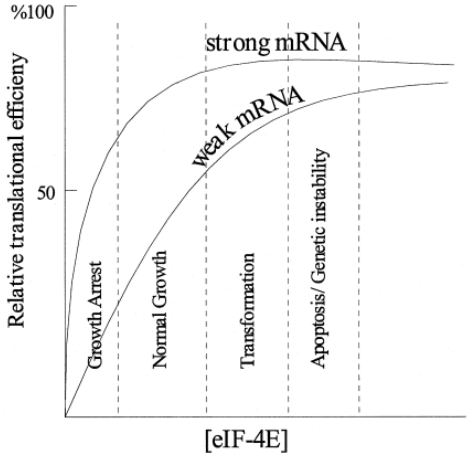


Rys. II.14. Schematyczne przedstawienie inicjacji translacji u Ekuaryota. Rysunek zaczerpnięto z pracy Schmidt et al. 2016.[73]

W normalnych warunkach komórkowych mRNA rywalizują o dostęp do kompleksu eIF4F, a konkretnie eIF4E bezpośrednio wiążącego strukturę kapu. Cząsteczki mRNA zawierające krótki, nieustrukturyzowany region 5' UTR nazywane są silnymi mRNA (ang. *strong mRNAs*) i ulegają efektywnej translacji nawet w niskich stężeniach eIF4E. Silne mRNA zwykle kodują białka niezbędne do utrzymania podstawowych funkcji komórkowych, tzw. *housekeeping genes*. Słabe mRNA posiadają długi, ustrukturyzowany region 5' UTR i są bardziej wrażliwe na zmiany stężenia eIF4E. Między innymi zawierają one protoonkogeny oraz geny kodujące białka regulatorowe wzrostu, np. czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), a także cyklinę D1, surwiwinę i c-myc.[74] Zależność wydajności translacji od stężenia eIF4E silnych i słabych mRNA zaprezentowano na Rys. II.15. Wydajność translacji silnych mRNA szybko osiąga maksimum w niskich stężeniach wolnego eIF4E. Wzrost stężenia eIF4E prowadzi do nieproporcjonalnego nasilenia translacji słabych mRNA. Ze względu na to, że kodują one zwykle białka regulujące wzrost komórki nasilona ekspresja może znacząco wpłynąć na biologię komórki prowadząc do transformacji i nowotworzenia.

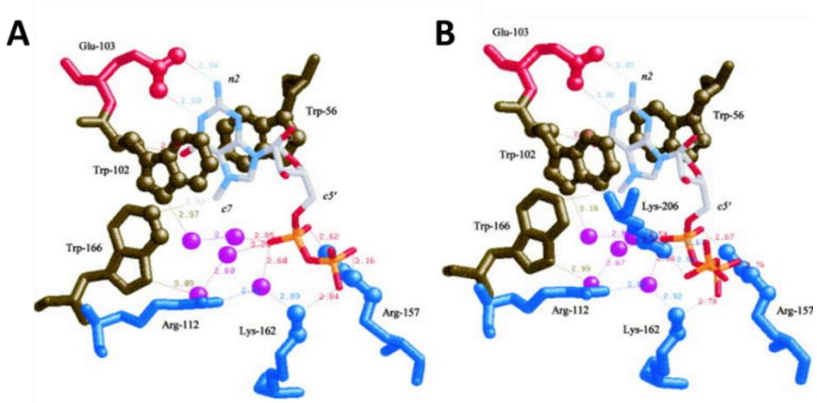
Poziom białka eIF4E może być zwiększany na różne sposoby, obejmujące zwiększoną ekspresję eIF4E, zmniejszoną ekspresję 4E-BP lub zwiększoną fosforylację 4E-BP na skutek hiperaktywacji wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych (PI3/Akt/mTOR lub

RAS/MAPK). Komórki nowotworowe wykazują aktywację ścieżek sygnałowych, prowadzących do fosforylacji 4E-BP oraz mogą także posiadać zredukowaną ekspresję 4E-BP. Ponadto często charakteryzują się nadekspresją eIF4E[75] – podwyższony poziom eIF4E został zidentyfikowany między innymi w nowotworach piersi,[76] głowy i szyi,[77] krtani i gardła,[78] pęcherza moczowego,[79] prostaty,[80] jelita grubego,[81] płuc,[82] szyjki macicy[83] oraz w chłoniakach.[84] Rola eIF4E w nowotworzeniu sprawia, że białko to jest ważnym celem terapeutycznym. Istnieje wiele podejść terapeutycznych nacelowanych na eIF4E, wykorzystujących małe cząsteczki, antysensowne RNA lub terapie genowe.



Rys. II. 15. Względna wydajność translacji silnego i słabego mRNA w funkcji stężenia białka eIF4E. Rysunek zaczerpnięto z pracy de Benedetti et al. 1999.[85]

Inhibitory translacji oparte o strukturę kapu silnie wiążące się z eIF4E także mogą posiadać właściwości przeciwnowotworowe. W rozpoznaniu kapu przez eIF4E pośredniczą dwa łańcuchy boczne tryptofanów Trp56 i Trp102 tworząc tzw. kanapkowy kompleks warstwowy (Rys. II.16). Ponadto kompleks kap–eIF4E stabilizowany jest poprzez trzy wiązania wodorowe z karboksylanami Glu103 i –NH Trp102 (łańcuch główny) oraz oddziaływania van der Waalsa pomiędzy grupą N7–metylową i Trp166. Łańcuch fosforanowy tworzy mostki solne oraz wiązania wodorowe z –NH Trp102 (z pośredniczącymi cząsteczkami wody), pierścieniami indolowymi Trp166 oraz łańcuchami bocznymi Arg112, Lys162 i Arg157. Struktury krystalograficzne mysiego eIF4E z m^7GDP lub m^7GpppG w kieszeni wiążącej zaprezentowano na Rys. II.16.[86]



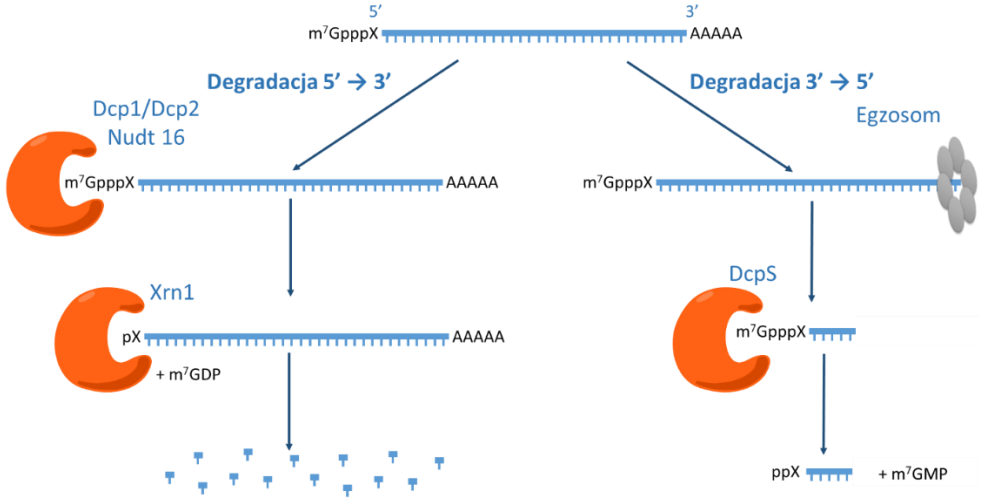
Rys. II. 16. Kompleks **A)** m^7GDP i **B)** m^7GpppG z białkiem eIF4E w oparciu struktury krystalograficzne (kod PDB 1EJ1). Wiązania wodorowe, mostki solne i oddziaływania van der Waalsa oznaczono liniami przerywanymi wraz z długością w Å. Cząsteczki wody przedstawiono w postaci fioletowych kulek. Fragmenty eIF4E odległe od kapu o ≤ 4Å zostały dodatkowo oznaczone sferami. Rysunek zaczerpnięto z pracy Niedzwiecka et al. 2002.[86]

II.2.6. Degradacja mRNA

Czas półtrwania makrocząsteczki mRNA jest krótki – od kilku minut w komórkach bakteryjnych, do kilku godzin w eukariotycznych, umożliwiając regulację ekspresji genów oraz nadając elastyczność transkryptomowi. Degradacja eukariotycznych mRNA zachodzi według kilku różnych mechanizmów. Przede wszystkim proces degradacji może być zależny lub niezależny od deadenylacji końca 3'. Przykładowo ssaczy mRNA *c-fos* oraz kilka drożdżowych mRNA nie ulega degradacji, dopóki ogon poli-A nie ulegnie skróceniu.[87] Wymagana długość poli-A po skróceniu różni się pomiędzy organizmami i wynosi 25–60 nukleotydów adeninowych u ssaków oraz 10–12 u drożdży. Wykazano, że u ssaków euakriotyczny czynnik inicjacji translacji eIF4E inhibuje dekaping *in vitro*[88] oraz, że mRNA zawierające syntetyczne struktury kapu, które mają wyższe powinowactwo do eIF4E są bardziej stabilne *in vivo*.[89] Wynik ten sugeruje, że eIF4E chroni kap przed dostępem enzymów dekapujących.

Następny etap degradacji mRNA może zachodzić dwoma ścieżkami, w zależności od kierunku degradacji (Rys. II.17). Na ścieżce 5'→3' kompleks enzymatyczny Dcp1/Dcp2 katalizuje hydrolizę 5' kapu pomiędzy α i β fosforanem z uwolnieniem cząsteczki m^7GDP. Pozostający monofosforylowany koniec 5' jest początkiem degradacji całego mRNA przez 5'–monofosforano-zależną 5'→3' egzonukleazę Xrn1. Za dekapping na ścieżce 5'→3' obok Dcp1/Dcp2 może odpowiadać także enzym Nudt16.

Innym sposobem degradacji eukariotycznych mRNA jest ścieżka 3'→5', na której wieloskładnikowy kompleks białkowy zwany egzosomem degraduje mRNA od końca 3', zostawiając strukturę kapu oraz fragment kilku nukleotydów. Rdzeń egzosomu stanowi struktura sześcioczłonowego pierścienia, do którego przyłączone są białka.[90] Kap jest następnie degradowany przez enzym DcpS (ang. *Decapping Scavenger enzyme*), który hyrolizuje wiązanie pirofosforanowe pomiędzy β i γ fosforanem z uwolnieniem cząsteczki m^7GMP.

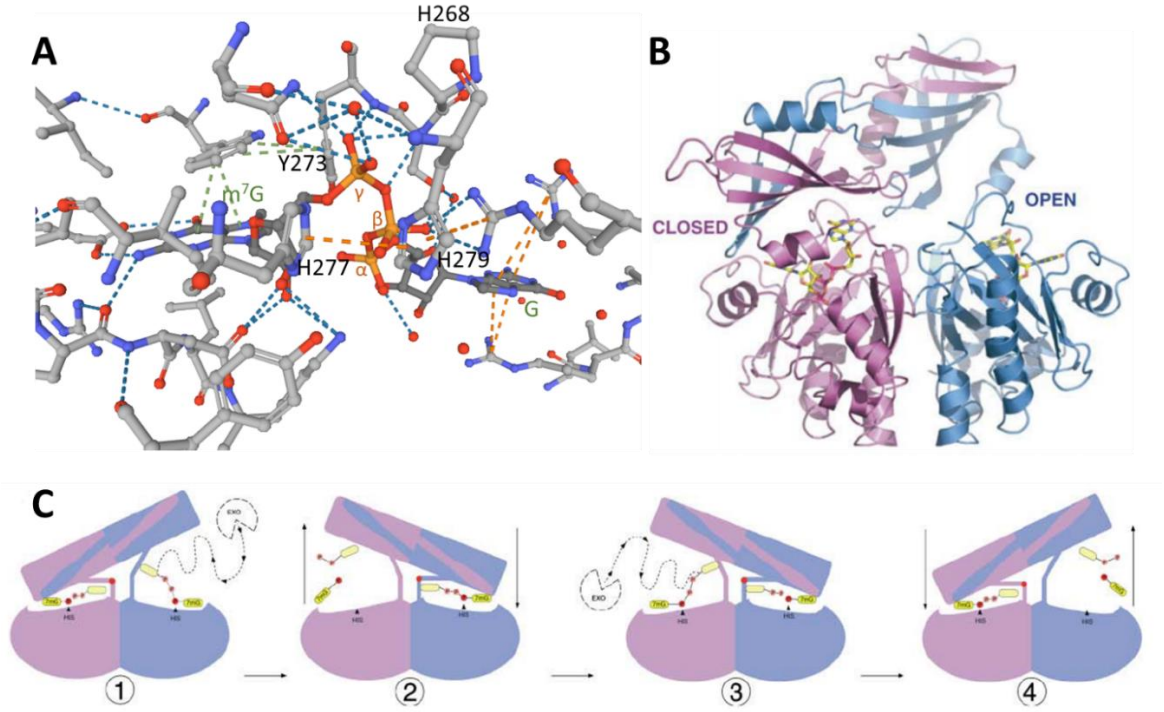


Rys.II.17. Schematyczne przedstawienie ścieżek degradacji mRNA w komórkach eukariotycznych.

Białko Dcp2 jest głównym enzymem dekapującym mRNA w komórkach.[91] Jego aktywność jest wzmacniana poprzez asocjację z podjednostką Dcp1, zachodzącą z udziałem dodatkowego czynnika Edc4.[92] Dcp2 jest członkiem nadrodziny białek Nudix, które odpowiadają głównie za hydrolizę niewielkiego zakresu substratów, złożonych z difosforanu nukleozydu.[93] Jest to ewolucyjnie zakonserwowana rodzina białek, zawierająca motyw złożony z sekwencji $GX_5EX_7REUXEEXGU$, gdzie U to aminokwas hydrofobowy, a X to dowolny aminokwas, formujący część uniwersalnego miejsca katalitycznego hydrolizy difosforanu. Dcp2 i Nudt16 są jedynymi ssaczymi białkami Nudix, które są zdolne do dekapingu mRNA, a proces

ten jest zależny od obecności jonów metali.[94] Enzym Dcp2 akceptuje substraty mRNA zawierające wyraźną strukturę pętli zlokalizowaną w obrębie pierwszych 10 transkrybowanych nukleotydów.[95]

Enzym dekapujący DcpS, aktywny na ścieżce degradacji 3'→5', jest członkiem rodziny pirofosfataz HIT, wykorzystujących triadę histydynową do niezależnej od obecności jonów metali hydrolizy kapu, w wyniku, której powstaje m^7GMP oraz 5'–difosforan RNA (pp–RNA).[96] Enzym DcpS, w przeciwieństwie do Dcp2, nie akceptuje kapowanych mRNA, zawierających więcej niż 10 nukleotydów.[96] Białka HIT przyjmują formę homodimeru poprzez formowanie antyrównoległej β–kartki, zawierającej 10 nici. Każdy protomer zawiera miejsce aktywne wiązania nukleotydu, koordynujące z jego wiązaniem pirofosforanowym w mostku oligofosforanowym przez trzy histydyny motywu HIT – H268, H277 i H279 (Rys. II.18A).[97] Na podstawie struktur krystalograficznych DcpS z analogami kapu stwierdzono, że przyjmuje on formę asymetrycznego dimeru, w którym jeden proteom tworzy kompleks DcpS–kap w otwartej, nieaktywnej katalitycznie konformacji, a drugi w konformacji zamkniętej i aktywnej katalitycznie, różniącej się od kompleksu otwartego przesunięciem 30Å domeny N-końcowej (Rys. II.18B). Tyrozyna 273 także odgrywa istotną rolę w wiązaniu kapu i przyjmuje ona tę samą konformację w zarówno otwartym, jak i zamkniętym stanie DcpS, tworząc oddziaływania van der Waalsa z 7-metyloguaniną. Jednak sam proces wiązania kapu prowadzi do obrotu Y273 o 90°.[98] Zmiany położenia Y273 w formie DcpS związanej i niezwiązanej z kapem prowadzą do zmiany oddziaływań także z innymi aminokwasami.



Rys.II.18. A) Fragment struktury białka DcpS w kompleksie z m^7GpppG (kod PDB: 1ST0) ze zbliżeniem na miejsce wiążące ligand, z zaznaczoną triadą histydynową oraz tyrozyną 273; **B)** Przedstawienie struktury dimeru DcpS (protomer A – różowy, zamknięty, protomer B – niebieski, otwarty); **C)** Schematyczne przedstawienie dimeru DcpS w kompleksie z kapem lub krótkim kapowanym mRNA. Rysunki na panelach **B** i **C** zaczerpnięto z pracy Gu, et al. 2004.[94]

W trakcie wiązania substratu, hydrolizy oraz uwolnienia produktów enzym DcpS przechodzi znaczne zmiany konformacyjne. Przebieg cyklu, w którym dimer DcpS katalizuje degradację kapu został przedstawiony na Rys. II.18C. Gdy jeden z monomerów ma konformację

zamkniętą, wymusza przyjęcie przez drugi konformacji otwartej, umożliwiającej związanie krótkiego kapowanego mRNA. Gdy mRNA jest degradowane do odpowiedniej długości strona otwarta zamyka się na strukturze kapu, umożliwiając drugiemu protomerowi uformowanie produktywnego miejsca aktywnego poprzez wymuszenie otwarcia uprzednio zamkniętej konformacji i w ten sposób pozwalając na uwolnienie produktów m^7GMP i pp–RNA. Po oddyfundowaniu produktów rozpoczyna się kolejny cykl związania krótkiego mRNA, zamknięcia, hydrolizy, otwarcia i uwolnienia produktów degradacji 5’ kapu.[94]

Enzym DcpS odgrywa ważną rolę w schorzeniu, jakim jest rdzeniowy zanik mięśni SMA (ang. *Spinal Muscular Atrophy*). Jest to choroba genetyczna, spowodowana mutacją lub delecją obydwu kopii genu SMN1, kodującego białko SMN (ang. *Survival Motor Neuron*). Schorzenie objawia się degeneracją neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, co prowadzi do hipotonii i osłabienia mięśni. Postać choroby zależy od zmienności liczby drugiej kopii genu – SMN2, produkującego mRNA, w którym splicing nie zaszedł prawidłowo (alternatywny splicing) i doprowadził do delecji ostatniego eksonu. Produkcja pełnego transkryptu genu SMN2 może wynosić od 10% do 50%.[99] Niski poziom białka SMN umożliwia rozwój zarodkowy jednak nie jest wystarczający do utrzymania przeżycia neuronów ruchowych rdzenia kręgowego. W ostatnich latach odkryto, że C5–podstawione chinazoliny zwiększają ekspresję genu SMN2 dwukrotnie. Stosując radioznakowaną C5–podstawioną sondę chinazolinową enzym DcpS został zidentyfikowany, jako potencjalne białko wiążące sondę. C5–podstawione chinazoliny inhibują także aktywność DcpS, a stopień inhibicji koreluje ze stopniem indukcji promotora SMN2.[100] Związanie inhibitora sprawia, że DcpS pozostaje w otwartej, nieaktywnej katalitycznie konformacji. Powiązanie enzymu DcpS z SMA sprawia, że jest on celem terapeutycznym, a jego inhibitory potencjalnymi lekami w terapii przeciwko SMA.

II.3. Białka związane z metabolizmem końca 5’ mRNA

Białka biorące udział w biosyntezie oraz wiążące 5’ kap odgrywają ważne role regulatorowe w ekspresji genów i często stanowią cel terapeutyczny. W niniejszym rozdziale scharakteryzowano trzy wybrane białka metabolizujące koniec 5’ mRNA: eukariotyczny czynnik translacji eIF4E, enzym dekapujący DcpS oraz mRNA kap N7–guanino metylotransferazę (N7–MTaza), odpowiedzialną za specyficzną metylację pozycji N7 Gppp–RNA. Zaprezentowane zostały metody literaturowe stosowane do badań tych białek, a także zidentyfikowane inhibitory ich aktywności.

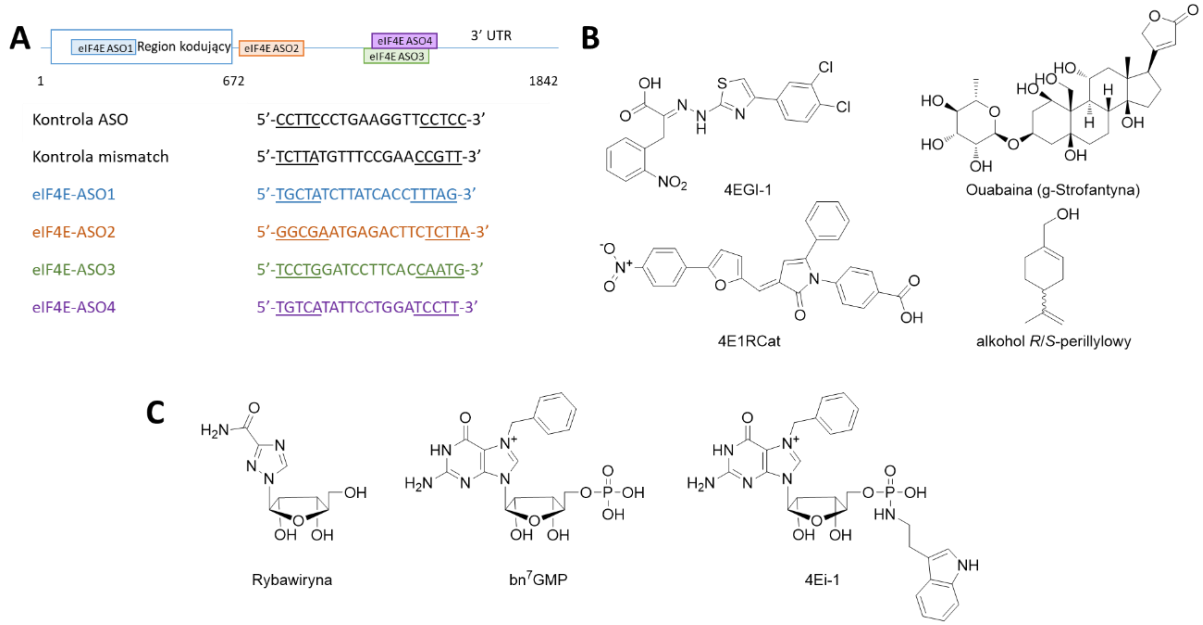
II.3.1. eIF4E

Eukariotyczny czynnik inicjacji translacji eIF4E jest elementem kompleksu inicjującego translację bezpośrednio odpowiedzialnym za wiązanie struktury kapu. W rozdziale II.2.5 opisano rolę białka eIF4E w nowotworzeniu – jego zwiększone stężenie jest charakterystyczne dla komórek nowotworowych. Może być ono spowodowane nie tylko nadekspresją eIF4E, ale także zmniejszoną ekspresją lub zwięszkoną fosforylacją 4E-BP.

W literaturze opisanych jest kilka podejść nakierowanych na obniżenie ekspresji lub aktywności białka eIF4E. Jednym z nich jest zastosowanie specyficznych dla eIF4E antysensownych oligonukleotydów ASO (ang. *Antisense Oligonucleotide*). Wprowadzone do komórek ASO specyficznie wiążą się z mRNA kodującym eIF4E, prowadząc do zahamowania ekspresji białek regulowanych przez eIF4E (np. VEGF, cykliny D1, c-myc), apoptozy oraz

zapobiegania tworzenia struktur przypominających naczynia przez komórki śródbłonka. Wykazano, że podanie dożylne ASO obniża ekspresję eIF4E w ludzkich ksenoprzeszczepach (ang. *human xenograftis*), a także znacząco hamuje wzrost guza.[101] Oligonukleotydy ASO rozpoznają konkretne mRNA i hybrydyzując indukują jego degradację przez RNazę H. ASO drugiej generacji zbudowane są z 20 nukleotydów i zawierają na swoich końcach pięć 2-metoksyetylo–modyfikowane zasady azotowe otaczające pozostałych 10 nukleotydów 2’-deoksytiofosforanowych, dzięki czemu ich powinowactwo do mRNA, odporność na nukleazy oraz czas półtrwania w tkankach zostały poprawione (Rys. II.19A).

Kolejnym podejściem obniżenia aktywności eIF4E jest zaadresowanie procesu wiązania eIF4E–eIF4G, który jest niezbędny do inicjacji zależnej od kapu translacji. Wiązanie zachodzi na powierzchni eIF4E przeciwległej do miejsca wiązania kapu. Formowanie kompleksu eIF4E–eIF4G jest regulowane przez konkurencję o miejsce wiążące w eIF4E pomiędzy eIF4G i 4E-BP. Poza 4E-BP jednym z najsilniejszych zidentyfikowanych związków inhibujących aktywność eIF4E poprzez związanie w kieszeni wiążącej eIF4G jest 4EGI-1 (Rys. II.19B).[102] Związek ten wzmacnia aktywność pro-apoptotyczną oraz hamuje wzrost wielu linii nowotworowych. Jego działanie prowadzi do śmierci komórek w liniach Jurkat oraz wielu komórkach szpiczaka, a także do obniżenia proliferacji linii nowotworu płuc A549.[103] Innym przykładem małocząsteczkowego inhibitora interferującego z eIF4G jest 4E1RCat (Rys. IV.19B), prowadzący do zahamowania translacji.[104] Wykazano, że glikozyd nasercowy Ouabaina (g-Strofantyna) zaburza asocjację eIF4E–eIF4G, przez co inhibuje proces translacji oraz reguluje swój właściwy cel – czynnik transkrypcyjny regulowany hipoksją 1 HIF-1 (Rys.IV.19B).[105] W komórkach raka prostaty zaobserwowano także, że alkohol perillylowy destabilizuje tworzenie kompleksu eIF4E–eIF4G hamując proces translacji (Rys. IV.19B).[106]



Rys.II.19. A) Cztery sekwencje ASO specyficzne na eIF4E, wykorzystane do redukcji eIF4E w ludzkich i mysich komórkach. Modyfikowane 2-metoksyetylo nukleotydy zostały podkreślone;[101] **B)** Przykłady inhibitorów translacji, oddziałujących z eIF4E w miejscu wiązania eIF4G; **C)** Przykłady inhibitorów translacji oddziałujących z eIF4E w miejscu wiążącym kap.

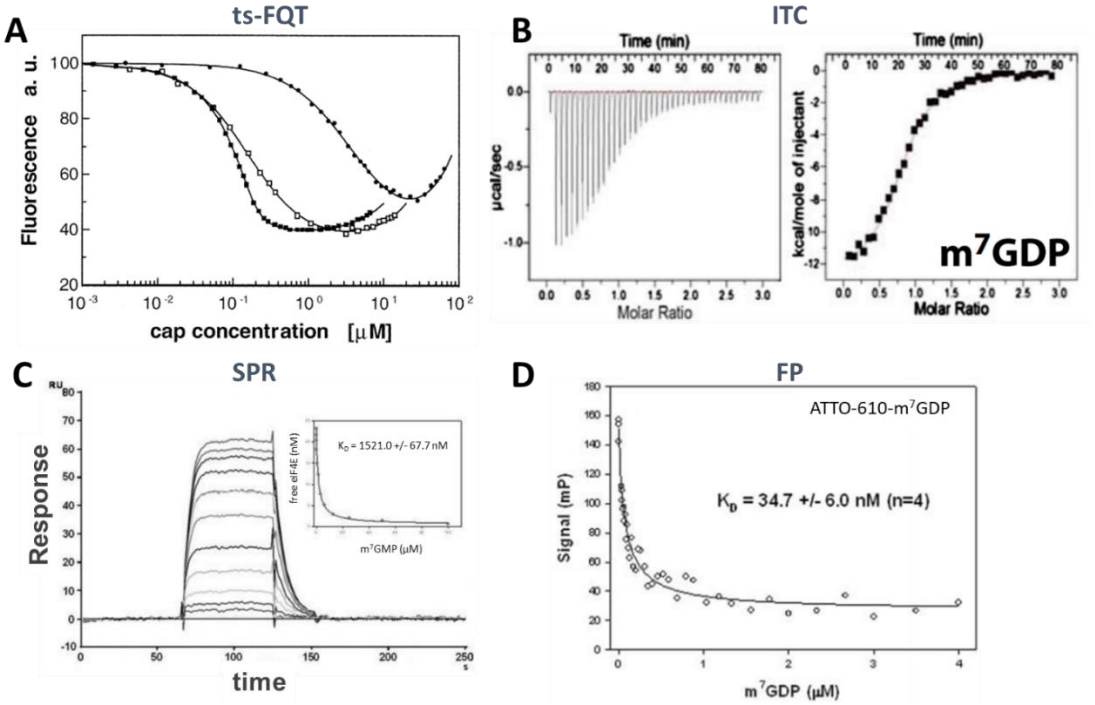
Inhibicję translacji można wywołać na skutek oddziaływania inhibitora z eIF4E zarówno w miejscu wiążącym eIF4G, jak i 5’ kap. Jednym z najbardziej znanych inhibitorów tego ostatniego jest rybawiryna, będąca pochodną nukleozydu z 2,4-triazol-3-karboksyamidem w miejscu zasady azotowej (Rys. II.19C). Zaobserwowano, że rybawiryna wiąże się z eIF4E z

mikromolarnym powinowactwem, konkurując z kapem. W rezultacie prowadzi to do zahamowania transformacji onkogenicznej, w której pośredniczy eIF4E, jak również wzrostu guza *in vitro* oraz *in vivo*.[107] Opracowano także wiele analogów nukleotydów 7-metyloguaninowych, silnie wiążących się z eIF4E i prowadzących do zahamowania translacji. Przykładem modyfikacji nukleotydowej jest substytucja nukleofilowa pozycji N7 guaniny (Rys. II.19C). Monofosforan 7-benzyloguanozyny (bn^{7}GMP) ma wysokie powinowactwo do eIF4E i blokuje wiązanie z kapem mRNA.[108] Związek ten działa efektywnie w układach niekomórkowych oraz zarodkach danio pręgowanego (*Danio rerio*), jednak jego aktywność w komórkach jest niska ze względu na słabe przenikanie przez błonę komórkową. Aby rozwiązać ten problem zaprojektowano prolek (pronukleotyd), który może przenikać błonę i jest aktywowany wewnątrz komórki. Prolek będący analogiem bn^{7}GMP o nazwie 4Ei-1 (Rys. II.19C) zawiera grupę tryptaminową, wprowadzoną w obrębie amidofosforanu, który to charakteryzuje się niską toksycznością, wysoką rozpuszczalnością oraz stabilnością.[109]

Projektowanie inhibitorów eIF4E oddziałujących w obydwu miejscach wiążących (eIF4G i kapu) wykorzystuje informację o sile wiązania (powinowactwie) liganda do eIF4E. W tym celu niezbędne są metody biofizyczne, przy pomocy, których możliwe jest scharakteryzowanie procesu wiązania białko–ligand oraz wyznaczenie jego parametrów fizycznych. Często zdolność ligandów do inhibicji translacji jest skorelowana ze stabilnością ich kompleksu z eIF4E.[86] Jedną z najszerzej stosowanych metod do badań białka eIF4E jest miareczkowanie białka ligandem wraz z pomiarem zmian intensywności fluorescencji tryptofanów w miejscu wiążącym tsFQT (ang. *time-synchronized Fluorescence Quenching Titration*).[110] W metodzie tej roztwór białka o stałym stężeniu umieszczany jest w kuwecie kwarcowej, do której w równych odstępach czasowych dodawane są kolejne porcje badanego analogu kapu. Po każdorazowym dodaniu liganda rejestrowana jest intensywność fluorescencji tryptofanu (λ_{exc} = 280–290 nm; λ_{em} = 340–360 nm; Rys. II.20A). Ze względu na niskie wartości wydajności kwantowej oraz molowego współczynnika absorpcji tryptofanu pomiary wykonywane są w temperaturze 20°C. W ulepszonej metodzie w analizie danych uwzględniono także poprawki na czynniki wpływające na zmiany rejestrowanego sygnału fluorescencyjnego.[86] Przede wszystkim widma absorpcji oraz emisji analogów kapu (zawierających 7-metyloguaninę) i tryptofanu pokrywają się w pewnym zakresie, co uniemożliwia selektywne wzbudzanie tryptofanów białka. Prowadzi to do zaburzenia plateau stanu wysyconego, co przekłada się na błąd w wyznaczeniu stałej dysocjacji kompleksu. Zatem analiza sygnału wymaga uwzględnienia poprawek na rozcieńczenie próbki w trakcie miareczkowania oraz interferencji mierzonego sygnału z emisją kapu. W ten sposób wyznaczane stałe asocjacji odzwierciedlają rzeczywiste powinowactwo kapu do eIF4E.

Kalorymetria jest kolejną techniką biofizyczną użyteczną w badaniach wiązania białko–ligand. Izotermiczna kalorymetria miareczkująca ITC (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*) stosowana jest w ilościowych badaniach termodynamicznych oddziaływań substancji w roztworze. Stosujac ITC możliwe jest wyznaczenie stałej asocjacji kompleksu, a także zmian entalpii procesu (ΔH). Analiza van't Hoffa pozwala na obliczenie także swobodnej energii Gibbsa (ΔG) oraz entropii (ΔS) procesu. W trakcie eksperymentu białko jest miareczkowane kolejnymi porcjami liganda, co powoduje uwolnienie lub pochłonięcie ciepła z otoczenia (w zależności od typu procesu). Pomiar polega na rejestracji zmian mocy potrzebnych do utrzymania tej samej temperatury w odniesieni do próbki kontrolnej. W procesie egzotermicznym temperatura próbki rośnie wraz z dodawaniem porcji liganda, prowadząc do spadku mocy.[111] W rezultacie dane eksperymentalne zawierają ostre sygnały, z których każdy

koresponduje z injekcją liganda. Przykładową krzywą miareczkowania białka eIF4E3 (wariant podrodziny) ligandem m^7GDP wyznaczoną metodą ITC zaprezentowano na Rys. II.20B.



Rys.II.20. Metody biofizyczne w badaniach wiązania kap–eIF4E. **A)** Krzywe wiązania m^7GTP (kwadrat), m^7GpppG (otwarty kwadrat) i $m_3^{2,2,7}$GTP (koło) z eIF4E wyznaczone metodą tsFQT (zaczerpnięte z pracy Niedzwiecka et al. 2002[86]); **B)** Krzywa wiązania m^7GDP z eIF4E3 wyznaczona metodą ITC (zaczerpnięte z pracy Osborne et al. 2013[112]); **C)** Krzywa miareczkowania m^7GMP z eIF4E–eIF4G wyznaczona metodą SPR (zaczerpnięte z pracy Visco et al. 2015[113]); **D)** Krzywa wiązania kompetycyjnego m^7GDP z eIF4E–eIF4G w obecności sondy ATTO-610-m^7GDP, wyznaczona metodą FP (zaczerpnięte z pracy Visco et al. 2015[113]).

Następnym przykładem metody biofizycznej stosowanej w badaniach białek jest powierzchniowy rezonans plazmonowy SPR (ang. *Surface Plasmon Resonance*). SPR to zjawisko indukowanej światłem, rezonansowej oscylacji przewodzących elektronów na granicy materiałów o dodatniej i ujemnej przenikalności elektrycznej. Wykorzystuje ona metodę optyczną pomiaru zmian współczynnika załamania w bliskiej odległości powierzchni metalu, która może być wykorzystana do monitorowania wiązania molekuł z receptorem immobilizowanym na tej powierzchni. Jeśli cząsteczki analitu oddziałują z receptorem pojawia się mierzalna zmiana współczynnika załamania przy powierzchni metalu.[114] Metoda ta pozwala na pomiary oddziaływań o wysokim powinowactwie z wykorzystaniem informacji o wzroście rozmiaru białka na skutek utworzenia kompleksu z ligandem. W jednej z prac autorzy przedstawili możliwość zastosowania SPR do wyznaczania stałych powinowactwa analogów kapu do kompleksu eIF4E–eIF4G.[113] Wykorzystano w tym celu oligonukleotyd immobilizowany na powierzchni sensora pokrytego streptawidyną. W celu wyznaczenia stałej asocjacji m^7GMP do eIF4E–eIF4G wykonano injekcje roztworów zawierających białka w stałym stężeniu wraz z rosnącymi ilościami liganda (Rys. II.20C).

W tej samej pracy opracowano także metodę wyznaczania stałych asocjacji ligandów do eIF4E z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych analogów kapu – ATTO-610-m^7GDP i ATTO-610-m^7Gp_5G oraz pomiarów polaryzacji fluorescencji FP (ang. *Fluorescence Polarization*). Miareczkując roztwór sondy w stałym stężeniu białkiem możliwe jest wyznaczenie stałej dysocjacji kompleksu sonda–eIF4E, co objawia się zwiększeniem polaryzacji

fluorescencji. Następnie w eksperymencie kompetycyjnym sondę i białko w stałym stężeniu miareczkuje się ligandem, którego powinowactwo ma zostać docelowo wyznaczone, wypierającym sondę fluorescencyjną z miejsca wiążącego prowadząc do obniżenia sygnału FP (Rys. II.20D).[113] Wybór dwóch różnych sond podyktowany był ich różnym powinowactwem do kompleksu eIF4E–eIF4G. Dłuższy łańcuch fosforanowy zwiększa powinowactwo kapu do eIF4E, między innymi na skutek oddziaływania z lizyną 209.[115]

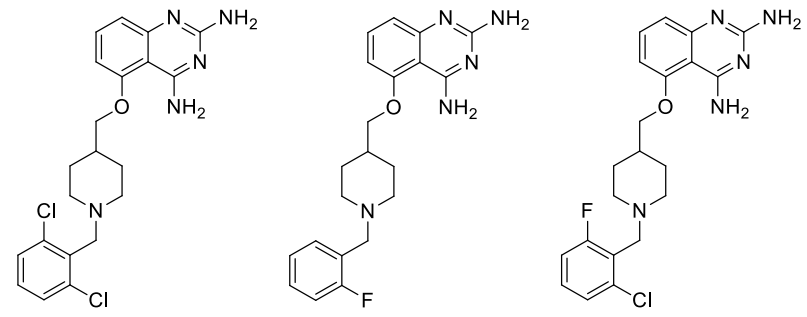
Tabela II.2. Charakterystyka metod literaturowych najczęściej wykorzystywanych w badaniach wiązania ligandów z eIF4E.

Metoda	Źródło sygnału	Zalety	Wady
tsFQT	wygaszanie fluorescencji tryptofanu	– precyzyjna metoda pozwalająca na wyznaczanie stałych powinowactwa z dużą dokładnością; – nie wymaga stosowania znaczników; – badanie bezpośredniego wiązania liganda z białkiem.	– spadek czułości w temperaturach powyżej 20°C, ze względu na słabą emisję tryptofanu; – interferencja z emisją analogów kapu; – nie jest metodą wysokoprzepustową (HTS).
ITC	zmiany mocy potrzebne do utrzymania stałej temperatury próbki w odniesieniu do kontroli	– możliwość precyzyjnego wyznaczenia stałej asocjacji oraz parametrów termodynamicznych wiązania (ΔH, ΔG, ΔS); – nie wymaga stosowania znaczników; – badanie bezpośredniego wiązania liganda z białkiem.	– wymagane duże ilości białka; – nie jest metodą wysokoprzepustową (HTS).
SPR	zmiana współczynnika załamania przy powierzchni metalicznej;	– umożliwia badanie tworzenia kompleksów o wysokim powinowactwie; – nie wymaga stosowania znaczników.	– nie jest metodą wysokoprzepustową (HTS).
FP	zmiana polaryzacji (anizotropii) fluorescencji	– brak interferencji fluorescencji znacznika z naturalną emisją kapu; – spełnia warunki wysokoprzepustowości (HTS).	– konieczność stosowania znaczników fluorescencyjnych; – wiązanie liganda pośrednie, na skutek wypierania sondy fluorescencyjnej z miejsca wiążącego.

II.3.2. DcpS

Enzym DcpS katalizuje hydrolizę 5’ kapu na ścieżce degradacji 3’→5’ z uwolnieniem m^7GMP. W rozdziale II.2.6 została opisana rola inhibitorów DcpS – C5–podstawionych chinazolin, w leczeniu schorzenia genetycznego, jakim jest SMA. Związki te wykazują zdolność do inhibicji DcpS silnie korelującą z aktywacją promotora SMN2. Jednym z najsilniejszych inhibitorów tego typu jest 2,6-dichlorobenzylo pochodna, znana pod nazwą RG3039 (Rys. II.21). Myszy z SMA traktowane RG3039 wykazywały zależny od dawki wzrost w przeżywalności, wadze oraz funkcjach motorycznych.[116] Efekt ten powiązano z poprawą działania neuronów ruchowych oraz złącza nerwowo-mięśniowego, a także funkcji i rozmiaru mięśni. Z tego względu RG3039 został wyselekcjonowany do dalszych prac w badaniach klinicznych. Może on także znaleźć zastosowanie we wspomaganiu już istniejących terapii opartych na antysensownych oligonukleotydach, bądź terapii genowych. Związek RG3039 w roku 2012 przeszedł pierwszą fazę testów klinicznych, a zebrane dane wskazywały na wysokie

bezpieczeństwo stosowania wśród zdrowych ochotników.[117] W 2014 roku na konferencji Cure SMA zaprezentowano wyniki, według których RG3039 inhibuje 90% DcpS, jednak poziom białka SMN nie ulega zmianie. Zwiększenie poziomu białka SMN zostało uznane za konieczne w terapii, a sam RG3039 okazał się być nieefektywny u pacjentów z SMA, dlatego zawieszono dalsze badania kliniczne.[118]



Rys.II.21. Struktury C5–podstawionych chinazolin, będących inhibitorami DcpS stosowanych w terapii przeciwko SMA wraz z podanymi wartościami IC_{50}.[119]

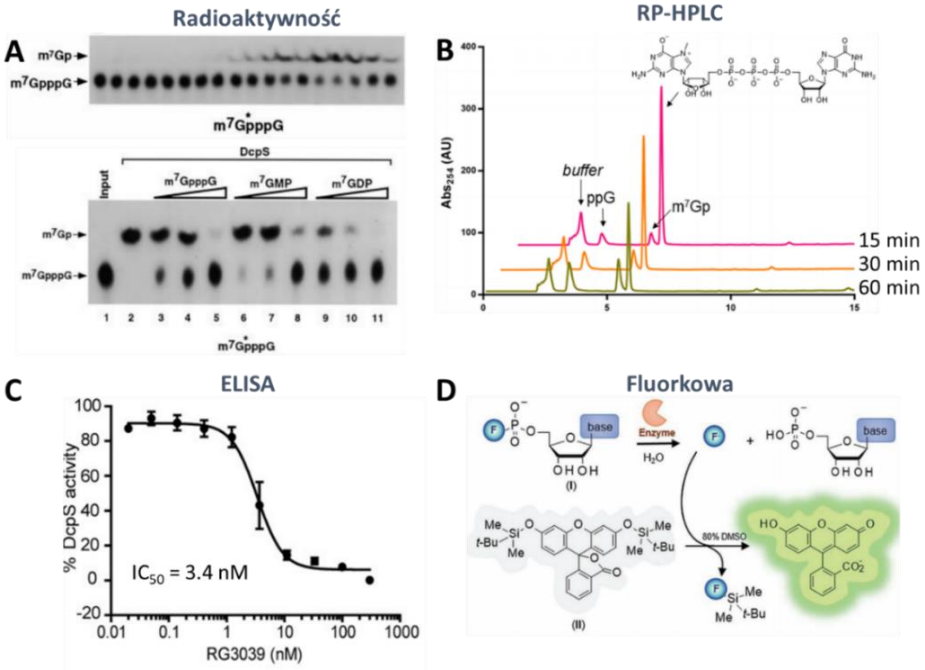
Analogicznie, jak w przypadku eIF4E poszukiwania inhibitorów DcpS wymagają stosowania odpowiednich metod biofizycznych, pozwalających na monitorowanie reakcji enzymatycznej lub wiązania ligand–białko. Znakowanie substratu pierwiastkiem radioaktywnym jest jedną z metod stosowanych w badaniach enzymu DcpS. Przykładem zastosowania metody radioaktywnej jest degradacja analogu kapu m^7G*pppG, zawierającego ^{32}P (czas półtrwania 14,29 dni).[96] Produkty reakcji rozdzielane były z użyciem chromatografii cienkowarstwowej TLC (ang. *Thin-Layer Chromatography*) z celulozą polietylenoiminową (PEI). Na Rys. II.22A zaprezentowano postęp degradacji m^7G*pppG wizualizowany na płytce PEI TLC w obecności białka DcpS z różnych frakcji oczyszczania. Im większa zawartość DcpS, tym większy postęp reakcji, widoczny poprzez zmniejszenie intensywności prążka m^7G*pppG oraz zwiększenie m^7G*p. Na tym samym panelu przedstawiono wizualizację płytki PEI TLC z nałożonymi próbkami m^7G*pppG po inkubacji z DcpS oraz trzema innymi analogami kapu: m^7GpppG, m^7GMP oraz m^7GDP w rosnących stężeniach. Kap m^7GpppG jest substratem reakcji, zatem konkuruje o miejsce wiążące stąd też większa ilość niezdegradowanego m^7G*pppG. Produkt reakcji m^7GMP konkuruje z m^7G*pppG podobnie do m^7GpppG, natomiast m^7GDP jest silnym inhibitorem degradacji, nieulegającym hydrolizie.[120]

Kolejnym przykładem klasycznej metody śledzenia postępu degradacji kapu przez DcpS jest rozdział mieszaniny poreakcyjnej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconych fazach RP HPLC (ang. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*), w której to związki ulegają rozdziałowi ze względu na hydrofobowość. Analizowane związki oddziałują ze złożem kolumny, po czym wymywane są gradientem odpowiednio dobranego buforu. W przypadku nukleotydów najbardziej popularnym detektorem jest detektor absorpcyjny, ze względu na ich silną absorpcję promieniowania o długości fali około 260 nm. Analogi kapu posiadają dodatkowo właściwości fluorescencyjne, zatem rejestracja intensywności fluorescencji związków wymywanych kolejno ze złoża także niesie informację o postępie reakcji hydrolizy. Na Rys. II.22B przedstawiono przykładowe chromatogramy RP HPLC, zarejestrowane dla mieszanin m^7GpppG z DcpS po inkubacji 15, 30

i 60-minutowej.[121] Postęp reakcji może być obserwowany w miarę zmniejszania intensywności sygnału m^7GpppG oraz zwiększenia intensywności sygnałów m^7GMP i GDP.

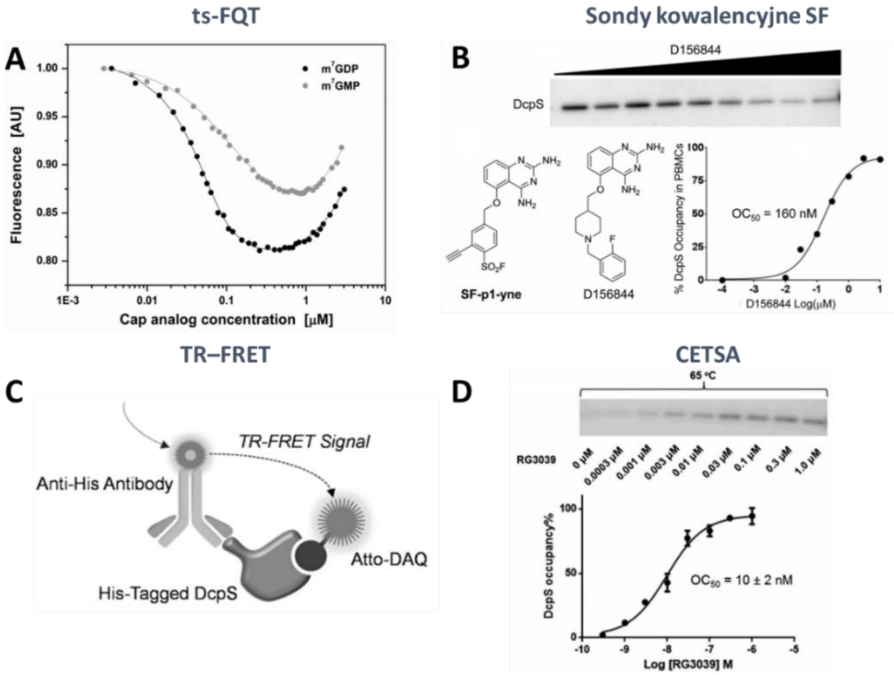
Testy immunoenzymatyczne ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) również są stosowane w celu ilościowego oznaczenia powstającego produktu reakcji. Można z powodzeniem stosować je w badaniach degradacji kapu przez DcpS z wykorzystaniem analogu kapu m^7GpppA, znakowanego biotyną w pozycji N6 adenozyny. Test ELISA został wykorzystany do charakterystyki inhibicji DcpS przez RG3039. Ilość powstającego produktu ADP(N6)-biotyna oszacowano poprzez immobilizację na płytce pokrytej streptawidyną, a następnie detekcję z użyciem przeciwciała pierwszorzędowego ADP[2] oraz drugorzędowego HRP-Goat anti-Mouse IgG inkubowanego z substratem TMB. Na tej podstawie została wygenerowana krzywa inhibicji, obrazująca ilość powstającego ADP(N6)-biotyna w obecności rosnących stężeń inhibitora RG3039 (Rys. II.22C).[117]

Kinetykę enzymu DcpS można także badać z użyciem metod fluorescencyjnych. W jednej z prac autorzy wykorzystali zdolność jonów fluorkowych F^- do usuwania grup tertbutylodimetylosililowych, które przyłączone do grup hydroksylowych fluoresceiny wygaszają jej fluorescencję. Enzym DcpS hydrolizuje analog kapu modyfikowany grupą fluorofosforanową (m^7GMPF) z uwolnieniem jonu fluorkowego oraz m^7GMP. Po dodaniu do mieszaniny wygaszonej sondy fluoresceinowej jony fluorkowe powodują wzrost intensywności fluorescencji, zależny od ich stężenia w mieszaninie. Stosując opisaną metodę scharakteryzowano szereg inhibitrów enzymu DcpS, głównie nukleotydowych.[121, 122]



Rys.II.22. Metody biofizyczne w badaniach enzymatycznej degradacji kapu, katalizowanej przez enzym DcpS. **A)** Wizualizacja płytki PEI TLC z reakcji degradacji m^7G*pppG przez DcpS w różnych frakcjach oczyszczania białka, o zawartości DcpS rosnącej od lewej do prawej. Poniżej przedstawiono wizualizację płytki PEI TLC z reakcji degradacji m^7G*pppG w obecności trzech kompetytorów: m^7GpppG, m^7GMP i m^7GDP (zaczerpnięte z pracy Liu et al. 2002[96]); **B)** Profile RP-HPLC, zarejestrowane po 15, 30 i 60 minutach od rozpoczęcia inkubacji enzymu DcpS z m^7GpppG (zaczerpnięte z pracy Wojtczak et al. 2018[121]); **C)** Krzywa inhibicja aktywności DcpS w ekstraktach białkowych z mysich mózgów przez RG3039 wyznaczona testem ELISA (zaczerpnięte z pracy Meerbeke et al. 2013[117]); **D)** Schemat działania metody fluorkowej w badniach kinetyki DcpS (zaczerpnięte z pracy Baranowski, Nowicka et al. 2016[122]).

Powinowactwo liganda do DcpS może zostać wyrażone w postaci stałej dysocjacji, jeśli nie ulega on reakcji hydrolizy enzymatycznej w trakcie procesu. Obecność tryptofanów w miejscu aktywnym enzymu oraz wygaszczanie ich fluorescencji w trakcie wiązania kapu pozwala na zastosowanie metody tsFQT opisanej szczegółowo w rozdziale II.3.1 (Rys. II.23A).[123] Interesującym przykładem metody badania powinowactwa ligandów do enzymu DcpS jest wykorzystanie małocząsteczkowych kowalencyjnych inhibitorów, reagujących z tyrozyną w miejscu aktywnym. Związki te, zaprojektowane w oparciu o strukturę inhibitora D153249, zawierały reaktywny fluorek sulfonylu SF (ang. *Sulfonyl Fluoride*) i inhibowały aktywność DcpS z subnanomolarnym IC_{50}. Analog podstawiony grupą SF w pozycji *para* oraz zawierający dodatkowo grupę alkinową (SF-p1-yne) został wykorzystany w badaniach wiązania kompetycyjnego inhibitorów w eksperymentach komórkowych. W tym celu ludzkie komórki jednojądrzaste krwi obwodowej PBMC (ang. *Peripheral Blood Mononucleated Cells*) inkubowano z inhibitorem D156844 przez 2h, po czym traktowano je roztworem SF-p1-ynu, a następnie przeprowadzano lizę komórek oraz reakcję CuAAC z azydkiem biotyny. Stosując wychwyt DcpS przez streptawidynę oraz wizualizację analizą Western blot możliwe było obliczenie densytometryczne ilości DcpS (Rys. II.23B).[124] Eksperyment ten umożliwił wyznaczenie stężenia inhibitora D156844, w którym 50% miejsc aktywnych DcpS jest obsadzone (tzw. OC_{50}) i wynosiło ono 160 nM.



Rys.II.23. Metody biofizyczne w badaniach wiązania kap–DcpS. **A)** Krzywe wiązania m^7GDP z DcpS wyznaczone metodą tsFQT (zaczerpnięte z pracy Wypijewska et al. 2012[120]); **B)** Western blot wyizolowanych kompleksów DcpS z sondą SF oraz krzywa inhibicji D156844 uzyskana densytometrycznie (zaczerpnięte z pracy Hett et al. 2015[124]); **C)** Schematyczne przedstawienie metody TR–FRET wykorzystującej fluorescencyjną sondę Atto-DAQ oraz przeciwciało anty-His znakowane terbem (zaczerpnięte z pracy Xu et al. 2016[125]); **D)** Zastosowanie metody CETSA do badań inhibicji DcpS przez inhibitor RG3039 (zaczerpnięte z pracy Xu et al. 2016[125]).

Zjawiska fluorescencyjne także z powodzeniem zaadaptowano do badań tworzenia kompleksu ligand–DcpS w postaci metody czasowo-rozdzielczego rezonansowego transferu energii Förstera TR–FRET (ang. *Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer*). Metoda ta zosała zastosowana w eksperymentach kompetycyjnego wiązania RG3039 z użyciem sondy fluorescencyjnej Atto-DAQ. Znacznik fluorescencyjny Atto był przyłączony do pierścienia

piperydyny struktury inhibitorowej. Zjawisko FRET generowane było na skutek związania przeciwciała anty-His z his-tagiem wprowadzonym w strukturę DcpS, znakowanym terbem (lantanowiec o właściwościach fluorecencyjnych). Zasadę działania metody oraz schemat sondy zaprezentowano na Rys. II.23C.[125]

Ostatnim omawianym przykładem metody badania powinowactwa inhibitorów do białka DcpS jest CETSA (ang. *Cellular Thermal Shift Assay*).[126] W metodzie tej lizaty komórkowe podgrzewane są do różnych temperatur, a obecność docelowego białka we frakcji rozpuszczalnej jest ilościowo wyznaczana techniką Western blot lub spektrometrią mas. W przypadku enzymu DcpS metodę CETSA wykorzystano poprzez potraktowanie komórek badanym inhibitorem, chroniącym białko przed denaturacją pod wpływem temperatury. Następnie wykonano lizę komórek oraz analizę Western blot rozpuszczalnej frakcji stabilizowanych białek. Wpływ różnych stężeń inhibitora można oszacować w pojedynczej temperaturze wyznaczając izotermę wiązania techniką Western blot, odzwierciedlającą obsadzenie DcpS przez inhibitor. Na Rys. II.23D przedstawiono krzywą wyznaczoną metodą CETSA dla inhibitora RG3039.[125]

Tabela II.3. Charakterystyka metod literaturowych najczęściej wykorzystywanych w badaniach oddziaływań ligandów z DcpS.

Metoda	Źródło sygnału	Zalety	Wady
Radioaktywna (kinetyczna)	Substrat znakowany pierwiastkiem promieniotwórczym, np. ^{32}P	– prosta i czuła detekcja; – znakowanie grupami identycznymi z naturalnymi substratami.	– długi czas analizy; – konieczność separowania produktów reakcji (np. z użyciem TLC); – konieczność stosowania znaczników w postaci pierwiastków radioaktywnych; – konieczność stosowania ochrony przed szkodliwym promieniowaniem; – nie pozwala na obserwowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym.
RP HPLC (kinetyczna)	Absorpcja substratów i produktów reakcji, rozdzielanych na kolumnie chromatograficznej;	– nie wymaga stosowania znaczników.	– duże zużycie materiału; – długi czas analizy; – konieczność separowania produktów reakcji na kolumnie RP; – nie pozwala na obserwowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym; – nie jest metodą wysokoprzepustową (HTS).
Fluorkowa (kinetyczna)	Intensywność fluorescencji sondy fluoresceinowej	– niskie zużycie materiałów; – metoda HTS.	– nie pozwala na obserwowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym; – m^7GMPF jest słabym substratem DcpS.
ELISA (kinetyczna)	Barwny produkt reakcji katalizowanej przez przeciwciało drugorzędowe	– wysoka specyficzność oddziaływania antygen przeciwciało; – wysoka czułość.	– nie pozwala na obserwowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym; – przygotowanie przeciwciała jest procesem pracochłonnym i kosztownym;

			– niestabilność przeciwciał.
tsFQT (wiązanie)	Wygaszanie fluorescencji tryptofanu	– precyzyjna metoda pozwalająca na wyznaczanie stałych powinowactwa z dużą dokładnością; – nie wymaga stosowania znaczników; – badanie bezpośredniego wiązania liganda z białkiem.	– spadek czułości w temperaturach powyżej 20°C, ze względu na słabą emisję tryptofanu; – interferencja z emisją analogów kapu; – nie jest metodą wysokoprzepustową (HTS).
ITC (wiązanie)	Zmiany mocy potrzebne do utrzymania stałej temperatury próbki w odniesieniu do kontroli	– możliwość precyzyjnego wyznaczenia stałej asocjacji oraz parametrów termodynamicznych wiązania (ΔH, ΔG, ΔS); – nie wymaga stosowania znaczników; – badanie bezpośredniego wiązania liganda z białkiem.	– wymagane duże ilości białka; – nie jest metodą wysokoprzepustową (HTS).
Sondy kowalencyjne SF (wiązanie)	Western blot wyizolowanego DcpS, kowalencyjnie związanego z sondą SF	– pozwala na analizę wiązania inhibitorów w skomplikowanych układach biologicznych (komórki).	– konieczność izolowania związanego z sondą białka DcpS; – nie jest metodą wysokoprzepustową (HTS).
TR–FRET (wiązanie)	Zmiany czasów życia znaczników, tworzących parę FRET (Atto i terb)	– wysoka czułość; – można przystosować do pomiarów HTS; – pomiary czasoworozdzielcze zwykle charakteryzują się mniejszym sygnałem tła.	– wymaga specjalnych urządzeń pomiarowych.
CETSA (wiązanie)	Western blot wyizolowanego białka, stabilizowanego w podwyższonej temperaturze poprzez związanie inhibitora	– możliwość badania inhibicji w zakresie od mM do fM; – pozwala na analizę wiązania inhibitorów w skomplikowanych układach biologicznych (lizaty, komórkach i tkankach); – nie wymaga znakowania.	– mało informacji literaturowych oraz liczby celów molekularnych.

II.3.3. mRNA kap N7–guanino metylotransferaza

Enzym mRNA kap N7–guanino metylotransferaza (N7–MTaza) jest zaangażowany w proces biosyntezy kapu i katalizuje reakcję przeniesienia grupy metylowej z cząsteczki *S*-adenozylometioniny (SAM) w pozycję N7–guaniny Gppp–RNA. Prowadzi to do powstania struktury kapu 0, która jest typowa dla prostych organizmów eukatiotycznych, jak drożdże i rośliny. mRNA wyższych organizmów są dodatkowo metylowane w pozycji 2’-*O* pierwszego transkrybowanego nukleotydu przez mRNA kap 2’-*O*-metylotransferazę (2’-*O*-MTazę) z utworzeniem kapu 1. Kap 1 jest markerem molekularnym, pozwalającym na odróżnienie mRNA komórki od mRNA bakteryjnych lub wirusowych. Wrodzony system odpornościowy potrafi efektywnie odróżnić ppp–RNA i mRNA z kapem 0 (z zewnętrznych źródeł) od endogennych mRNA z kapem 1 (lub kapem 2).[2] Jednak niektóre wirusy potrafią wykorzystać maszynerię kapującą gospodarza lub kodują swoje własne białka kapujące RNA w celu uniknięcia działania systemu odpornościowego oraz zwiększenia ekspresji białek wirusowych.

U wielu wirusów, powodujących choroby ludzi i zwierząt, zidentyfikowano białka zaangażowane w kapowanie RNA, włączając w to proces N7–metylacji guaniny. Mechanizmy

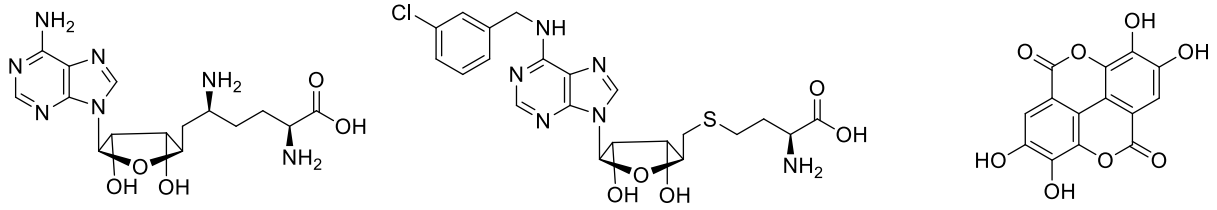
wirusowego kapowania RNA szczegółowo omówiono w rozdziale II.2.2. Niektóre wirusy produkują wielofunkcyjne białka, które między innymi odpowiedzialne są za kapowanie RNA (np. białko L). Z kolei koronawirusy, posiadające jeden z największych genomów, kodują wyspecjalizowane białka przeprowadzające jeden rodzaj metylacji (nsp14 – N7–metylacja, nsp16/10 – 2’-*O*-metylacja). Zestawienie przykładowych wirusów i ich białek odpowiedzialnych za etap N7–metylacji biosyntezy kapu przedstawiono w Tabeli II.4.

Tabela II.4. Zestawienie białek odpowiedzialnych za metylację pozycji N7, zidentyfikowanych w wirusach powodujących procesy chorobotwórcze.

Wirus	N7–MTaza	Choroba
Alfawirusy	nsp1[127]	Chikungunya
Rabdowirusy	białko L (Large structural protein)[128]	Wścieklizna
Paramyksowirusy	białko L[128]	Odra
Filowirusy	białko L[129]	Ebola, Choroba marburska
Pokswirusy	D1[43]	Ospa, Krowianka
Orbiwirusy	VP4[130]	Choroba niebieskiego języka
Rotawirusy	VP3[131]	Zakażenia przewodu pokarmowego
Ortoreowirusy	λ2[132]	Łagodne choroby układu oddechowego i przewodu pokarmowego
Flawiwirusy	ns5[133]	Denga, Gorączka Zachodniego Nilu, Gorączka Zika
Koronawirusy	nsp14[134]	SARS, MERS, COVID-19

Lepsze zrozumienie procesu biosyntezy kapu wirusów może dostarczyć nowych pomysłów na terapie przeciwwirusowe i ułatwić projektowanie leków. W literaturze istnieją przykłady N7–metylotransferaz wirusowych, będących potencjalnym celem terapeutycznym w terapiach przeciwwirusowych.[135] W tym celu niezbędnymi narzędziami są metody biofizyczne umożliwiające badania inhibicji aktywności N7–MTazy. Ponadto aktywność ludzkiej N7–MTazy RNMT-RAM została niedawno powiązana z nowotworzeniem. Zaobserwowano, że redukcja aktywności komórkowego RNMT-RAM o 50% w liniach komórek raka piersi prowadzi do redukcji proliferacji i wzrostu apoptozy, podczas gdy wskaźnik proliferacji nietransformowanych komórek nabłonka sutka nie ulegał zmianie.[136] Z tego względu inhibicja aktywności ludzkiej N7–MTazy RNMT-RAM także stanowi obiecujący cel w terapiach przeciwnowotworowych.

W literaturze istnieje wiele przykładów analogów SAM o właściwościach inhibujacych N7–MTazy. Najbardziej znanym jest sinefungina (Rys. II.24), będąca naturalnie występującym nukleozydem purynowym. Jednak inhibitory tego typu mogą być niespecyficzne i działać na wiele metylotransferaz wykorzystujących cząsteczkę SAM, jako donor grupy metylowej, co z kolei prowadzi do wysokiej cytotoksyczności.[137] Aby zwiększyć selektywność inhibitora niektóre podejścia wykorzystują specyficzne właściwości kieszeni wiążącej. Przykładem są N6-podstawione analogi SAH (Rys. II.24), których modyfikacje lokują się w przestrzeni powyżej kieszeni wiążącej SAM, unikalnej dla flawawirusów.[138] Badania przesiewowe istniejących bibliotek małocząsteczkowych związków pod kątem N7–MTaz wirusowych także mogą przynieść interesujące rezultaty. Stosując specjalnie zaprojektowaną w tym celu metodę fluorescencyjną autorzy jednej z prac spośród związków zawartych w bibliotece Prestwick® zidentyfikowali silny inhibitor N7–MTaz koronawirusów (naturalnie występujący fenolowy przeciwutleniacz – kwas elagowy; Rys. II.24), powodujących choroby SARS i MERS).[139]



Rys.II.24. Struktury przykładowych inhibitorów N7–MTaz.

Najbardziej rozpowszechnioną metodą monitorowania aktywności N7–MTazy jest radioznakowanie grupy metylowej SAM trytem (^{3}H), lub znakowanie substratu nukleotydowego fosforem 32 (^{32}P). Podejście to może posłużyć do badań zarówno N7–MTazy, jak i 2’-*O*-MTazy, gdyż obydwa enzymy wykorzystują molekułę SAM. Reakcja prowadzona jest zwykle z substratami, będącymi kótkimi fragmentami GpppX–RNA. Ilościowe oszacowanie grup $[^{3}H]CH_3$ przeniesionych na RNA wykonywane jest z użyciem filtra DEAE (diaminoetanol), a następnie detekcję radioaktywności. Wykorzystując radioznakowane RNA/nukleotydy obserwowane są zmiany zachodzące w substracie nukleotydowym. Przykładowe płytki TLC po inkubacji $[^{32}P]$GpppA z białkiem ns5 wirusa Denga o aktywności N7–MTazy i 2’-*O*-MTazy, zaprezentowano na Rys. II.25A. W pierwszej fazie do 10 min widoczny jest przyrost sygnału pierwszego produktu – m^7GpppA, natomiast do 60 minuty produktem głównym jest m^7GpppA_m.

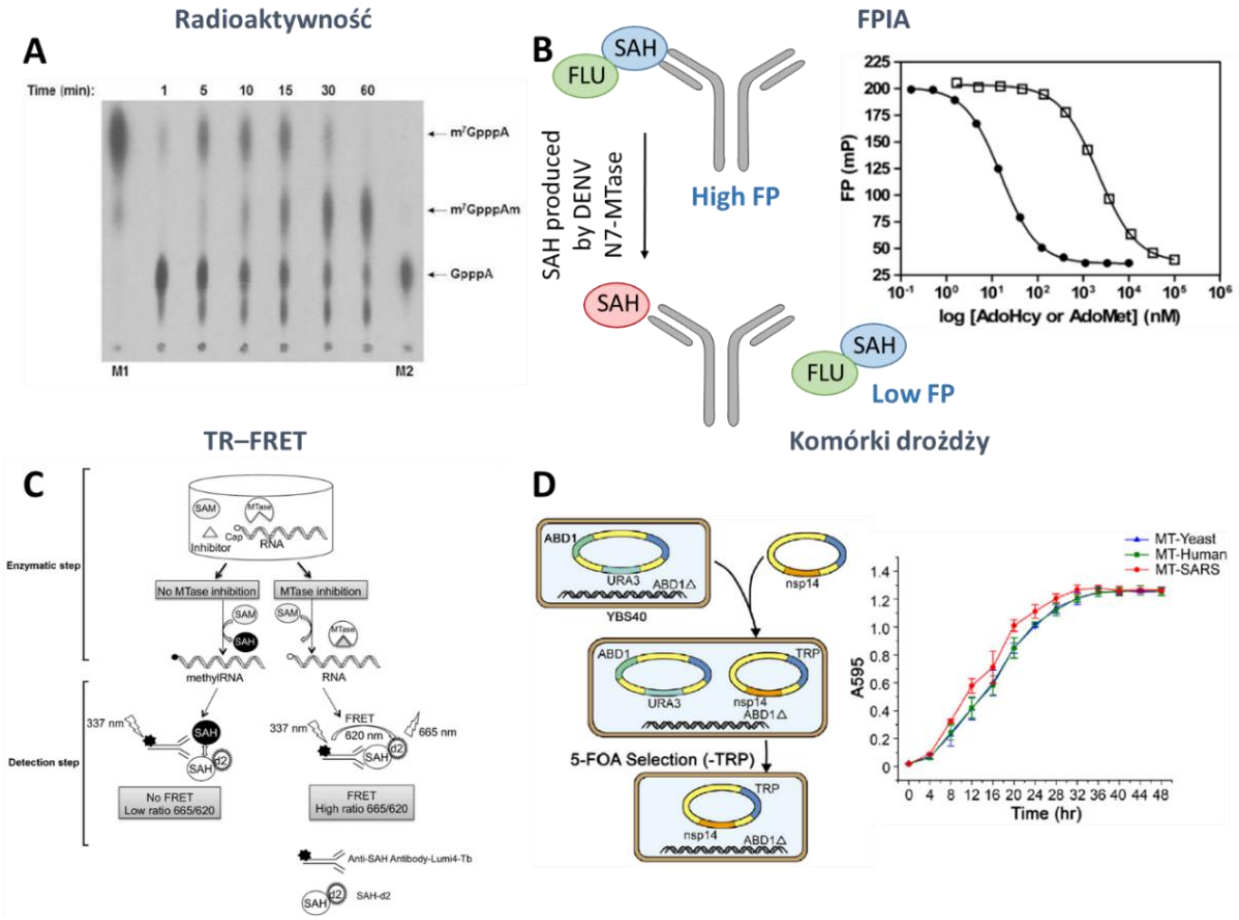
Podobnie, jak w przypadku badań kinetyki DcpS także w N7–MTazy mogą być charakteryzowane z użyciem metody ELISA. Została ona zastosowana między innymi do badań białka nsP1 alfawirusa VEEV. mRNA alfawirusów jest kapowane mechanizmem niekonwencjonalnym, w którym nsP1 katalizuje metylację N7 cząsteczki GTP (N7–MTaza), a następnie tworzy addukt z m^7GMP (GTaza). Addukt ten jest wykrywany metodą ELISA poprzez przeniesienie m^7GMP–nsP1 na płytkę, na której m^7GMP jest wykrywane z dodaniem przeciwciała anty-m_3G/m^7G oraz drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą.[140]

W jednej z prac autorzy zaprojektowali metodę fluorescencyjną, która pozwala na badania wszystkich metylotransferaz wykorzystujących SAM.[141] Metoda FPIA (ang. *Fluorescence Polarization Immunoassay*) polegała na zmianach polaryzacji fluorescencji cząsteczki SAH znakowanej fluoresceiną, w trakcie kompetycyjnego wiązania z przeciwciałem anty-SAH. Przed rozpoczęciem reakcji metylacji znakowany SAH jest związany z przeciwciałem, przez co mierzona polaryzacja fluorescencji przyjmuje wysokie wartości. Cząsteczki SAH produktowane przez metylotransferazę wypierają znakowany SAH, na skutek, czego polaryzacja fluorescencji maleje. Przykładowe krzywe wiązania kompetycyjnego znakowanego SAH i SAH lub SAM zaprezentowano na Rys. II.25B. Pomiary polaryzacji fluorescencji możliwe są także do zastosowania w prostszych układach, w których fluorescencyjna cząsteczka wypierana jest bezpośrednio z miejsca wiązania enzymu wirusowego. Molekułę GTP znakowaną BODIPY wykorzystano w metodzie badania wiązania związków z białkiem flawiwirusowym ns5, posiadającym kieszeń wiążącą GTP.[142]

Kolejna omawiana metoda wykorzystuje pomiary czasowo-rozdzielcze tworzenia par FRET (TR–FRET) i została zastosowana do badań N7–MTaz koronawirusów (białko nsp14), takich jak SARS-CoV i MERS-CoV.[139] W pierwszym etapie substrat RNA jest inkubowany z N7–MTazą, donorem metylu (SAM) oraz testowanym inhibitorem. W trakcie reakcji uwalniany jest produkt SAH, który konkuruje z SAH znakowanym d2 (znacznik fluorescencyjny; emisja 665 nm) o wiązanie z przeciwciałem anty-SAH fluorescencyjnie znakowanym lumi04-kryptatem terbu (emisja 337 nm). Jeśli SAH powstaje w trakcie inkubacji z N7–MTazą, oznacza to, że

przebiega ona w sposób niezakłócony i efekt FRET nie jest widoczny. Natomiast w obecności inhibitora SAH-d2 nie jest wypierany z wiązania z przeciwciałem, dzięki czemu można zaobserwować efekt FRET pomiędzy znacznikami. Ideę działania metody zaprezentowano na Rys. II.25C.

Bardziej skomplikowanym podejściem do badań N7–MTazy koronawirusowej nsp14 jest wykorzytanie komórek drożdży, będących bardziej zaawansowanym układem od biochemicznych metod *in vitro*.[143] W tym celu plazmid zawierający gen drożdżowy kodujący metylotransferazę Abd1 (chromosomalny Abd1 został usunięty), zastępowano plazmidem eskpresyjnym, zawierającym nsp14 bądź ludzką N7–MTazę RNMT (Rys. II.25D). Wyselekcjonowane komórki produkujące białko wirusowe lub ludzkie inkubowano następnie na płytkach wielodołkowych z wybranym inhibitorem, po czym poprzez pomiar absorpcji w 595 nm określano gęstość optyczną komórek (wzrost).



Rys.II.25. Metody biofizyczne w badaniach enzymatycznej N7–metylacji katalizowanej przez N7–MTazy z różnych organizmów. **A)** Wizualizacja płytki mieszaniny [^{32}P]GpppA z ns5 wirusa Denga po różnych czasach inkubacji (zaczerpnięte z pracy Lim et al. 2013[144]); **B)** Schemat działania metody FPIA oraz krzywe wiązania kompetycyjnego SAH (czarny) i SAM (biały) z SAH znakowanym fluoresceiną, do przeciwciała anty-SAH (zaczerpnięte z pracy Graves et al. 2008[141]); **C)** Schemat działania metody TR–FRET do badań N7–MTaz koronawirusów (zaczerpnięte z pracy Aouadi et al. 2017[139]); **D)** Wymiana plazmidów linii komórek drożdży na takie, zawierające gen kodujący N7–MTazę koronawirusa nsp14 lub N7–MTazę ludzką. Na rysunku obok przedstawiono krzywe wzrostu komórek drożdży produkujących różne N7–MTazy (zaczerpnięte z pracy Sun et al. 2014[143]).

Tabela II.5. Charakterystyka metod literaturowych najczęściej wykorzystywanych w badaniach oddziaływań ligandów z N7–MTazą.

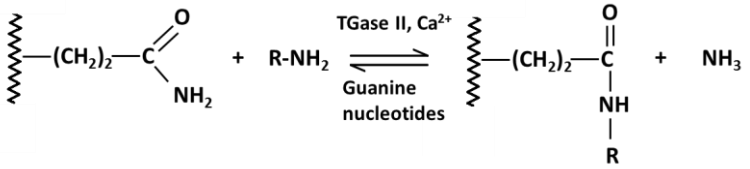
Metoda	Źródło sygnału	Zalety	Wady
Radioaktywna	Substrat znakowany pierwiastkiem promieniotwórczym, np. [^{3}H]-SAM, [^{32}P]GpppX–RNA	– prosta i czuła detekcja; – znakowanie grupami identycznymi z naturalnymi substratami; – pozwala na badania wszystkich MTaz wykorzystujących SAM.	– długi czas analizy; – konieczność separowania produktów reakcji (np. z użyciem TLC); – konieczność stosowania znaczników w postaci pierwiastków radioaktywnych; – konieczność stosowania ochrony przed szkodliwym promieniowaniem; – nie pozwala na obserwowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym.
FPIA	Zmiany FP SAH znakowanego fluoresceiną	– brak interferencji fluorescencji znacznika z naturalną emisją substratów; – można przystosować do pomiarów HTS; – pozwala na badania wszystkich MTaz wykorzystujących SAM.	– konieczność stosowania znaczników fluorescencyjnych; – wymaga stosowania drogich przeciwciał
FP	Zmiana FP GTP-BODIPY	– brak interferencji fluorescencji znacznika z naturalną emisją substratów; – można przystosować do pomiarów HTS.	– konieczność stosowania znaczników fluorescencyjnych; – wiązanie liganda pośrednie, na skutek wypierania sondy fluorescencyjnej z miejsca wiążącego; – wymagane wysokie powinowactwo sondy do miejsca wiążącego.
TR–FRET	Zmiany czasów życia znaczników, tworzących parę FRET (d2 i lumi04-kryptat terbu)	– wysoka czułość; – można przystosować do pomiarów HTS; – zwykle charakteryzują się mniejszym sygnałem tła.	– konieczność stosowania znaczników fluorescencyjnych; – wymaga stosowania drogich przeciwciał; – wymaga specjalnych urządzeń pomiarowych.
Komórkowa	Wzrost komórek drożdżowych (absorpcja 595 nm)	– umożliwia ocenę inhibitorów w skomplikowanym układzie biologicznym.	– pomiar absorpcji jest znacznie mniej czuły niż fluorescencji; – pracochłonna.

II.4. Transglutaminaza II – białko wiążące nukleotydy guanozynowe

Wiele klas białek zaangażowanych jest w regulację metabolizmu i funkcji nukleotydów. Analogicznie, nukleotydy także regulują aktywność niektórych białek. Przykładem tego typu oddziaływań jest klasa białek G, posiadających aktywność GTPazy. Białka G są aktywowane przez transmembranowe receptory sprzężone z białkami G (GPCRs; ang. *G-Protein Coupled Receptor*), przez co biorą udział w sygnalizacji dokomórkowej. Przykładem białka o aktywności białka G jest transglutaminaza tkankowa (ang. *tissue transglutaminase*), zwana także transglutaminazą II (TGaza II, TG2). TGaza II wykazuje szereg aktywności związanych z metabolizmem aminokwasów/peptydów oraz nukleotydów. Podobnie do innych transglutaminaz TGaza II jest odpowiedzialna za katalizowanie procesu sieciowania białek/peptydów poprzez transamidację reszt łańcuchów bocznych glutaminy i lizyny (lub innych pierwszorzędowych amin). Proces ten jest zależny od stężenia jonów Ca^{2+} i prowadzi do utworzenia wiązania γ-

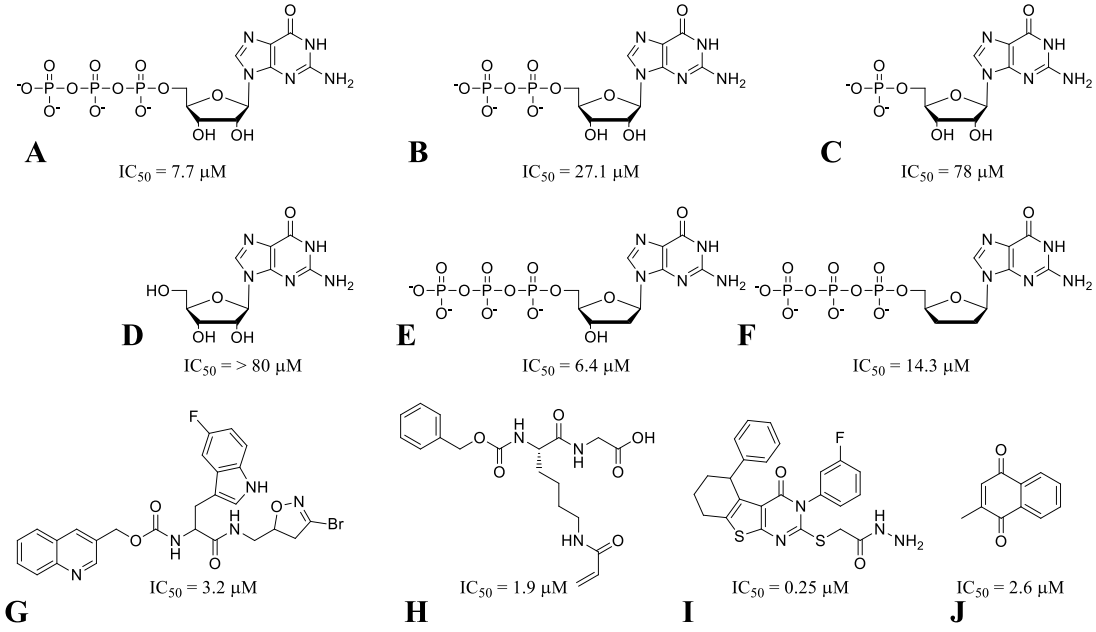
glutamylo-ε-lizyny, wysoce odpornego na proteolizę.[145] Pomimo, że sekwencja aminokwasowa TGazy II różni się od typowej dla białek G, posiada ona miejsce wiążące GTP oraz aktywność GTPazy (także ATPazy). Poprzez aktywność białka G TGaza II pośredniczy w transdukji sygnału z receptorów α_1–adrenergicznego, oksytocyny i tromboaksanu A_2 na fosfolipazę C_δ (efektor pierwszorzędowy).[146] Związanie molekuły GTP/GDP przez TGazę II hamuje aktywność transamidacji i promuje aktywność białka G. Związanie jonów wapnia Ca^{2+} ma efekt odwrotny. Oznacza to, że GTP/GDP i jony Ca^{2+} są odwrotnymi regulatorami aktywności GTPazy i transamidazy TGazy II (Rys. II.26).[147]

Wielofunkcjonalność TGazy II wynika z jej wielodomenowej struktury. Białko składa się z domeny α/β z pięcioma miejscami wiążącymi jony Ca^{2+},[148] N domeny, kanapki β oraz dwóch β-baryłek. β-baryłka wraz z częścią domeny α/β odpowiadają za aktywność GTPazy.[149] Gdy białko zwiąże G-nukleotyd przybiera konformację zamkniętą, nieaktywną w procesie transamidacji, gdzie obecne są oddziaływania niekowalencyjne pomiędzy β-beczułkami i domeną α/β.[147]



Rys. II.26. Reakcja transamidacji aminokwasów, katalizowana przez transglutaminazę II.

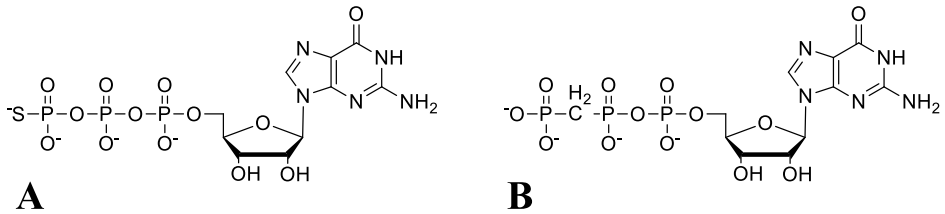
Ze względu na wielofunkcjonalność TGaza II zaangażowana jest w wiele procesów fizjologicznych, takich, jak wzrost i regeneracja neuronalna,[150] leczenie ran,[151] angiogeneza oraz różnicowanie komórkowe.[152] Jest także powiązana z nasileniem nowotworzenia.[153] Wzrost ekspresji i aktywności TGazy II związany jest z chorobami neurodegeneracyjnymi – Huntingtona i Alzheimera.[154] Z tego względu inhibitory aktywności TGazy II mają potencjalne znaczenie terapeutyczne.



Rys. II.27. Struktury wybranych inhibitorów TGazy II wraz z wartościami IC_{50} wyznaczonymi dla inhibicji aktywności transamidazy.[155] **A)** GTP; **B)** GDP; **C)** GMP; **D)** guanozyna; **E)** dGTP; **F)** ddGTP; **G)** CHDI–00313915; **H)** CHDI–00314998; **I)** CHDI-00194506 (inhibitor odwracalny z nieznanym miejscem wiążącym); **J)** menadion.

Istotną kwestią w poszukiwaniach inhibitorów TGazy II odpowiednich do zastosowań terapeutycznych jest ich selektywność względem innych transglutaminaz. Aktywność transamidazy jest charakterystyczna także dla TGazy I, III–VII oraz innych białek, jak czynnik krzepnięcia krwi IIIa.[156] Niska selektywność inhibicji może powodować szkodliwe efekty uboczne, np rybią łuskę (*ichthyosis*) wywołaną inhibicją TGazy I[157] lub upośledzenie krzepnięcia krwi w przypadku inhibicji czynnika XIIIa.[158] Inhibitory TGazy II odkryte w ostatnich latach wykazują różne modele inhibicji. Nieodwracalne inhibitory o strukturze peptydowej (Rys II.27G, H) tworzą wiązania kowalencyjne i posiadają dobrą selektywność wobec innych izoform TGazy. Hydrazyna chinazolinonowa wiąże się wolno z miejscem wiążącym GTP lub w miejscu allosterycznym regulującym wiązanie GTP.[159] Niektóre inhibitory wyselekcjonowano z bibliotek związków farmakologicznie czynnych LOPAC i Prestwick (Rys II.27I, J).[160] Związki cystaminowe z kolei są nieselektywnymi i odwracalnymi inhibitorami konkurującymi z substratem lizynowym.[155, 161]

Kolejną grupę inhibitorów stanowią analogi G-nukleotydów, oddziałujących na miejsce wiązania GTP (Rys. II.27A–F). Na siłę inhibicji nukleotydów guanozynowych większy wpływ mają modyfikacje łańcucha fosforanowego niż modyfikacje cukru. Spadek wiązania GDP, GMP i guanozyny w porównaniu do GTP wskazuje na istotny wkład hydrofilowego łańcucha oligofosforanowego na process wiązania.[155] Miejsce wiązania GTP jest wysoce wyspecjalizowane do wiązania guaniny, dlatego też niewiele związków nienukleotydowych może na nie odziaływać (przykład inhibitora peptydowego: LDN–27219[162]). Inhibicja TGazy II przez analogi nukleotydowe wciąż nie jest dobrze opisana, zatem badanie miejsca wiążącego GTP TGazy II otwiera nowe możliwości w poszukiwaniach inhibitorów transamidacji, działających selektywnie wobec innych białek z rodziny transglutaminaz.



Rys. II.28. Struktury wybranych, niehydrolizowanych inhibitorów TGazy II, oddziałujących na miejsce wiążące G-nukleotydy: **A)** $GTP_{\gamma}S$, **B)** $GppCH_2p$.

II.5. Terapeutyczne zastosowania analogów kapu

Struktura kapu znajdująca się na końcu 5’ mRNA bierze udział w wielu procesach biologicznych. Wprowadzanie modyfikacji chemicznych w obrębie jej struktury zmienia jej właściwości, a co za tym idzie wpływa na procesy komórkowe, w które jest zaangażowana. W niniejszym rozdziale zostaną przedstawione wybrane modyfikacje chemiczne łańcucha fosforanowego, ich wpływ na właściwości małocząsteczkowych analogów kapu oraz całego mRNA.

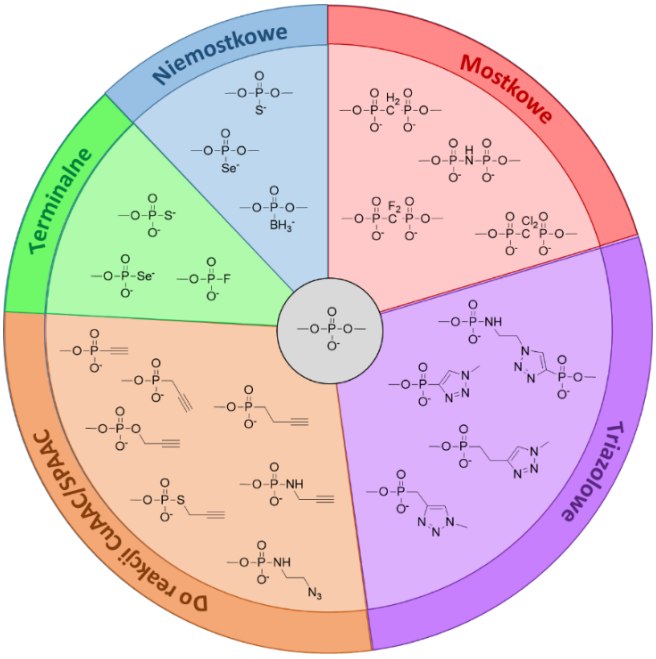
II.5.1. Małocząsteczkowe analogi kapu

W obrębie struktury kapu można wyróżnić kilka potencjalnych miejsc modyfikacji chemicznych: łańcuch oligofosforanowy, ryboza oraz zasady azotowe (7-metyloguanina, zasada pierwszego transkrybowanego nukleotydu). Łańcuch oligofosforanowy oddziałuje specyficznie w miejscu wiążącym białek, a także jest miejscem cięcia przez fosfohydrolazy odpowiedzialne

za degradację RNA. Z tego względu grupy fosforanowe mogą stanowić atrakcyjne narzędzie do badań metabolizmu RNA.

W literaturze przedstawiono wiele przykładów modyfikacji chemicznych fosforanów cząsteczki kapu. Rodzaj modyfikacji oraz jej lokalizacja w łańcuchu odpowiadają za zmianę właściwości całego kapu. W zależności od tego, w której pozycji tlenu umiejscowiona jest nowa grupa chemiczna można wyróżnić modyfikacje niemostkowe oraz mostkowe. Modyfikacja niemostkowa dotyczy wolnej grupy hydroksylowej fosforanu (Rys. II.29). Znane są przykłady grup tiofosforanowych (PSO_3^-),[163] boranofosforanowych ($PBH_3O_3^-$)[164] oraz selenofosforanowych ($PSeO_3^-$)[165] wprowadzanych w pozycje α, β, γ łańcucha fosforanowego dinukleotydu. W przypadku mononukleotydu możliwe jest także uzyskanie terminalnego tiofosforanu,[166] selenofosforanu[165] oraz fluorofosforanu.[167] Z kolei modyfikacja mostkowa polega na wymianie atomu tlenu wiązania pirofosforanowego na wybraną grupę chemiczną (Rys. II.29). W ten sposób uzyskano analogi kapu zawierające grupę metylenobisfosfonianową (–CH_2–),[168] imidofosforanową (–NH–),[169] dichlorometylenobisfosfonianową (–CCl_2–),[170] czy też difluorometylenobisfosfonianową (–CF_2–).[170]

Łańcuch fosforanowy może także zostać wykorzystany do znakowania kapu w reakcjach bioortogonalnych. Łatwym sposobem modyfikacji nukleotydu grupą alkinową, będącą substratem w reakcji CuAAC, jest wprowadzenie podjednostki etynylo-, propargilo- lub butynylo-*C*-fosfonianowej, fosforanowej, amidofosforanowej, bądź fosfotioestrowej (Rys. II.29).[171, 172] Grupę alkinową można także zastąpić azydkową, która nie tylko może reagować z alkinem w reakcji CuAAC, ale także z pierścieniem cyklooktynowym reakcji SPAAC bez udziału miedzi. Przykładem takiej modyfikacji jest grupa 2–azydoetylofosofroamidowa.[172]

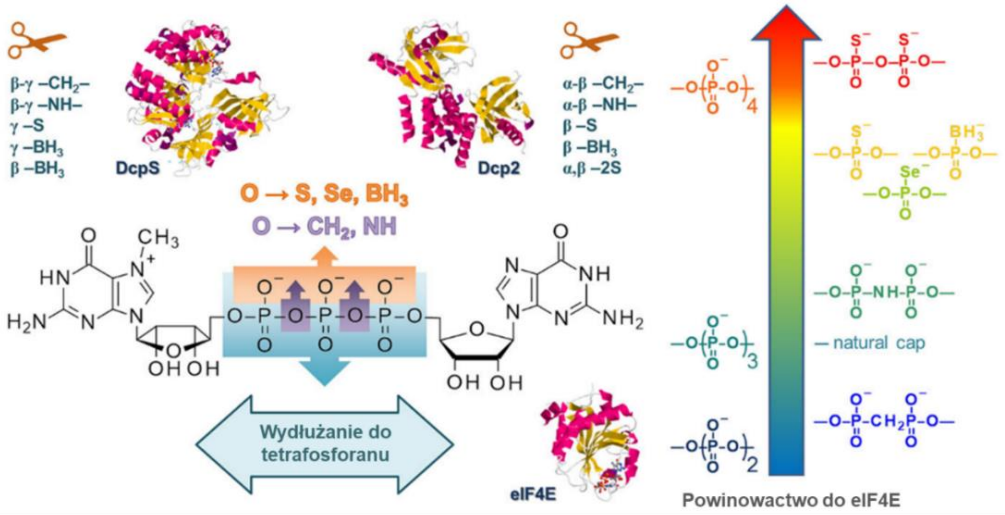


Rys. II.29. Wybrane modyfikacje chemiczne łańcucha fosforanowego.

Obok niewielkich chemicznych modyfikacji możliwe jest także wprowadzanie większych ugrupowań w strukturę oligofosforanów. Jednym z przykładów tego typu analogów kapu jest funkcjonalizacja pierścieniem triazolowym (Rys. IV.29). Obecność triazolu jest następstwem podejścia syntetycznego otrzymywania mimik kapu w reakcji CuAAC.[172]

W rozdziale II.3.2 omówiono znaczenie małocząstkeczkowych inhibitorów enzymu degradującego kap DcpS w terapiach przeciwko SMA. Łańcuch fosforanowy jest zaangażowany w oddziaływanie z triadą histydynową w miejscu aktywnym enzymu. Dlatego też modyfikacje fosforanów mogą prowadzić do uodpornienia kapu na działanie DcpS. Zwykle modyfikacje mostkowe wykazują większą odporność na degradację, np. metylenobisfosfonianowe i imidofosforanowe (Tabela II.6). Pozycja podstawienia jest także istotna, w zależności od enzymu degradującego kap. Degradacja przez DcpS prowadzi do uwolnienia cząsteczki m^7GMP, zatem najbardziej korzystnym miejscem podstawienia jest pozycja β–γ (w mononukleotydowych

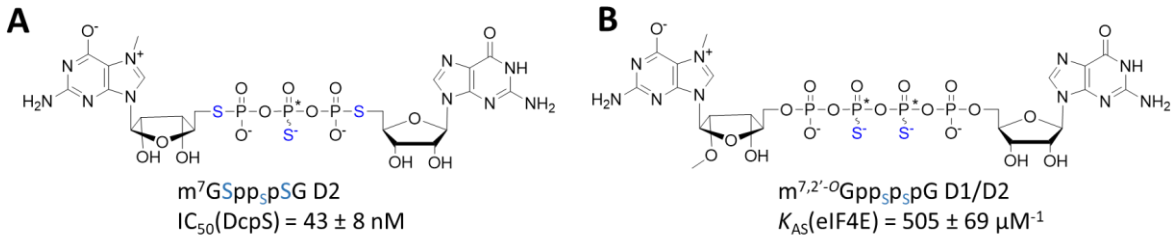
analogach kapu α–β). Enzym Dcp2 z kolei odcina cząsteczkę m^7GDP, co sugeruje, że lepszą pozycją modyfikacji może być α–β (β–γ w mononukleotydzie). Hipotezę tą potwierdzają wyniki eksperymentalne, według których analogi kapu $m^7GpCH_2p_xG$ oraz m^7GpNHp_xG są odporne na hydrolizę przez DcpS i inhibują jego aktywność,[169, 173] natomiast m^7GppCH_2ppG, $m^7GppCCl_2ppG$ oraz m^7GppCF_2ppG są inhibitorami enzymu Dcp2.[170, 173] Analogi kapu zawierające modyfikacje niemostkowe, takie jak tiofosforanowa czy też boranofosforanowa także mają zdolność do inhibicji DcpS, jednak ich odporność na hydrolizę oraz IC_{50} zależą od stereochemii wiązania (niemostkowa zamiana atomu tlenu prowadzi do pojawienia się centrum chiralnego na atomie fosforu).[174] Niedawno zaobserwowano, że podstawienie kapu atomem siarki w pozycji 5' prowadzi do znacznego wzrostu właściwości inhibujących DcpS. Ponadto synteza tego typu analogów jest bardziej wydajna ze względu na brak izomerów optycznych. Trisiarkowy analog kapu m^7GSpp_SpSG D2 (drugi diastereoizomer według kolejności elucji RP HPLC) okazał się być najsilniejszym nukleotydowym inhibitorem DcpS o IC_{50} 43 ± 8 nM zbliżonym do RG3039 (Rys. II.31A; Tabela II.6).[121] Podsumowanie wpływu różnych modyfikacji na odporność na hydrolizę przez DcpS i Dcp2 przedstawiono na Rys. II.30.



Rys. II.30. Wpływ modyfikacji łańcucha oligofosforanowego kapu na powinowactwo do białka eIF4E oraz odporność na degradację kapu przez DcpS i Dcp1/Dcp2 (zaczerpnięte z pracy Warminski et al. 2017[175]).

Eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E jest jednym z białek będących celem terapeutycznym, gdyż jego nadekspresja charakterystyczna jest dla komórek nowotworowych. Z tego względu poszukiwanie modyfikacji kapu zwiększających powinowactwo do eIF4E w celu inhibowania procesu translacji jest istotne. Jednym ze sposobów poprawy wiązania kapu z eIF4E jest wydłużanie łańcucha fosforanowego. Stała asocjacji wzrasta od 1,5 ± 0,1 μM^{-1} dla m^7GMP aż do 1625 ± 195 μM^{-1} dla m^7Gp_5. Z kolei obecność drugiego nukleotydu zmniejsza powinowactwo – K_{AS} m^7GTP wynosi 119,7 ± 5,7 μM^{-1} natomiast m^7Gp_3G rząd wielkości mniej 12,5 ± 0,3 μM^{-1} (Tabela II.6).[115] Wpływ modyfikacji chemicznych na powinowactwo kapu do eIF4E przedstawiono na Rys. II.30. Spośród znanych modyfikacji fosforanów wprowadzenie atomu siarki znacząco poprawia stabilność kompleksu kap–eIF4E. Obecność tiofosforanu w pozycji γ m^7Gp_3G trzykrotnie zwiększa stałą asocjacji w porównaniu do niemodyfikowanego kapu (Tabela II.6).[174] Wydłużając mostek fosforanowy do czterech grup możliwe jest także wprowadzenie kolejnego tiofosforanu, na skutek, czego stała asocjacji wzrasta 4,5–krotnie w odniesieniu do m^7Gp_4G (Tabela II.6) z 110,9 ± 6,0 μM^{-1} do 505 ± 69 μM^{-1}. Najsilniejszy dinukleotydowy ligand eIF4E jest mieszaniną diastereoizomerów tetrafosofranowego analogu

kapu, zawierającego dwie grupy tiofosforanowe w pozycjach β i γ $m^{7,2'\text{-}O}GppspspG$ D1/D2 (Rys. II.31B).



Rys. II.31. Struktura analogu kapu **A)** $m^7GSppspSG$ D2 będącego bardzo silnym inhibitorem DcpS oraz **B)** $m_2{}^{7,2'\text{-}O}GpspspG$ D1/D2 o bardzo wysokim powinowactwie do eIF4E.

Tabela II.6. Zestawienie wartości stałych asocjacji K_{AS} kompleksów kap–eIF4E oraz IC_{50} analogów kapu z DcpS.

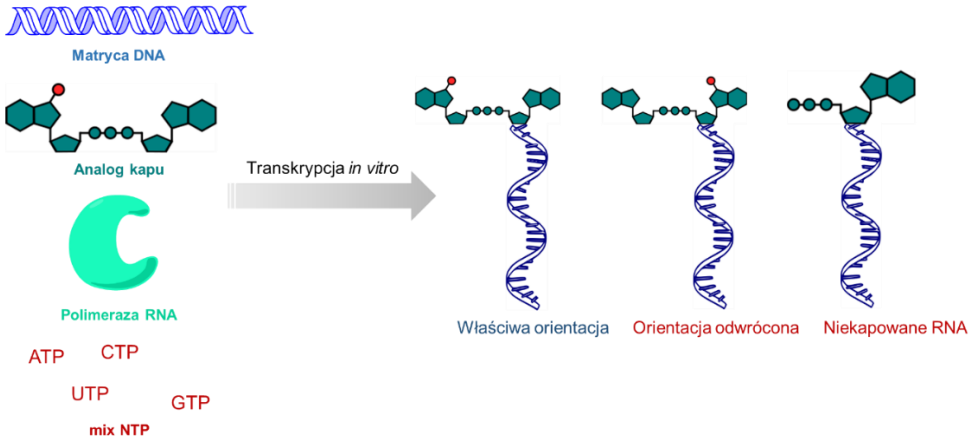
Związek	K_{AS} (μM^{-1})	IC_{50} (μM)	Związek	K_{AS} (μM^{-1})	IC_{50} (μM)
m^7GMP	1,5 ± 0,1[b]	97 ± 21[h]	$m^7GSppspG$ D1	25,7 ± 0,8[c]	0,178 ± 0,042[c]
m^7GDP	28,9 ± 1,5[a]	5,2 ± 1,2[c]	$m^7GSppspG$ D2	18,6 ± 1,6[c]	0,159 ± 0,027[c]
m^7GTP	119,7 ± 5,7[a]	degradacja	$m^7GSppspSG$ D1	33,2 ± 2,3[c]	0,214 ± 0,040[c]
m^7Gp_4	734 ± 56[a]	degradacja	$m^7GSppspSG$ D2	17,3 ± 0,5[c]	0,043 ± 0,008[c]
m^7Gp_5	1625 ± 195[a]	degradacja	$m^7Gp_{BH3}ppG$ D1	9,3 ± 0,3[e]	odporny[e]
m^7Gp_3G	12,5 ± 0,3[a]	degradacja	$m^7Gp_{BH3}ppG$ D2	17,3 ± 0,2[e]	degradacja[e]
m^7Gp_4G	110,9 ± 6,0[a]	degradacja	$m^7Gpp_{BH3}pG$ D1	44,0 ± 1,8[e]	1,02 ± 0,23[h]
m^7Gp_5G	543 ± 55[a]	degradacja	$m^7Gpp_{BH3}pG$ D2	13,0 ± 0,2[e]	1,44 ± 0,26[h]
m^7GDPF	3,7[j]	b.d.	$m^7GppNHpG$	10,1 ± 0,2[f]	degradacja[f]
m^7GTPF	190[j]	b.d.	$m^7GpNHppG$	14,6 ± 0,7[f]	3,22 ± 0,92[h]
$m_2{}^{7,2'\text{-}O}GpsppG$ D1	35,2 ± 1,1[d]	odporny[d]	$m^7GpNHpppG$	112,3 ± 1,8[f]	odporny[f]
$m_2{}^{7,2'\text{-}O}GpsppG$ D2	12,9 ± 0,4[d]	odporny[d]	m^7GpCH_2ppG	6,3 ± 0,3[f]	1,4 ± 0,1[g]
$m_2{}^{7,2'\text{-}O}GppspG$ D1	43,1 ± 1,4[d]	odporny[d]	m^7GpCH_2pppG	51,8 ± 0,8[f]	odporny[f]
$m_2{}^{7,2'\text{-}O}GppspG$ D2	19,3 ± 2,2[d]	odporny[d]	m^7GppCH_2ppG	48,6 ± 2,1[i]	odporny[i]
$m_2{}^{7,2'\text{-}O}GpppspG$ D1/D2	158 ± 2[b]	b.d.	$m^7GppCCl_2ppG$	77,9 ± 1,7[i]	odporny[i]
$m_2{}^{7,2'\text{-}O}GppspppG$ D1/D2	282 ± 12[b]	b.d.	m^7GppCF_2ppG	57,6 ± 0,8[i]	degradacja[i]
$m_2{}^{7,2'\text{-}O}GppspspG$ D1/D2	505 ± 69[b]	b.d.			

[a] Zuberek et al. *Biochemistry*, 2004, 43(18), 5370–9;[115] [b] Strenkowska et al. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(20), 9578–90;[176] [c] Wojtczak et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, 140, 5987–99;[121] [d] Kowalska et al *RNA*, 2008, 14, 1119–31;[174] [e] Kowalska et al. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(16), 10245–64;[164] [f] Rydzik et al. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, 20, 1699–710;[169] [g] Kasprzyk et al. *Org. Bio. Chem.*, 2016, 14, 3863–8;[177] [h] Baranowski, Nowicka et al. *Org. Bio. Chem.*, 2016, 14(20), 4545–60;[122] [i] Rydzik et al. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(15), 8661–75;[170] [j] Baranowski, et al. *J. Org. Chem.*, 2015, 80, 3982–97.[167]

Nukleotydy ze względu na obecność ujemnie naładowanego łańcucha fosforanowego nie przenikają przez błony komórkowe. Problem ten rozwiązywany jest na szereg różnych sposobów. Ładunek ujemny można maskować z zastosowaniem grup, takich jak tryptamina w postaci pronukleotydu, który w komórce ulega fosforylacji.[178] Ponadto stosowane są różnego rodzaju nośniki dostarczające substancje do komórek, np. polimerowe struktury dekorowane złotem[179] lub nanocząsteczkami magnetycznymi,[180] a także otoczki wirusopodobne.[181]

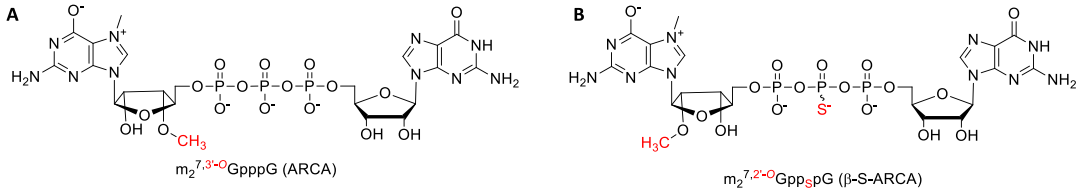
II.5.2. Wpływ modyfikacji chemicznych kapu na właściwości mRNA

Modyfikacja chemiczna kapu wpływa nie tylko na jego właściwości, ale także całego mRNA, na którego 5’ końcu się znajduje, takie jak wydajność translacji oraz odporność na degradację enzymatyczną. Odpowiednio zaprojektowane modyfikacje mogą, zatem mieć zastosowanie w terapiach genowych z użyciem RNA, bezpieczniejszym w stosowaniu niż DNA, które to może wprowadzić nieodwracalne zmiany w genomie. Chemicznie modyfikowaną cząsteczkę kapu można wprowadzić do RNA kotranskrypcyjnie w procesie zwanym transkrypcją *in vitro* (IVT). W procesie tym matryca DNA jest poddawana transkrypcji przez polimerazę RNA pochodzącą z bakteriofaga, w obecności mieszaniny trifosforanów nukleotydów NTP (ATP, GTP, CTP i UTP) oraz analogu kapu. W efekcie powstają trzy produkty RNA: jeden zawierający prawidłowo wbudowany kap, drugi zawierający odwrotnie wbudowany kap oraz trzeci będący niekapowanym RNA, powstałym na skutek wbudowania GTP. Ilość niekapowanego RNA można ograniczyć zmniejszając stężenie GTP użytego w miksie trifosforanów. Możliwość zastosowania analogu kapu w terapii genowej zależy nie tylko od jego wpływu na efektywność translacji, ale także od procentu powstających w transkrypcji *in vitro* RNA z poprawnie zorientowanym kapem. Kap może zostać wbudowany na dwa sposoby – poprzez grupę 3’-*O* 7-metyloguanozyny, lub pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Pierwszy z nich prowadzi do powstania od 30 do 50% mRNA o odwróconej orientacji kapu (Rys. II.32).



Rys. II.32. Schematyczne przedstawienie procesu transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem analogów kapu wraz z powstającymi produktami reakcji.

Sposobem na zwiększanie ilości mRNA zawierających prawidłowo wbudowany kap jest zablokowanie pozycji 2’-*O* lub 3’-*O* 7-metyloguanozyny, na przykład przy pomocy grupy metylowej. Analogi te znane są pod nazwą ARCA (ang. *Anti-Reverse Cap Analog*), a wprowadzona modyfikacja zapobiega rozpoznawaniu grup 2’ i 3’ hydroksylowych 7-metyloguanozyny przez polimerazę RNA. Wydajność translacji 3’-*O* ARCA (Rys. II.33A) jest 2,5–raza większa w porównaniu do niemodyfikowanego kapu m^7GpppG (Tabela II.7). Wprowadzenie dodatkowych modyfikacji fosforanów w celu uodpornienia kapu na degradację enzymatyczną pozwala na dodatkowo wydłużenie czasu życia mRNA w komórce. W tym celu zaprojektowany został analog kapu, zawierający tiofosforan w pozycji β oraz metylację 2’-*O* 7-metyloguanozyny znany pod nazwą β–S–ARCA (Rys. II.33B).[182] Diastereoizomer D1 β–S–ARCA wprowadzony do mRNA nie tylko był odporny na działanie Dcp2, ale zwiększał wydajność translacji 3,5–krotnie.



Rys. II.33. Struktura analogów kapu ARCA pozwalających na otrzymanie mRNA, zawierających właściwą orientację kapu **A)** 3'-*O*-ARCA ($m_2^{7,3'\text{-}O}$GpppG) oraz **B)** β–S–ARCA ($m_2^{7,2'\text{-}O}$GppSpG).

Tabela II.7. Zestawienie wydajności translacji mRNA zawierających różne modyfikacje 5' końca (w odniesieniu do m^7GpppG) w niedojrzałych komórkach dendrytycznych. Dane zaczerpnięto z Kuhn et al. 2010.[183]

Związek	Wydajność translacji (względem m^7GpppG)	Całkowita ekspresja białka
Brak kapu	0,00 ± 0,00	0,011 ± 0,000
GpppG	0,18 ± 0,01	0,022 ± 0,001
m^7GpppG	1,00 ± 0,04	1,000 ± 0,007
ARCA	2,52 ± 0,19	4,777 ± 0,042
β–S–ARCA D1	3,36 ± 0,09	13,094 ± 0,307
β–S–ARCA D2	3,53 ± 0,17	6,570 ± 0,075

W niektórych pracach wydajność translacji mRNA zawierającego chemiczny analog kapu wiązana jest z jego powinowactwem do białka eIF4E. Dlatego też możliwość oceny powinowactwa kapu do eIF4E jest bardzo istotną informacją, którą można uzyskać z wykorzystaniem odpowiednich metod biofizycznych.

II.6. Narzędzia do badań oddziaływań białko–ligand

Białka są podstawowymi makromolekułami żyjących organizmów i pełnią istotną rolę w funkcjonowaniu komórki. Posiadają szereg funkcji, w tym strukturalne (cytoszkielet), mechaniczne (mięśnie), biochemiczne (enzymy) oraz sygnalizacyjne (hormony). Zbudowane są z łańucha aminokwasów, połączonych wiązaniem amidowym (peptydowym), stanowiących strukturę pierwszorzędową, który w funkcjonalnych białkach ulega zwijaniu tworząc struktury wyższego rzędu. Białka pełnią swoje funkcje poprzez specyficzne wiązanie z innymi molekułami – białkami, peptydami, kwasami nukleinowymi, membraną, substratami, małocząsteczkowymi ligandami oraz metalami. Zrozumienie mechanizmu oddziaływania białko–ligand jest niezbędne do zrozumienia biologii na poziomie molekularnym. Rozpoznawanie ligandów przez białka oraz ich wiązanie pozwala na odkrywanie, projektowanie oraz rozwój leków. Parametrem fizycznym, który odwzorowuje powinowactwo liganda do białka jest stała dysocjacji K_D (lub jej odwrotność – stała asocjacji K_{AS}), będąca stałą równowagi, obrazującą skłonność kompleksu do odwracalnej dysocjacji liganda od białka. Wartość K_D odpowiada stężeniu liganda, w którym połowa białek zawiera związany ligand[111] i można wyrazić ją, jako:

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

gdzie $[L]$ – stężenie liganda, $[P]$ – stężenie białka, $[PL]$ – stężenie kompleksu ligand–białko.
Im niższe K_D, tym wyższe powinowactwo liganda do białka. Warunki otoczenia takie, jak właściwości rozpuszczalnika, pH, temperatura oraz stężenie soli mogą wpływać na stabilność oraz właściwości białek i ligandów, a tym samym na ich oddziaływania.

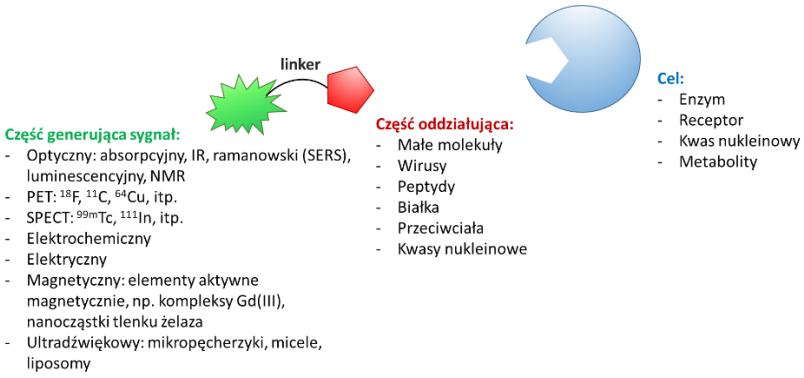
Istnieje wiele technik eksperymentalnych pozwalających na charakterystykę oddziaływań białek z ligandami. Metody, takie, jak spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego NMR, krystalografia rentgenowska oraz mikroskopia krio-elektronowa są wykorzystywane do badań zmian strukturalnych i dynamiki pomiędzy formą wolną oraz związaną. Dynamika białek możliwa jest do monitorowania, także przy użyciu spektrometrii mas. Metody kalorymetryczne ITC (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*) oraz DSC (ang. *Differential Scanning Calorimetry*) dostarczają ilościowych danych termodynamicznych, możliwych do wykorzystania w badaniach stabilności oraz wyjaśnienia napędowych sił wiążących. Powierzchniowy rezonans plazmonowy SPR (ang. *Surface Plasmon Resonance*), będący metodą optyczną pomiaru zmian współczynnika załamania w pobliżu czułej powierzchni, pozwala z kolei na ilościowy pomiar w czasie rzeczywistym kinetyki wiązania oraz powinowactwa białko–ligand.[114] Jednak podstawowym narzędziem biochemicznym i biofizycznym wciąż pozostaje spektroskopia fluorescencyjna, w tym fluorescencja czasowo-rozdzielcza.[184] Metody fluorescencyjne są powszechnie wykorzystywane w badaniach oddziaływań białek z ligandami, umożliwiając m. in. pomiar kinetyki i termodynamiki wiązania. W celu badania danego procesu biologicznego projektowane są specjalne układy – sondy molekularne, którym w szczególności poświęcony jest niniejszy rozdział.

II.6.1. Sondy molekularne

Sondą molekularną nazywana jest cząsteczka lub grupa cząsteczek przeznaczona do charakterystyki właściwości innych molekuł. Zbudowana jest z dwóch elementów – części odpowiedzialnej za selektywne oddziaływania biologiczne oraz związanej z nią części generującej mierzalny sygnał analityczny (znacznik). Na skutek oddziaływania z analitem (wiązanie, degradacja, modyfikacja sondy) emitowany jest sygnał, na podstawie, którego wyznaczane są parametry fizyczne procesu (Rys. II.34). Sonda najczęściej projektowana jest w oparciu o strukturę naturalnego substratu lub liganda, którym może być mała cząsteczka, białko, czy też kwas nukleinowy (Rys. II.34) w taki sposób, aby wprowadzony znacznik w jak najmniejszym stopniu zaburzał oddziaływania, ale nadal pozostawał czuły na zmiany otoczenia. Części sondy połączone są ze sobą linkerem (łącznikiem), który również może wpływać na właściwości całej sondy, takie jak biodystrybucja.[185] Z tego względu opracowując strukturę sondy molekularnej należy także rozważyć właściwości linkera, np. długość, elastyczność, hydrofobowość oraz obecność ładunków.

Właściwości fizyczne znacznika determinują rodzaj powstającego sygnału oraz sposób jego detekcji (Rys. II.34). Sondy radioaktywne w swojej strukturze muszą zawierać radionuklid emitujący na przykład promieniowanie gamma wykorzystywane m. in. w tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (SPECT), czy też pozytony wykorzystywane w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Dużą część stanowią sondy wykorzystujące sygnał optyczny, analizowany w różnego typu metodach spektroskopowych, takich jak spektroskopia oscylacyjna (IR, ramanowska), elektronowa (absorpcja, fluorescencja, fosforescencja), czy też jądrowego rezonansu magnetycznego (np. ^{19}F NMR). Spośród sond optycznych jednymi z najszerzej stosowanych są sondy wykorzystujące zjawisko fluorescencji. Są one wykorzystywane w projektowaniu leków, obrazowaniu komórkowym, analizie środowiskowej oraz wielu innych zastosowaniach medycznych.[186] Zaletą technik fluorescencyjnych jest ich duża czułość oraz łatwa dostępność fluoroforów. Mikroskopia fluorescencyjna pozwala na uzyskanie obrazów komórkowych o wysokiej rozdzielczości przestrzennej i czasowej. Strukturą sondy można

manipulować w celu kontroli długości fali wzbudzania i emisji, powinowactwa do celu, reaktywności chemicznej oraz lokalizacji w komórce. Ponadto metody fluorescencyjne mogą być także wykorzystywane w analizach wysokoprzepustowych oraz wykrywaniu analitów.



Rys. II.34 Schematyczne przedstawienie elementów sondy molekularnej.

Odpowiednio zaprojektowana sonda powinna posiadać następujące właściwości:[187]

- Wysokie powinowactwo do celu molekularnego. Właściwość tę wyrażają takie parametry fizyczne, jak stała dysocjacji (lub jej odwrotność – stała asocjacji), stała inhibicji, czy też parametry kinetyczne reakcji. Gdy powinowactwo sondy jest zbyt niskie, daje ona odpowiedź analityczną dopiero w wysokich stężeniach celu molekularnego. Stała powinowactwa sondy do celu jest czynnikiem limitującym działanie metody;
- Wysoką specyficzność oddziaływania z celem molekularnym. Sondy molekularne działające niespecyficznie nie posiadają dobrze zdefiniowanego zestawu celów molekularnych, przez co mogą być stosowane jedynie do monitorowania ogólnych zmian zachodzących w układzie. Przykładowo niespecyficzne sondy przeznaczone do bioobrazowania pozwalają na obserwację ogólnych skutków choroby, np. zmian przepływu krwi. Z kolei specyficzne sondy molekularne oddziałują z konkretnymi biomarkerami, zaangażowanymi w badany proces biologiczny;
- Wysoką czułość. Parametr ten określa, w jakim stopniu niewielka zmiana stężenia substancji/oddziaływania zmienia mierzony sygnał analityczny. Im wyższa czułość tym lepsza jakość metody;
- Wysoki stosunek sygnału do szumu. Sondy molekularne generujące sygnał o wysokiej intensywności mogą mieć ograniczoną stosowalność, jeśli sygnał tła także jest wysoki. Dlatego też użyteczność sondy oceniana jest na podstawie stosunku intensywności generowanego sygnału do sygnału tła (szumu);
- Wysoką stabilność w warunkach pomiarowych. Sonda powinna wykazywać stabilność sygnału w warunkach pomiaru, aby zmiany sygnału miały źródło jedynie w oddziaływaniach z celem molekularnym;
- Niską immunogenność i toksyczność. Sondy molekularne przeznaczone do pomiarów *in vivo* powinny wykazywać minimalny poziom immugenności i toksyczności;
- Niski koszt produkcji. Wysoki koszt i trudna produkcja sondy limituje możliwości stosowania metody na dużą skalę, nawet, jeśli spełania ona wszystkie powyższe warunki.

W niniejszej pracy Autorka w szczególności skupiła się na otrzymywaniu i stosowaniu sond fluorescencyjnych. Ponadto część pracy doktorskiej obejmowała opracowanie sondy wykorzystującej nanomateriały w roli czynnika generującego elektryczny sygnał analityczny. Z

tego względu kolejne podrozdziały zostały poświęcone znacznikom fluorescencyjnym, a także zastosowaniom koniugatów małych cząsteczek z nanomateriałem.

II.6.2. Rodzaje reakcji bioortogonalnych

Znaczniki będące odpowiedzialne za generowanie sygnału analitycznego zwykle wprowadzane są w strukturę sond molekularnych poprzez reakcje chemiczne. Często są to molekuły, których otrzymanie jest kosztowne, dlatego synteza sondy powinna przebiegać wydajnie i selektywnie. Użytecznym narzędziem biofizycznym, przeznaczonym chociażby do obrazowania, są reakcje znakowania, które mogą zachodzić także wewnątrz żywych komórek. Z tych powodów popularnymi metodami w syntezie sond molekularnych są reakcje bioortogonalne. Chemia bioortogonalna obejmuje zestaw reakcji, w których reagujące ze sobą grupy nie interferują z endogennymi grupami funkcjonalnymi wewnątrz komórek, takimi jak aminy pierwszorzędowe, tiole, grupy karboksylowe i hydroksylowe obecne w białkach, czy też aldehydowe i ketonowe metabolitów.[188] Reakcje te mogą być prowadzone w środowisku biologicznym bez wpływu na przebieg procesów biologicznych i zachodzą bez konieczności stosowania rozpuszczalników organicznych, czy też warunków beztlenowych.

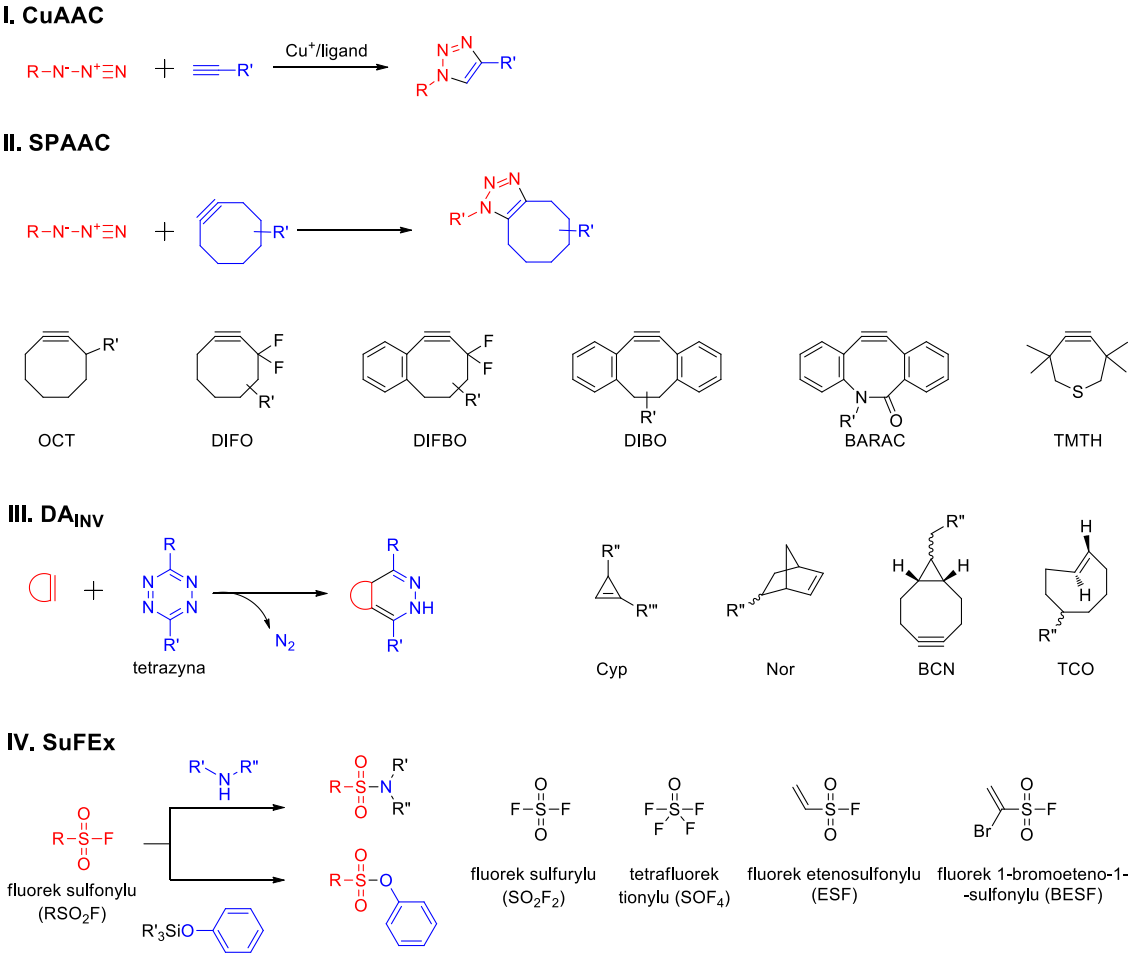
Grupy azydkowe $–N_3$ ze względu na swój mały rozmiar oraz reaktywność z wybranymi grupami funkcyjnymi stanowią atrakcyjne narzędzie modyfikacji biomolekuł. Przykładem jest reakcja ligacji Staudingera,[189] będąca modyfikacją redukcji Staudingera azydków przez trifenylofosfinę, stosowana do znakowania biomolekuł poprzez genetycznie kodowane grupy azydkowe (nienaturalne azydoaminokwasy).[190] Ligacja Staudingera zachodzi pomiędzy azydkami alkilowymi i pochodnymi triarylofosfiny z utworzeniem wiązania amidowego. Podejście to posiada pewne ograniczenia: kinetyka reakcji jest wolna, a substraty fosfinowe ulegają utlenianiu wewnątrz komórki, przez co muszą być stosowane w wysokich stężeniach.

Znana także jest reaktywność grup azydkowych z alkinami z otrzymaniem pierścieni triazolowych w dipolarnej cykloaddycji [3+2]. Reakcje te przebiegają w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia, jednak problem ten rozwiązuje zastosowanie katalizatora. Przykładem jest reakcja cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowana jonami miedzi (I) – CuAAC (Rys. II.35I).[191] Jony Cu^+ tworzą produkt przejściowy aktywujący grupy azydkową oraz alkinową. Reakcję można dodatkowo przyspieszyć stabilizując jony Cu^+ i chroniąc je przed utlenianiem, z zastosowanem odpowiednich ligandów (np. TBTA, THPTA). Głównym ograniczeniem podejścia CuAAC jest toksyczność jonów miedzi (I), będąca skutkiem ich pośredniczenia w powstawaniu reaktywnych form tlenu ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*) z O_2.[192] Dodatek wspomnianych ligandów, jak TBTA zmniejsza cytotoksyczności miedzy, gdyż pełnią one rolę chelatorów chroniących komórkę przed ROS.[193] W przypadku syntezy sond w reakcji CuAAC jony miedzi można w łatwy sposób usunąć z użyciem odczynnika kompleksującego, takiego jak kwas wersenowy (EDTA).

Innym sposobem przyspieszenia cykloaddycji azydkowo-alkinowej jest wykorzystanie naprężenia pierścienia cyklooktynu (OCT) w reakcji SPAAC (ang. *Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition*, Rys. II.35II). Metodologię SPAAC rozwinęła grupa Bertozzi w celu wyeliminowania cytotoksycznego katalizatora Cu^+.[194] Alkin obecny w cyklooktynie jest destabilizowany na skutek naprężeń pierścienia, co prowadzi do wzrostu jego reaktywności. Dodatkową destabilizację wprowadzają wyciągające elektrony grupy gem-fluorowe (difluorooktyn – DIFO) i pierścienie benzenowe (difluorobenzenocyklooktyn – DIFBO, dibenzenocyklooktyn – DIBO, biaryloazacyklooktyn – BARAC). Niedawno opracowano także

kolejny typ reagentów, jakimi są tiacykloheptyny – TMTH.[195] Znaczniki modyfikowane pochodnymi cyklooktynu są powszechnie stosowane w znakowaniu białek zawierających grupę azydkową wewnątrz złożonych układów biologicznych.[196]

Kolejnym przykładem reakcji ortogonalnej jest zbliżona do reakcji Dielsa-Aldera DA_{INV} (ang. *Inverse electron-demand Diels-Alder reaction*; IEDDA), będąca cykloaddycją zachodzącą pomiędzy bogatymi w elektrony dienofilami oraz ubogimi w elektrony dienami. W ostatnich latach grupa Foxa po raz pierwszy zaprezentowała możliwość wykorzystania wariantu reakcji DA_{INV} pomiędzy *trans*-cyklooktenami (TCO lub sTCO) oraz tetrazyną (Tz; Rys. II.35III).[197] Jest to szczególnie użyteczne w niskich stężeniach substratów, w których SPAAC zawodzi ze względu na wolną kinetykę. Reakcje z tetrazynami są specyficzne oraz nadzwyczajnie szybkie, a ich produkty stabilne w środowisku wodnym. Ponadto obecność tetrazyny w strukturze fluoroforu powoduje wygaszenie fluorescencji, która jest uwalniana na skutek cykloaddycji w naprężonymi alkenami lub alkinami. Dalszy rozwój prac nad reakcjami z tetrazynami doprowadził do opracowania kolejnych substratów alkenowych i alkinowych, jak: norborneny (Nor),[198] cyklopropeny (Cyp)[199] oraz bicyklononyny (BCN).[200]



Rys. II.35. Schematy ogólne reakcji bioortogonalnych CuAAC, SPAAC, DA_{INV} oraz SuFEx wraz z przykładowymi reagentami.

Zaledwie sześć lat temu (2014) grupa Sharplessa opracowała kolejny typ reakcji bioortogonalnej, tzw. SuFEx (ang. *Sulfur(VI)-Fluoride Exchange*).[201] Reakcja SuFEx nie wymaga stosowania katalizatorów metalicznych i zachodzi pomiędzy fluorkami sulfonylu, a szeroką gamą substratów: eterami arylosililowymi, alkoholami aromatycznymi, niektórymi

alkoholami alifatycznymi zabezpieczonymi sililem, aminami oraz nukleofilami węglowymi (Rys. II.35IV). Wiązanie S–F jest niezwykle stabilne i odporne na trudne warunki, jednak odpowiednia aktywacja umożliwia zajście substytucji nukleofilowej. Mechanizm aktywacji nie jest całkowicie wyjaśniony, jednak jego kluczowym elementem jest zdolność jonu fluorkowego do przejścia z silnego wiązania kowalencyjnego na grupę odchodzącą wspomaganego przez jony H^+ lub R_3Si^+ w bliskiej odległości oraz pod ścisłymi wymaganiami kinetycznymi i sterycznymi. Reakcję SuFEx można dodatkowo przyspieszyć stosując katalizatory Et_3N oraz DBU, lub wprowadzając przeciwjony bifluorkowe.[202] Do dziś łącznie opracowano pięć klas reagentów SuFEx (Rys. II.35IV): fluorek sulfurylu (SO_2F_2),[201] tetrafluorek tionylu (SOF_4),[203] fluorek etenosulfonylu (ESF)[204] oraz fluorek 1-bromoeteno-1-sulfonylu (BESF).[205] Pomimo, że metodologia SuFEx rozwinęła się dopiero w ostatnich kilku latach w literaturze istnieje już szereg jej zastosowań biologicznych, np. w profilowaniu kinaz,[206] czy też modyfikacji znanych leków przeciwnowotworowych celem zwiększenia ich aktywności.[207]

II.6.3. Znakowanie fluorescencyjne

Pomiary fluorescencyjne są często stowane w badaniach oddziaływań białko–ligand, ze względu na wysoką czułość oraz selektywność. Szczególną popularnością cieszą się małocząsteczkowe znaczniki, efektywnie generujące fluorescencyjny sygnał analityczny jednocześnie nie zaburzając oddziaływań biologicznych. Znaczniki wchodzące w skład sondy molekularnej zawierają dodatkowe modyfikacje, które wpływają na ich właściwości spektroskopowe, bądź umożliwiają przeprowadzenie reakcji chemicznej (grupy azydkowe, aminowe, alkinowe, itp.). Ponadto fluorofor połączony jest z resztą sondy linkerem o zmiennej długości, celem zmniejszenia ryzyka utraty powinowactwa sondy do białka oraz zapewnienia optymalnych oddziaływań. Popularnym linkerem jest glikol polietylenowy $H–(O–CH_2–CH_2)_n–OH$. Większość sond molekularnych wykorzystuje znaczniki oparte o konkretną strukturę „rdzenia" fluoroforów, które można zaliczyć do kilku głównych klas. Charakteryzują się one bardzo dobrymi właściwościami spektroskopowymi, wysoką stabilnością chemiczną oraz łatwą syntezą. Zrozumienie podstawowych właściwości elementów fluoryzujących jest istotne z punktu widzenia projektowania sond molekularnych o wysokiej jakości.

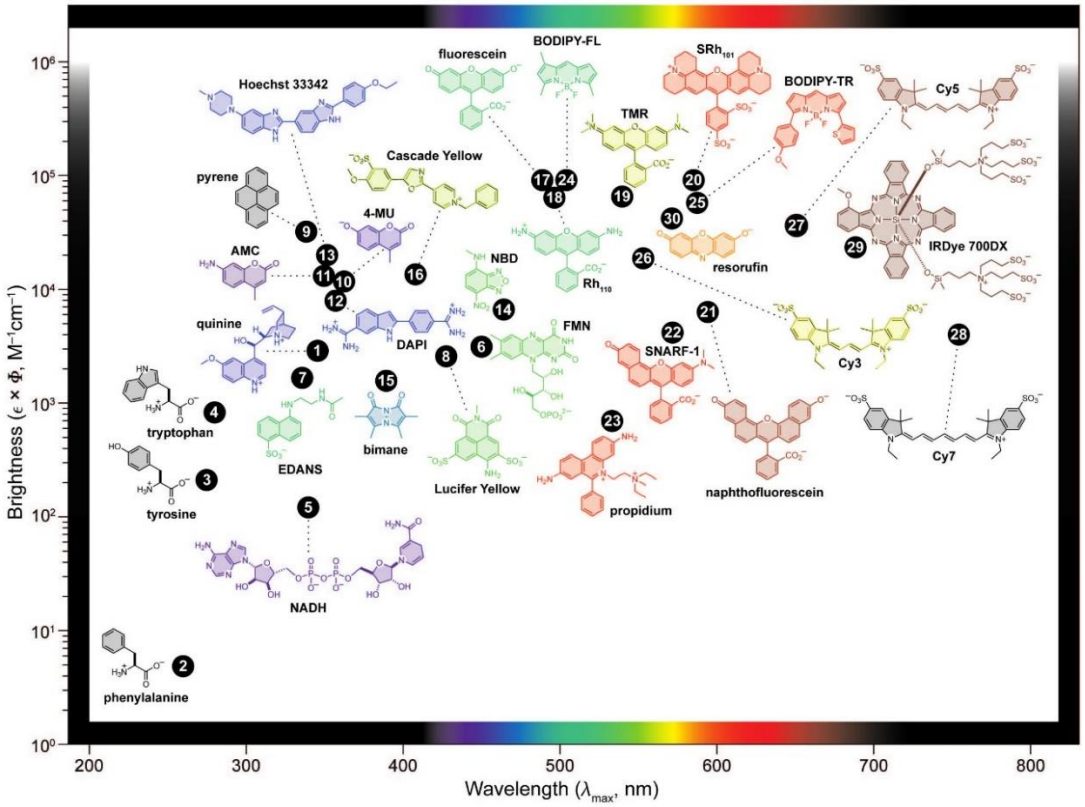
Właściwości fluorescencyjne świadczące o potencjalnym zastosowaniu znacznika opisuje szereg parametrów, takich jak:

i) maksimum absorpcji i emisji – położenie maksimów absorpcji i emisji jest związane z wielkością przerwy energetycznej między poziomem podstawowym oraz wzbudzonym. Zależy ono od struktury fluorofora oraz rodzaju rozpuszczalnika. Niektóre widma posiadają swoistą strukturę z wieloma maksimami (np. perylenu), odpowiadającymi wibracjom poziomów energetycznych stanu podstawowego i wzbudzonego. Z kolei inne związki, np. chinina, posiadają widma pozbawione struktury oscylacyjnej. Ze względu na możliwość interferencji z absorpcją i emisją biomolekuł najczęściej pożądane są znaczniki o maksimach znajdujących się w zakresie światła widzialnego;
ii) przesunięcie Stokesa – różnica w położeniu maksimów emisji i absorpcji. Molekuły o małym przesunięciu Stokesa są podatne na samowygaszanie poprzez transfer energii;
iii) molowy współczynnik absorpcji (ekstynkcji), ε – wielkość charakterystyczna molekuły, stała dla danej długości fali absorpcji, będąca miarą pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego.

iv) wydajność kwantowa, QY (ang. *quantum yield*) – stosunek liczby fotonów wyemitowanych do fotonów zaabsorbowanych;

v) czas życia fluorescencji, τ – czas, w którym molekuła przebywa w stanie wzbudzonym. Zwykle wynosi od 0,1 do 100 ns. Wartość τ ma znaczenie w pomiarach czasowo–rozdzielczych oraz anizotropii fluorescencji.[208]

Iloczyn molowego współczynnika absorpcji oraz wydajności kwantowej nazywany jest jasnością (ang. *brightness*) i jest miarą efektywności emisji fluoroforu wzbudzanego promieniowaniem o określonej długości fali. Zestawienie jasności i maksimum absorpcji wybranych fluoroforów przedstawiono na Rys. II.36.

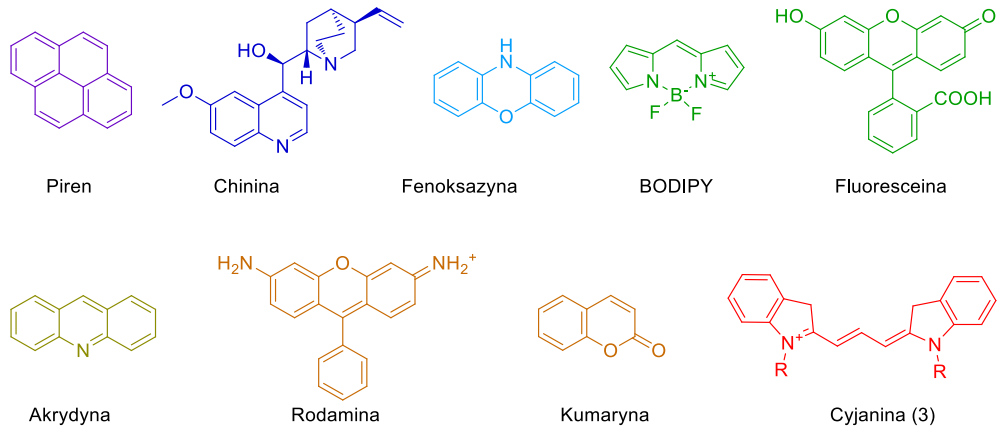


Rys. II.36. Główne klasy fluoroforów uszeregowane pod względem jasności i długości fali maksimum absorpcji. Kolor struktury odpowiada długości fali maksimum emisji. Rysunek zaczerpnięto z pracy Lavis et al. 2008.[209]

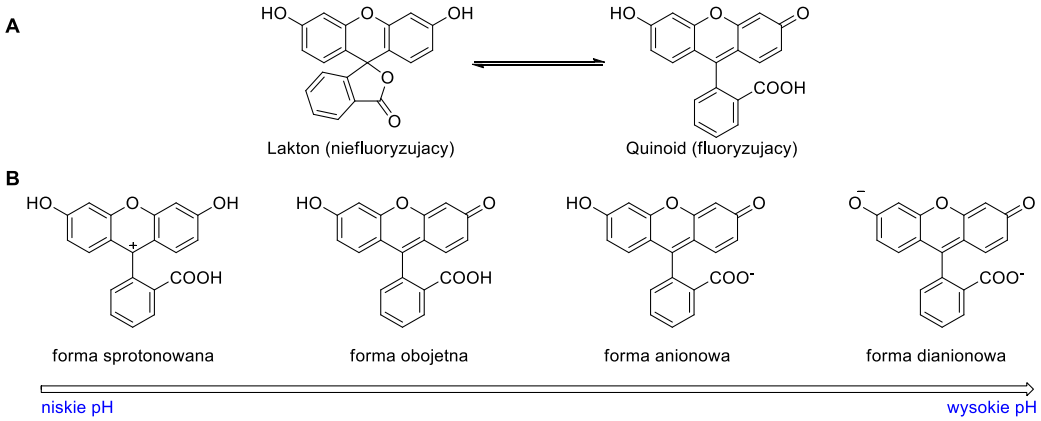
Jednym z pierwszym zidentyfikowanych fluoroforów była chinina, obecna chociażby w toniku, którą w 1845 odkrył Herschel.[210] Jest to naturalny związek, który znajduje się w korze drzewa chinowego. Innym przykładem naturalnych fluoroforów są aminokwasy aromatyczne: fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan. Najsilniej fluoryzujący jest tryptofan, wzbudzany w świetle UV, jednak jego fluorescencja jest bardzo słaba ($\varepsilon_{348\ nm}$ = 6300 $M^{-1}cm^{-1}$, QY = 0,13)[211]. Wrażliwość emisji tryptofanu na otoczenie znalazła szereg zastosowań biofizycznych do badań m.in. zwijania białek oraz wiązania ligandów.[212]

Do najpopularniejszych znaczników fluorescencyjnych zaliczane są fluoresceiny, rodaminy, cyjaniny, borodipirometeny (BODIPY), piren i jego pochodne, kumaryny, akrydyny oraz fenoksazyny (Rys. II.37). Znaczniki fluoresceinowe, będące pochodną 3,6–dihydroksyksantenu, znane są już od końca XIX wieku.[213] Posiadają wysokie wartości wydajności kwantowych, co przekłada się także na ich wysoką jasność. Charakterystyczną właściwością fluoresceiny jest jej występowanie w dwóch formach – otwartej fluoryzującej oraz zamkniętej (laktonowej) niefluoryzującej (Rys. II.38A). Fluoresceiny występują w kilku formach

protonacyjnych, które różnią się intensywnością fluorescencji (Rys. II.38B). W środowisku obojętnym największy udział ma monoanion, jednak najsilniejszą fluorescencję wykazuje dianion, przeważający w zasadowych warunkach. Modyfikując rdzeń ksantetowy fluoresceiny możliwe jest przesunięcie maksimów absorpcji i emisji. Zamiana atomu tlenu ksantenu grupą gem-dimetylową (dwie grupy metylowe przyłączone do atomu węgla) w strukturze karbofluoresceiny prowadzi do 53 nm przesunięcia batochromowego.[214] Pierścienie ksantenu modyfikowane dwoma grupami aminowymi/iminowymi (zamiast atomami tlenu jak we fluoresceinach) tworzą inną interesującą klasę barwników – rodaminy.



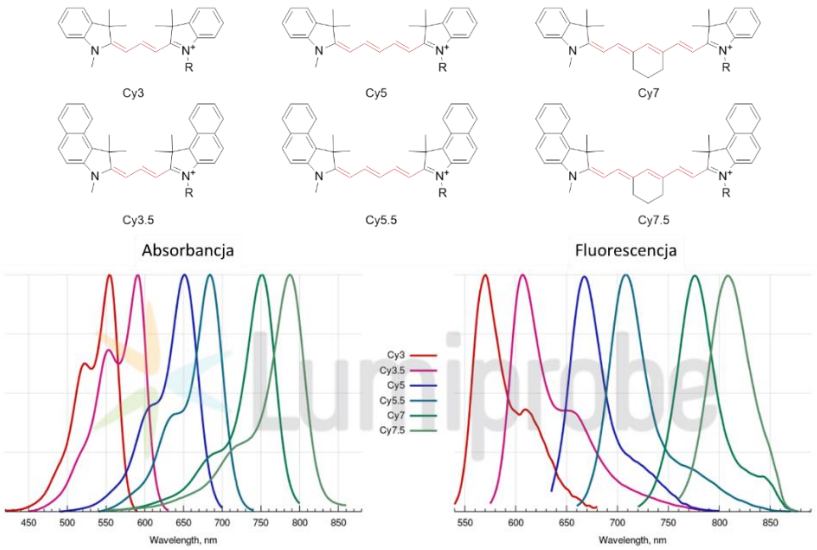
Rys. II.37. Struktury najczęściej wykorzystywanych fuoroforów. Kolor struktury odpowiada długości fali maksimum emisji.



Rys. A) II.38. Fluoryzująca i niefluoryzująca forma fluoresceiny; **B)** wpływ pH na stan protonacyjny fluoresceiny.

Kolejną rozpowszechnioną dużą grupą barwników są cyjaniny, których ogólna struktura oparta jest o pierścienie indolowe połączone łańcuchem (poli)metinowym. Wysoką jasność cyjaniny zawdzięczają dużym wartościom współczynników ekstynkcji (100 000 –300 000 $M^{-1}cm^{-1}$). W przeciwieństwie do fluorescein cyjaniny nie są wrażliwe na zmiany rozpuszczalnika oraz otoczenia. Strukturę cyjanin można modyfikować wydłużając łańcuch polimetinowy, co prowadzi do batochromowego przesunięcia maksimów absorpcji i emisji (Rys. II.39). Cyjanina 3 posiada pierścienie indolowe oddzielone od siebie trzema atomami węgla i emituje promieniowanie zielone o długości fali ~560 nm. Wydłużenie łącznika o dwa atomy przesuwa maksimum emisji do ~660 nm (cyjanina 5), a o kolejne dwa do ~770 nm (cyjanina 7). W przypadku cyjaniny 7 łącznik jest dodatkowo usztywniony pierścieniem, którego obecność powoduje zwiększenie wydajności kwantowej o 20% (QY = 0.3). Przesunięcie batochromowe można uzyskać także poprzez włączenie kolejnego pierścienia aromatycznego w obrębie indolu,

bez wydłużania łącznika polimetinowego. Uzyskane w ten sposób cyjaniny 3.5, 5.5 i 7.5 posiadają o ok. 30 nm przesunięte maksima w stronę większych długości fal. Szczególną popularność w badaniach układów biologicznych zyskały sulfocyjaniny, zawierające grupy sulfonowe zwiększające rozpuszczalność w środowisku wodnym. Ponadto cyjaniny i sulfocyjaniny można stosować zamiennie ze względu na zbliżone właściwości spektroskopowe. Interesującym wykorzystaniem znaczników cyjaninowych są sondy FRET, które zostaną omówione w kolejnych podrozdziałach.



Rys. II.39. Struktury wybranych barwników cyjaninowych wraz z odpowiadającymi im widmami absorpcji i emisji fluorescencji. Widma zaczerpnięto ze strony producenta Lumiprobe (https://www.lumiprobe.com/tech/cyanine-dyes).

Pochodne borodipirometenu (BODIPY) są wszechstronną klasą fluoroforów, charakteryzujących się wysoką wydajnością kwantową, brakiem ładunku, małym przesunięciem Stokesa oraz niewrażliwością emisji na zmiany warunków otoczenia. Przesunięcie Stokesa znacznika BDP-FL wynosi 6 nm (λ_{abs} = 503 nm, λ_{em} = 509 nm), a jego wydajność kwantowa jest zbliżona do jedności (QY = 0,97).[215] Nietypową właściwością BODIPY jest brak egzocyklicznych grup donorowych i akceptorowych, dzięki czemu mogą być modyfikowane w każdej pozycji. Zmiana podstawników na atomie boru na podstawniki fenolowe prowadzi do silnego przesunięcia batochromowego (λ_{abs} = 728 nm, λ_{em} = 746 nm).

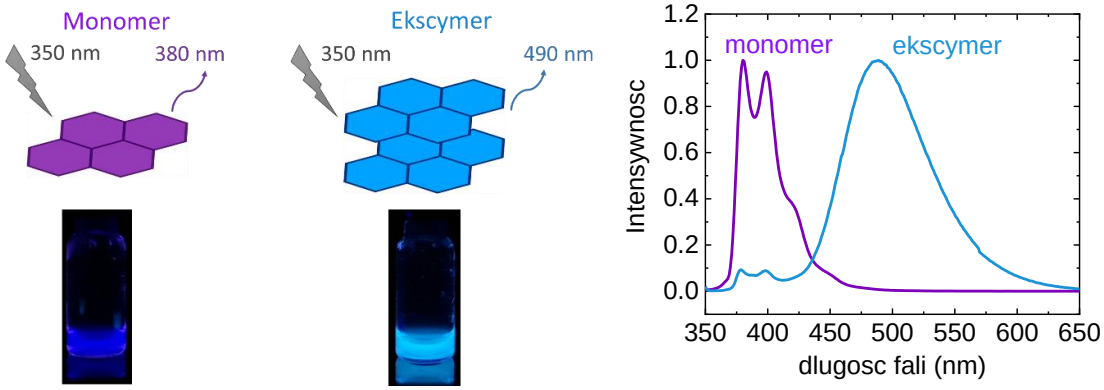
Innymi przykładami grup bawników są występujące w naturalnych produktach kumaryny oraz fenoksazyny (Nile red, Nile blue). Pochodne akrydyny nie mają wielu zastosowań komercyjnych, jednak dawniej były szeroko stosowanymi barwnikami. Interesujące są także barwniki zbudowany jedynie z pierścieni benzenowych, takie jak piren i perylen. Właściwości fluorescencyjne związków pirenowych zostaną osobno omówione w kolejnym podrozdziale.

Nie tylko małocząsteczkowe barwniki są wykorzystywane w znakowaniu molekuł biologicznych. Typowym przykładem markomoleuły fluorescencyjnej jest białko GFP (ang. *Green Fluorescence Protein*), za którego wyizolowanie z meduzy *Aequorea victoria* w 2008 roku przyznano nagrodę Nobla. Jest to niewielkie białko (26,9 kDa) przyjmujące strukturę β-baryłki (ang. *β-barrel*), w której wnętrzu aminokwasy seryna, tyrozyna i glicyna reagują ze sobą tworząc fluorofor imidazolinowy.[209] Pojedyncze mutacje doprowadziły do otrzymania wielu analogów GFP o zmienionych właściwościach spektroskopowych – BFP (ang. *Blue Fluorescence Protein*) emituje światło niebieskie, a YFP (ang. *Yellow Fluorescence Protein*) żółte.

W ostatnich latach rozwój nanotechnologii doprowadził do opracowania nowego typu znaczników o właściwościach fluorecencyjnych, jakimi są kropki kwantowe.[216] Są to półprzewodniki o wymiarach kilku nm, zdolne do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego, na skutego, czego elektron wzbudzany jest z pasma walencyjnego do przewodzącego tworząc parę elektron–dziura, tzw. ekscyton. Powrót elektronu do swojego stanu podstawowego prowadzi do emisji fluorescencji.

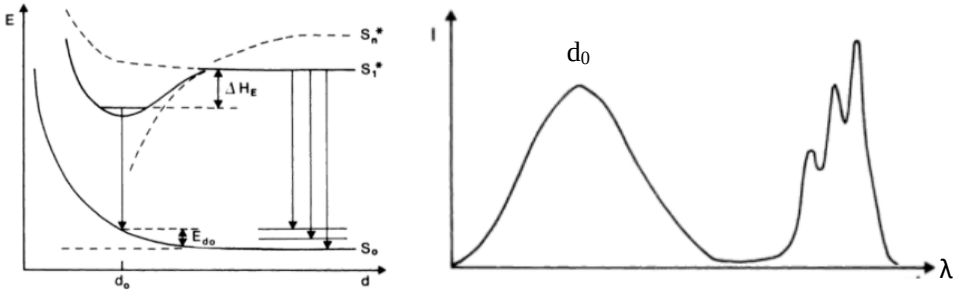
III.6.3.1. Ekscymery

Na fluorescencję barwników może wpływać wiele czynników środowiskowych, w tym odziaływania z otaczającymi molekułami. Niektóre znaczniki zdolne są do tworzenia kompleksów między sobą lub z innym fluoroforem, wykazujących inne właściwości emisyjne. Przykładem takiego kompleksu są ekscymery (ekscypleksy) powstałe na skutek oddziaływania cząsteczki fluoroforu w stanie wzbudzonym z cząsteczką w stanie podstawowym. Najbardziej znanym i najszerzej zbadanym barwnikiem zdolnym do tworzenia eksymerów jest piren i jego pochodne. Obecność emisji ekscymerowej sprawia, że widma absorpcji i emisji pirenu nie są swoimi odbiciami lustrzanymi (ang. *mirror-image rule*). W niskich stężeniach piren wzbudzany promieniowaniem o długości fali ~350 nm posiada ustrukturyzowane widmo monomerowe z dwoma maksimami ~380 i ~400 nm (Rys. II.40). W wyższych stężeniach rejestrowane widmo emisji składa się z batochromowo przesuniętego, szerokiego, nieustrukturyzowanego pasma ekscymerowego (~490 nm; Rys. II.40). Zależność kształtu widma emisji fluorescencji pirenu od stężenia jest cechą charakterystyczną pirenu. Wraz ze wzrostem stężenia pirenu intensywność emisji monomerowej maleje, na rzecz powstającego pasma ekscymerowego.



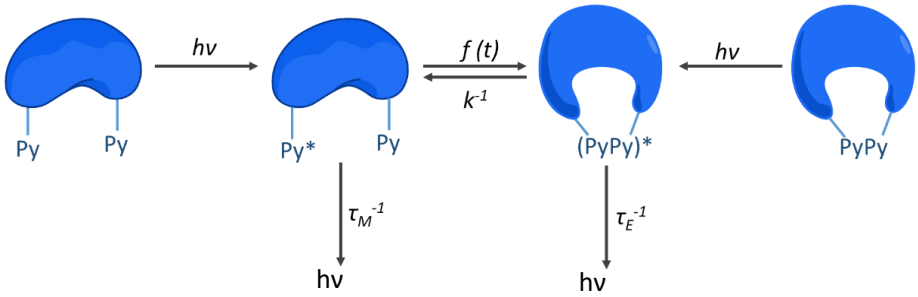
Rys. II.40. Porównanie emisji monomerowej i ekscymerowej pirenu.

Źródło batochromowego przesunięcia emisji ekscymerowej oraz braku ustrukturyzowania prezentuje schematycznie diagram poziomów energetycznych (Rys. II.41). Przesunięcie maksimum wynika z częściowej dyssypacji energii stanu wzbudzonego w trakcie formowania ekscymeru. Natomiast brak ustrukturyzowania jest konsekwencją tego, iż przejeście energetyczne następuje ze stanu związanego do niezwiązanego. W potencjale niezwiązanego stanu podstawowego nie ma struktury oscylacyjnej.



Rys. II.41. Schematyczne przedstawienie diagramu poziomów energetycznych (*E*) w funkcji odległości między molekułami oraz widma emisji (*I*) monomeru i ekscymeru. Wielkość d_0 oznacza równowagową odległość międzymolekularną stanu ekscymerowego.

W celu utworzenia kanapkowego kompleksu ekscymerowego molekuły pirenu muszą znaleźć się w bardzo bliskiej odległości 5–10 Å[217] (1 Å = 10^{-10} m). Efekt ten można osiągnąć nie tylko podwyższając stężenie molekuł, ale również poprzez zbliżenie przestrzenne fragmentów cząsteczki zawierającej dwa znaczniki ekscymerowe, z utworzeniem oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Proces formowania ekscymeru przez cząsteczki pirenu przyłączone kowalencyjnie do makromolekuł dostarcza wielu informacji o ich dynamice oraz zmianach strukturalnych.[218] Kinetykę formowania ekscymeru fluorescencyjnie znakowanych makromolekuł opisuje zmodyfikowany schemat Birksa (Rys. II.42).[219] Na skutek absorpcji fotonu wzbudzona cząsteczka pirenu może emitować fluorescencję (monomerową) z czasem życia τ_M, lub utworzyć kompleks ekscymerowy, jeśli napotka w bliskiej odległości molekułę pirenu w stanie podstawowym. Stała szybkości procesu formowania ekscymeru jest zależna od czasu *f*(t). Ekscymer może wyemitować promieniowanie w postaci fluorescencji (czas życia τ_E), bądź ulec dysocjacji ze stałą szybkości k_{-1}. Ze względu na różnicę w wartości czasów τ_E i τ_M ($\tau_M > \tau_E$) proces formowania ekscymeru może także być charakteryzowany z zastosowaniem pomiarów czasowo-rozdzielczych. To właśnie dzięki długiemu czasowi życia pirenu w stanie wzbudzonym (> 100 ns) molekuła ma wystarczająco dużo czasu na spotkanie z drugą cząsteczką w stanie podstawowym, przez co możliwe jest utworzenie ekscymeru.

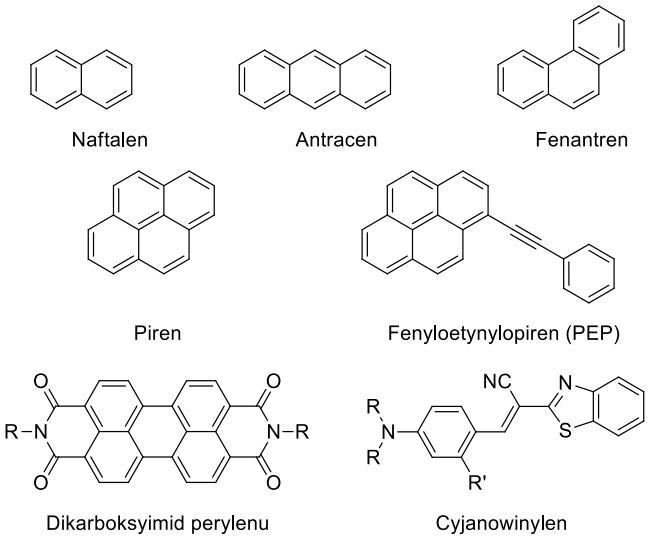


Rys. II.42. Formowanie ekscymeru pomiędzy molekułami pirenu przyłączonymi kowalencyjnie do makromolekuły.

Zdolność znacznika fluorescencyjnego do tworzenia kompleksów ekscymeru związana jest z obecnością płaskich układów pierścieni aromatycznych. Dwupierścieniowy naftalen[220] oraz trójpierścieniowe antracen[221] i fenatren[222] (Rys. II.43) w pewnym stopniu są zdolne do formowania ekscymerów, szczególnie w stanie krystalicznym.[223] Ponadto pochodne pirenu również mogą emitować fluorescencję ekscymerową. Przykładem jest 1-fenyloetynylopiren PEP (ang. *phenylethynylpyrene*), w którego strukturze znajduje się dodatkowy pierścień aromatyczny, połączony z czterema pierścieniami pirenu dwoma atomami węgla o hybrydyzacji sp (Rys. II.43).[224] Rozbudowanie chromoforu o grupę fenyloetynylową prowadzi do wzrostu absorpcji

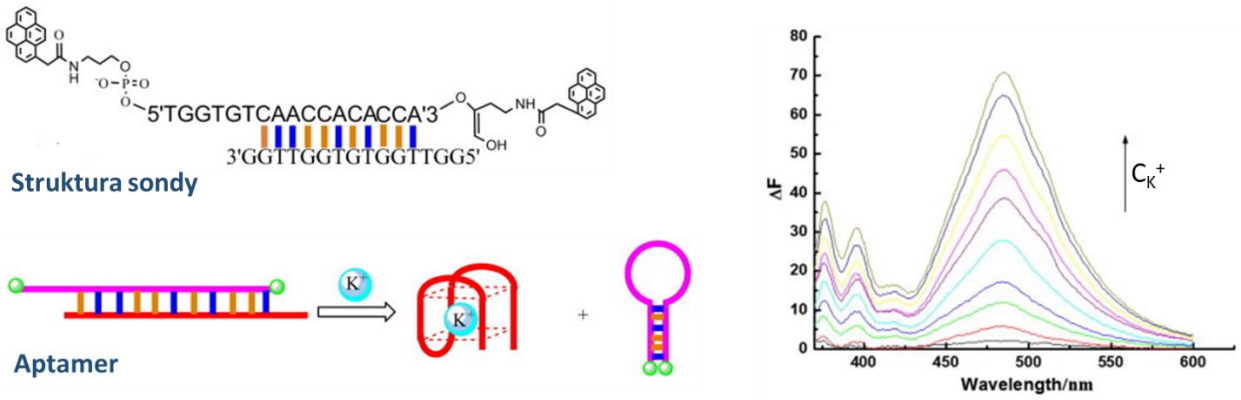
(wyższy molowy współczynnik ekstynkcji), batochromowego przesunięcia maksimów absorpcji i emisji oraz zmniejszenia przesunięcia Stokesa i czasu życia stanu wzbudzonego.[225] PEP tworzy ekscymery w roztworze THF, jednak jego stężenie wymagane do uformowania dupleksu jest 2–3 krotnie wyższe w porównaniu do pirenu, co koreluje z jego niższym czasem życia stanu wzbudzonego.[226] Widma absorpcji i emisji PEP są przesunięte batochromowo o odpowiednio ok. 50 i 30 nm w porównaniu do pirenu. Perylen, który podobnie do PEP posiada pięć pierścieni aromatycznych ma niskie wartości czasu życia stanu wzbudzonego (kilka ns), co sprawia, że nie wykazuje on emisji ekscymerowej. Jednak grupa pochodnych perylenu – dikarboksyimid perylenu PDI (ang. *perylene dicarboxyimide*; Rys. II.43) o rozbudowanym układzie π w wyższych stężeniach może formować agregaty, a także kompleksy ekscymerowe.[227]

Obok wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (PAH, ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) istnieją także innego rodzaju fluorofory tworzące ekscymery. Przykładem są znaczniki cyjanowinylenowe (Rys. II.43), których zarówno absorpcja, jak i emisja znajdują się w zakresie światła widzialnego (λ_{abs} = 440–500 nm, λ_{em} = 620–660 nm). Fluorescencja tego typu znaczników jest bardzo słaba w roztworach, natomiast znacząco rośnie w ciele stałym. Przykładem wykorzystania emisji ekscymerowej znaczników cyjanowinylenowych jest sonda przeznaczona do wykrywania nieznakowanego DNA w roztworach wodnych. Kationowy analog barwnika cyjanowinylenowego oddziałuje elektrostatycznie z łańcuchem fosforanowym DNA, prowadząc do agregacji znacznika i pojawienia się pasma fluorescencji ekscymerowej.[228]



Rys. II.43. Struktury fluoroforów zdolnych do tworzenia ekscymerów: piren, fenyloetynylopiren, dikarboksyimid perylenu oraz barwnik cyjanowinylenowy.[228]

Zależność kształtu widma od odległości pomiędzy molekułami zdolnymi do formowania ekscymerów znalazła szerokie zastosowanie w badaniach zmian strukturalnych makromolekuł, a także monitorowania enzymatycznej degradacji. Przykładem wykorzystania pirenu w badaniach molekuł biologicznych jest biosensor przeznaczony do monitorowania formowania aptameru w obecności jonów potasowych (Rys. II.44).[229] W tym celu zaprojektowano oligonukleotyd w pełni lub częściowo komplementarny do fragmentu aptameru wiążącego trombinę, który zawierał znaczniki pirenowe na końcach 5' i 3'. W obecności jonów potasowych niemodyfikowana nić tworzyła kwadrupleks, natomiast znakowana nić strukturę spinki do włosów, w której to molekuły pirenu znajdowały się odpowiednio blisko siebie, aby emitować fluorescencję ekscymerową. Wzrost stężenia jonów K^+ koreluje zatem ze wzrostem intensywności fluorescencji.



Rys. II.44. Elementy rysunku zaczerpnięto z pracy Shi, et. al. 2010.[229]

III.6.3.2. FRET

Jednym z najszerzej zbadanych zjawisk fotofizycznych zachodzących pomiędzy dwoma fluorofortami jest rezonansowy transfer energii Förstera FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*). Zjawisko FRET zachodzi pomiędzy wzbudzoną molekułą donora (D), a akceptorem (A) w stanie podstawowym. Zwykle donor emituje krótsze długości fali, które pokrywają się w pewnym stopniu z widmem absorpcji akceptora. Jednak istotne jest, iż efekt FRET nie polega na emisji fotonu przez donor i jego reabsorpcję przez akceptor. Transfer energii zachodzi bez pojawienia się fotonu i jest efektem dalekozasięgowego oddziaływania dipol–dipol pomiędzy donorem i akceptorem. Teoria transferu energii przyjmuje, że fluorofor jest oscylującym dipolem, który w obecności innego dipola o zliżonej częstości rezonansowej może wymieniać z nim energię.[230]

Efektywność transferu energii zależy głównie od następujących czynników: (i) stopnia pokrywania widm emisji D i absorpcji A, (ii) wydajności kwantowej donora, (iii) odległości pomiędzy D i A oraz (iv) względnej orientacji momentów przejścia. Szybkość transferu energii silnie zależy od odległości D–A (r) – jest proporcjonalna do r^{-6} i można opisać ją wzorem:

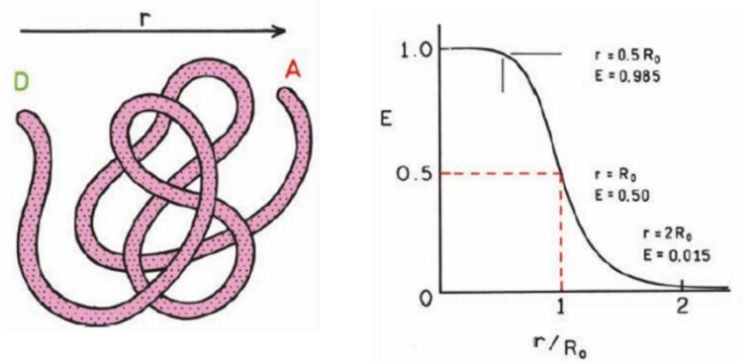
$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6$$

gdzie: τ_D – czas życia stanu wzbudzonego donora w nieobecności akceptora, R_0 – odległość Förstera, r – odległość między donorem i akceptorem.
Odległość Förstera R_0 odpowiada odległości D–A, dla której wydajność transferu energii wynosi 50%. W tych warunkach szybkość transferu jest równa stałej szybkości emisji donora $1/\tau_D$ ($r = R_0$). Jeśli szybkość transferu jest dużo większa od τ_D wtedy transfer energii zachodzi wydajnie. Samą wydajność transferu energii E można zdefiniować równaniem:

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Wyrażenie to obrazuje, jak silnie każda zmiana odległości r wpływa na wydajność transferu, co pozwala na jego ilościową ocenę na podstawie rejestrowanych widm fluorescencyjnych. Z tego powodu zjawisko FRET często określane jest mianem „linijki spektroskopowej”.[231] Dzięki temu FRET może być stosowany do charakterystyki zmian konformacyjnych biomolekuł, zawierających znaczniki tworzące parę D–A. Na Rys. II.45 zaprezentowano, w jaki sposób

wydajność transferu zmienia się wraz ze zmianą odległości r. Dla odległości $r = 2R_0$ wydajność transferu energii jest praktycznie znikoma.



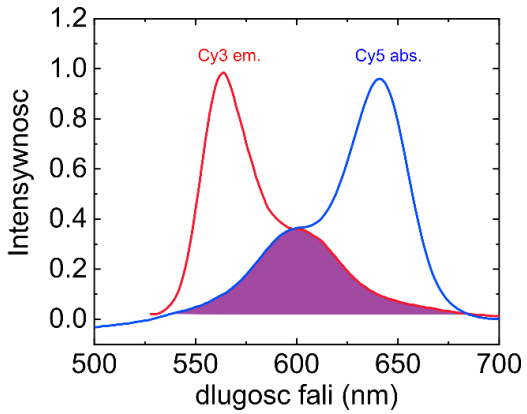
Rys. II.45. Zależność wydajności transferu energii E od odległości między donorem i akceptorem. Rysunki zaczerpnięto z książki *Principles of fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz.[184]

Zgodnie z powyższymi rozważaniami efektywność transferu E powiązana jest z wartością odległości Förstera R_0, która zależy od wielu czynników i można wyrazić ją za pomocą wzoru:

$$R_0^6 = \frac{9000(ln10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda$$

gdzie κ^2 to czynnik orientacji dipoli, Q_D – wydajność kwantowa donora, N – liczba Avogadro, n – współczynnik załamania ośrodka, $F_D(\lambda)$ – poprawiona intensywność fluorescencji donora w zakresie λ do $\lambda + \Delta\lambda$ ze znormalizowaną powierzchnią pod widmem emisji, $\varepsilon_A(\lambda)$ – współczynnik ekstynkcji akceptora dla długości fali λ, λ – długość fali wzbudzania układu.

Całka we wzorze nazywana jest inaczej całką integralną, wyrażającą stopeń pokrywania widm emisji D i absorpcji A, przy czym jej wartość jest inna dla różnych par D–A. W ogólności im większe pokrywanie widm, tym wyższa wartość R_0, a co za tym idzie większa efektywność transferu FRET. Podobny wpływ ma molowy współczynnik ekstynkcji akceptora $\varepsilon_A(\lambda)$, do którego wartość R_0 jest wprost proporcjonalna. Przykład widma emisji jednego fluorofora (Cy3) oraz absorpcji drugiego fluorofora (Cy5) tworzących parę FRET zaprezentowano na Rys. II.46.



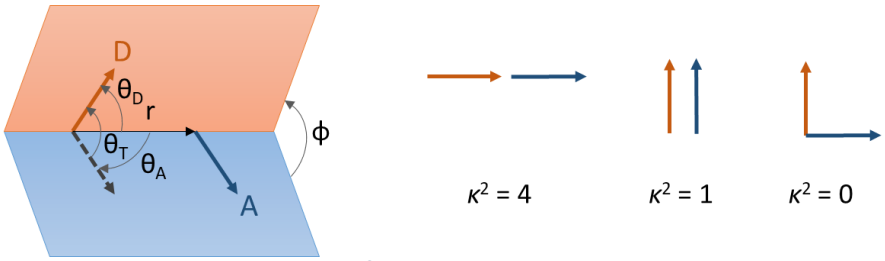
Rys. II.46. Widmo absorpcji cyjaniny 3 (donora) oraz emisji cyjaniny 5 (akceptora) z zaznaczonym obszarem pokrywania widm (fioletowy).

Czynnik orientacji κ^2, który pojawił się w równaniu na odległość Förstera opisuje względną orientację momentów przejścia donora oraz akceptora. Zależność czynnika orientacji od położenia cząsteczek donora i akceptora względem siebie można zapisać następującym wzorem:

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

gdzie θ_T – kąt pomiędzy momentem przejścia donora, a momentem przejścia akceptora, θ_D i θ_A – kąty pomiędzy momentami przejścia, a wektorem łączącym donor i akceptor r oraz φ – kąt pomiędzy płaszczyznami (Rys. II.47). Wartość κ^2 może wynosić od 0 dla ortogonalnego

ustawienia pary D–A do 4 dla ustawienia równoległego w jednej linii (*head-to-tail*). Zwykle przyjmuje się, że jego wartość wynosi 2/3, co odpowiada uśrednieniu losowych ruchów donora i akceptora.



Rys. II.47. Zależność czynnika orientacji κ^2 od kierunku dipola emisji donora oraz dipola absorpcji akceptora. Rysunek przygotowano na podstawie książki *Principles of fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz.[184]

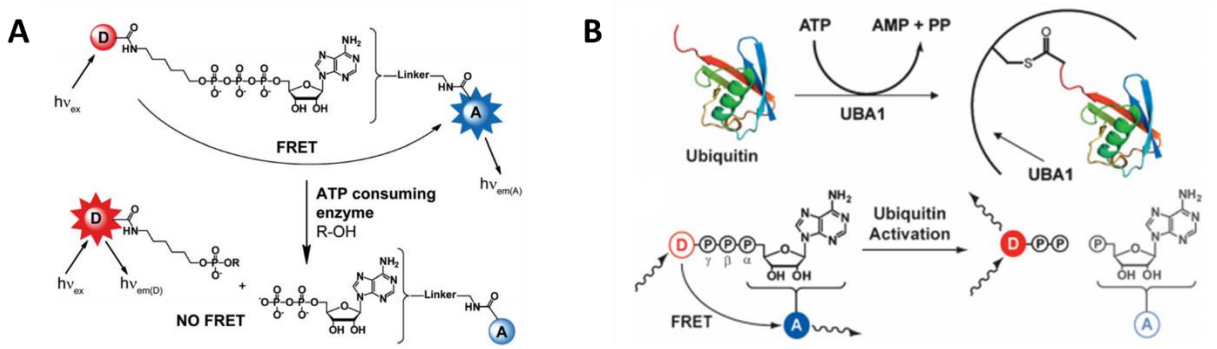
Najczęściej wykorzystywane pary FRET tworzone są przez znaczniki emitujące promieniowanie z zakresu od UV do bliskiego IR. Zwykle charakteryzują się szerokimi widmami absorpcji i emisji oraz małymi wartościami przesunięcia Stokesa. Często stosowane są fluoresceiny, ze względu na wysokie wydajności kwantowe, dobrą rozpuszczalność oraz łatwość wprowadzania modyfikacji chemicznych. Mogą one być donorem dla szerokiej gamy barwników, np. rodaminowych. Sama fluoresceina jest wrażliwa na pH środowiska oraz podatna na fotowygaszanie, dlatego dobrą alternatywą jest stosowanie jej pochodnych, takich jak fluorowane analogi (Oregon Green) oraz rodzina barwników Alexa Fluor, zawierająca silnie zróżnicowane struktury fluoresceinowe. Kolejnym przykładem jednych z najbardziej rozpowszechnionych znaczników tworzących pary FRET są cyjaniny, np. Cy3–Cy5 i Cy5–Cy7.

Obok małych organicznych barwników istnieją także dwie inne klasy obiektów zdolnych do utworzenia pary FRET: białka fluorescencyjne oraz kropki kwantowe. Stosowanie białek fluorescencyjnych ma wiele korzyści nad małocząsteczkowymi znacznikami.[232] Mogą być łatwo wprowadzone do białek, odpowiadających za oddziaływanie biologiczne z zastosowaniem metod inżynierii genetycznej. Dzięki wykorzystaniu promotorów specyficznych dla tkanek białka fluorescencyjne nadają wysoką specyficzność komórkową, a także subkomórkową. W przeciwieństwie do małocząsteczkowych znaczników wykazują wysoką stabilność wewnątrz komórki i mogą w łatwy sposób pokonać barierę błony komórkowej z wykorzystaniem transfekcji, bądź infekcji wirusowej. Typowym przedstawicielem białka fluorescencyjnego jest GFP oraz jego pochodne.

Stosunkowo niedawno odkryte kropki kwantowe stanowią trzecią grupę obiektów fluorescencyjnych, które także mogą wykazywać efekt FRET. Posiadają one bardzo dobre właściwości fluorescencyjne, jak: zależność widma emisji od wielkość kropki, szerokie widma wzbudzania, intensywna fluorescencja, wysoka fotostabilność oraz biokompatybilność.[233]

Zjawisko FRET jest szczególnie użyteczne w bioanalizie ze względu na wysoką czułość na niewielkie zmiany położeń donora i akceptora względem siebie. Ponadto transfer energii przeważnie nie zależy od rodzaju makromolekuły.[184] Na podstawie rejestrowanych widm fluorescencyjnych możliwe jest obliczenie odległości D–A.[234] Odległość ta może ulegać zmianie nie tylko na skutek zmian konformacyjnych dwuznakowanej biomolekuły, ale także pod wpływem degradacji jej struktury. Małocząsteczkowe związki, zawierające znaczniki tworzące parę FRET znalazły zastosowanie w monitorowaniu procesów enzymatycznych. Przykładem jest sonda molekularna ATP, w której strukturze w obrębie terminalnej reszty fosforanowej wprowadzono jeden znacznik, natomiast drugi w pozycji 2'-*O* rybozy lub N6-adenozyny.

Związek znakowany na rybozie został wykorzystany do monitorowania hydrolizy enzymatycznej sondy ATP przez modelową fosfodiesterazę PDE-I (Rys. II.48A).[235] Sonda zawierała różne kombinacje par FRET – cyjaniny oraz sulfocyjaniny 3 i 5. W emisji sondy dwuznakowanej widoczny jest wewnątrzcząsteczkowy efekt FRET pomiędzy znacznikami, który zanika pod wpływem odcięcia przez enzym terminalnej reszty fosforanowej wraz z donorem. Inny przykład sondy FRET ATP znakowanej w pozycji terminalnego fosforanu i N6-adenozyny został zastosowany do monitorowania procesu aktywacji ubikwityny przez białko UBA1, z równoczesną hydrolizą ATP do AMP i pp (Rys. II.48B).[236] Również w tym przypadku degradacja dwuznakowanej sondy ATP prowadzi do zaniku efektu FRET.



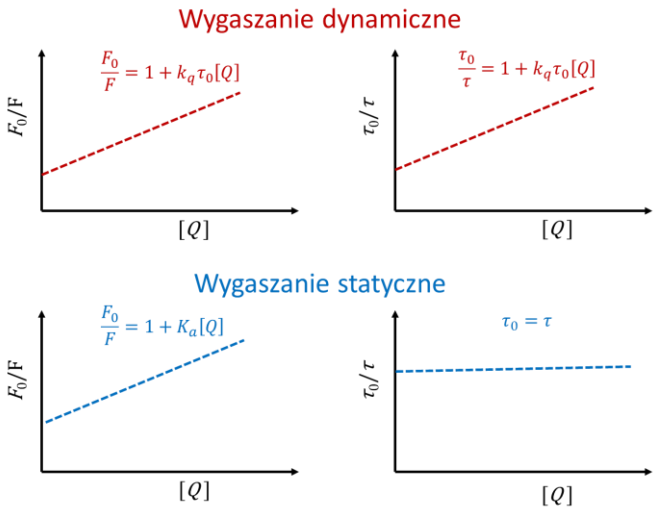
Rys. II.48. A) Schemat działania i struktura sondy FRET, przeznaczonej do monitorowania reakcji hydrolizy ATP, katalizowanej przez fosfodiesterazę z jadu węża PDE-I;[237] **B)** Mechanizm aktywacji ubikwityny przez białko UBA1 o akywności pirofosfatazy oraz struktura ogólna znakowanego analogu ATP – fluorescencyjnej sondy FRET.[238]

III.6.3.3. Fluorofor–wygaszacz

W poprzednich podrozdziałach omówiono przykłady zjawisk fluorescencyjnych, pojawiających się w wyniku oddziaływania dwóch znaczników fluorescencyjnych. Jednak już samo oddziaływanie pojedynczego znacznika z otaczającymi molekułami może prowadzić do mierzalnych zmian fluorescencji. Każdy proces, który zmniejsza intensywność fluorescencji nazywany jest wygaszaniem, a substancja, pod której wpływem dochodzi do wygaszania – wygaszaczem. Wysoka gęstość optyczna lub mętność próbki skutkuje zmniejszeniem intensywności fluorescencji, jednak ten typ wygaszania zawiera niewielką ilość informacji o molekule. Fluorescencja może ulec wygaszeniu na skutek wielu oddziaływań molekularnych, włączając w to reakcje w stanie wzbudzonym, transfer energii, formowanie kompleksu w stanie podstawowym, czy też wygaszanie kolizyjne.

Zjawiska wygaszania w ogólności można podzielić na dwa rodzaje: dynamiczne oraz statyczne. Wygaszanie kolizyjne (dynamiczne) zachodzi w trakcie zderzeń cząsteczek fluorofora i wygaszacza, które ułatwiają bezpromieniste przejście do stanu podstawowego. Jest ono skutkiem dyfuzyjnego zbliżenia obydwu molekuł w ciągu czasu życia stanu wzbudzonego fluorofora (zależność od czasu). Jednym z najbardziej powszechnych wygaszaczy kolizyjnych jest tlen molekularny,[239] zdolny do wygaszania większości znanych fluoroforów. Z tego powodu przed wykonaniem pomiarów fluorescencyjnych istotne jest usunięcie tlenu z buforu pomiarowego. Można tego dokonać poprzez odgazowanie, np. umieszczając naczynie z buforem przez odpowiedni czas w eksykatorze próżniowym, lub przemywając bufor gazem obojętnym (argonem, azotem). Innymi przykładami znanych wygaszaczy kolizyjnych są nadtlenek wodoru, tlenek azotu (NO) oraz jon jodkowy I^-. Niektóre cząsteczki wygaszaczy potrafią tworzyć kompleks z fluoroforem, który nie posiada właściwości fluoryzujących. Tego typu

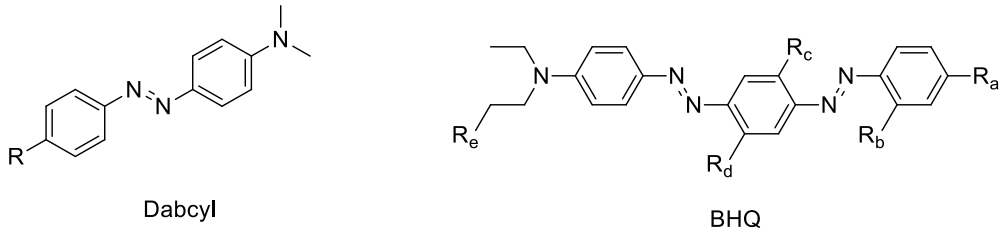
oddziaływanie nazywane jest wygaszaniem statycznym i jest źródłem informacji o wiązaniu fluorofor–wygaszacz. Informacja o rodzaju wygaszania uzyskiwana jest poprzez wyznaczenie i analizę krzywych Sterna-Volmera. Są to zależności stosunku intensywności fluorescencji oraz czasu życia stanu wzbudzonego przed do wartości po oddziaływaniu z wygaszaczem (F_0/F oraz τ_0/τ), od stężenia wygaszacza (Rys. II.49). Zarówno w przypadku czysto dynamicznego i statycznego wygaszania F_0/F rośnie liniowo wraz ze stężeniem wygaszacza. Jednak tylko dynamiczne wygaszanie prowadzi do zmian czasów życia τ, co wynika z faktu, iż molekuła wygaszacza oddziałuje z fluoroforem w stanie wzbudzonym. W wygaszaniu statycznym tworzący się kompleks nie emituje promieniowania, ale stan wzbudzony pozostałych molekuł fluorofora, które nie uległy kompleksowaniu pozostaje niezmieniony. Wynika z tego, że τ fluorofora nie ulega zmianie wraz ze wzrostem stężenia wygaszacza. Rodzaj wygaszania można także zweryfikować badając wpływ temperatury lub lepkości na przebieg krzywych F_0/F. Wyższe temperatury zwiększają dyfuzję, a co za tym idzie także ilość zderzeń wygaszających. Z kolei stałe dysocjacji kompleksów wygaszacz–fluorofor (słabsze wiązanie) zwiększają się prowadząc do zmniejszenia wygaszania statycznego. W rzeczywistości w wielu przypadkach fluorescencja wygaszana jest w sposób mieszany (dynamiczny i statyczny).



Rys. II.49. Krzywe Sterna-Volmera czystego wygaszania dynamicznego oraz statycznego; F_0, τ_0 – intensywność i czas życia fluorescencji przy braku wygaszacza; F, τ – intensywność i czas życia fluorescencji w obecności wygaszacza; $k_q\tau_0$ – stała wygaszania dynamicznego; K_a – stała asocjacji fluorofora i wygaszacza; $[Q]$ – stężenie wygaszacza.

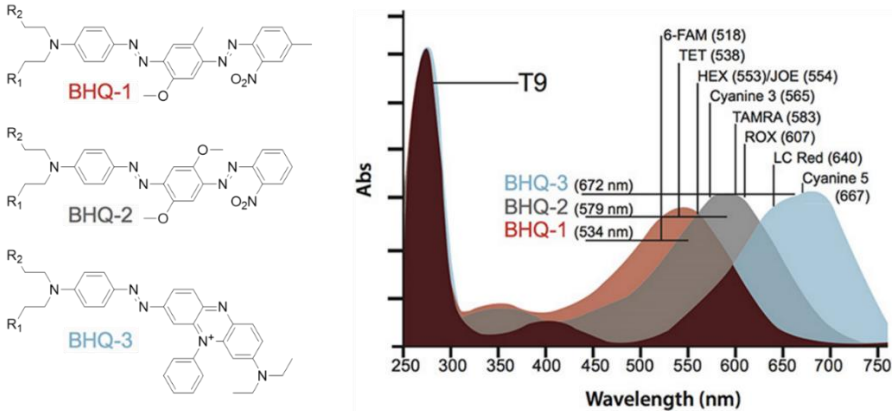
Zarówno w przypadku wygaszania dynamicznego, jak i statycznego fluorofor i wygaszacz muszą zbliżyć się do siebie na stosunkowo małą odległość. Istnieją także inne mechanizmy wygaszania, jak chociażby omówione już zjawisko FRET, w którym akceptorem jest niefluoryzująca substancja. Wygaszacze tego typu nazywane są ciemnymi (ang. *dark quenchers*), a ich najbardziej rozpowszechnionym przykładem jest dabcyl. Jest to barwnik azowy, zawierający strukturę R–N=N–R', gdzie R to modyfikowane grupy arylowe (Rys. II.50). Dabcyl posiada szerokie i intensywne widmo absorpcji w zakresie światła widzialnego (λ_{max} = 453 nm), a transfer energii zachodzi wydajnie dla związków emitujących światło niebieskie i częściowo zielone (390–510 nm), np. fluoresceiny, BDP-FL. Pomimo, że jest on wykorzystywany w rozwoju wielu zastosowań FRET, jego niska wydajność wygaszania fluoroforów emitujących promieniowanie o wyższych długościach fal (rodaminy, cyjaniny) stanowi czynnik limitujący. Z tego powodu w minionych latach opracowano wiele grup wygaszaczy FRET, dobranych odpowiednio do niewielkiej liczby fluoroforów. Przykładem takiej grupy są wygaszacze BHQ (ang. *Black Hole Quencher*), podobnie jak dabcyl zawierające grupę azową –N=N–, której to zapewniają swoje unikalne właściwości fotochemiczne (Rys. II.50). Wygaszacze BHQ zostały zaprojektowane i otrzymane w 2000 roku przez firmę Biosearch Technologies. Na serię składają się cztery molekuły: BHQ-0, -1, -2 i -3, których widma absorpcyjne przekrywają cały zakres światła widzialnego oraz bliskiego IR, dzięki czemu

mogą być stosowane z wieloma donorami fluoryzującymi. Innymi znanymi wygaszaczami o szerokim zakresie zastosowań są Tide Quenchers™ (np. TQ3, TQ5WS), których struktury nie są ujawnione.oraz ATTO-TEC (np. ATTO 540Q, ATTO 575Q).



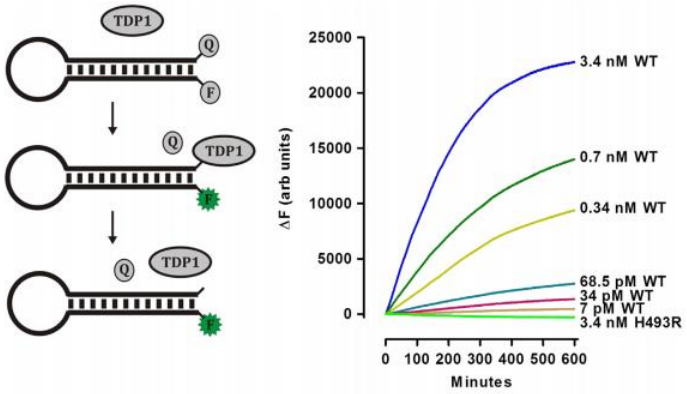
Rys. II.50. Struktura ogólna przykładowych wygaszaczy FRET: dabcylu oraz BHQ.

Dobór odpowiedniego wygaszacza do fluorofora wymaga efektywnego zajścia transferu energii, wobec czego widma emisji donora i absorpcji akceptora powinny pokrywać się w pewnym zakresie długości fal promieniowania. Na Rys. II.51 zaprezentowano, dla których fluoroforów odpowiednie są wgaszacze BHQ-1, -2 i -3, na podstawie ich maksimów absorpcji. Można wywnioskować, że BHQ-1 będzie najefektywniej wygaszać emisję fluoresceiny, BHQ-2 cyjaniny 3 i rodaminy X, natomiast BHQ-3 – cyjaniny 5.



Rys. II.51. Widma absorpcji trzech wygaszaczy BHQ-1–3, wraz z maksimami emisji powszechnie używanych fluoroforów. Widma zaczerpnięto ze strony producenta Sigma Aldrich.

Znakowanie molekuł parą fluorofor-wygaszacz ma zastosowania analogiczne do fluoryzujących par FRET, tzn. do badań nad zmianami strukturalnymi oraz projektowania enzymatycznych metod fluorescencyjnych. Zaletą wykorzystywania niefluoryzującego wygaszacza w roli akceptora transferu energii jest mniejsze tło fluorescencyjne, co umożliwia uzyskanie bardziej czułych układów. Przykładem aplikacji pary fluorofor–wygaszacz jest biosensor DNA przeznaczony do monitorowania aktywności fosfodiesterazy tyrozylo-DNA 1 TDP1 (ang. *Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1*), będącej potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu nowotworów.[240] Białko TDP1 stanowi część układu naprawy pęknięć pojedynczej nici DNA. Biosensor składa się z łańcucha DNA z BHQ-1 na końcu 3’ oraz 6-FAM na końcu 5’, który na skutek wewnątrzkomórkowego parowania zasad przyjmuje postać struktury spinki do włosów (ang. *hairpin*). W tej formie fluorescencja jest wygaszona ze względu na bliskie położenie BHQ-1 i 6-FAM. W obecności TDP1 wygaszacz BHQ-1 zostaje usunięty z DNA na skutek kowalencyjnego przyłączenia TDP1 do biosensora prowadząc do odblokowania fluorescencji 6-FAM (Rys. II.52). W wyniku drugiego ataku nukleofilowego TDP1 jest uwalniane i może przyłączyć się do kolejnej molekuły biosensora. W ten sposób możliwa jest ilościowa analiza zwiększonej, bądź zmniejszonej aktywności białka TDP1.



Rys. II.52. Schemat działania biosensora TDP1 oraz wykres zależności mierzonej fluorescencji od czasu w obecności różnych stężeń biosensora. Rysunek zaczerpnięto z pracy Jensen et al. 2013.[240]

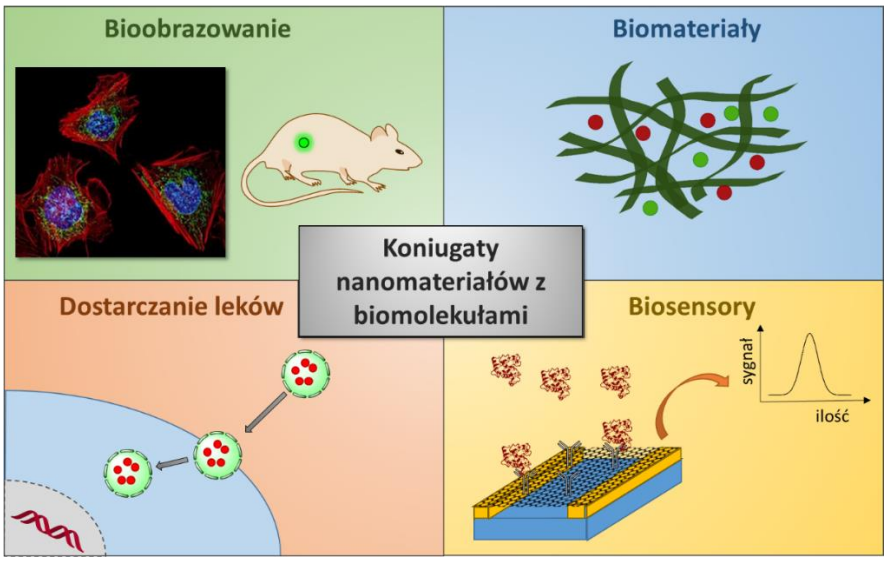
II.6.4. Koniugaty molekuł biologicznych z nanomateriałami

W ostatnich latach rozwój nanotechnologii doprowadził do opracowania nowych nanomateriałów o unikatowych właściwościach fizycznych i chemicznych. Nanomateriałami można nazwać materiały o wymiarach poniżej 100 nm, w tym metaliczne nanocząstki (np. Ag i Au) oraz struktury węglowe. Jednym z najszerzej zbadanych nanomateriałów jest złoto koloidalne.[241] W zależności od zastosowanej metody syntetycznej możliwe jest manipulowanie rozmiarem i morfologią nanocząstek. Rozbudowana powierzchnia nanocząstek pozwala na wprowadzanie dużej ilości molekuł, co czyni je atrakcyjnym celem modyfikacji. Możliwości funkcjonalizacji nanomateriałów są szerokie – od małocząsteczkowych ligandów, do makromolekuł, takich jak kwasy nukleinowe, przeciwciała, receptory i enzymy.[242]

Sondy molekularne, w tym koniugaty biomolekuła–nanomateriał są szeroko stosowane do obrazowania biomarkerów oraz procesów molekularnych, zachodzących w żywych organizmach (Rys. II.53). Przykładem są węglowe kropki kwantowe CDs (ang. *Carbon quantum Dots*) o właściwościach fluorescencyjnych, pozwalających na ich detekcję wewnątrz organizmu. Koniugat CD z utlenioną oksaplatyną (czynnik przeciwnowotworowy) wykorzystano do zobrazowania rozkładu leku *in vivo*.[243] Kropki kwantowe (nie tylko węglowe) znalazły także zastosowanie w wielokolorowym obrazowaniu limfatycznym, uzyskanym dzięki emisji różnych długości fali, w zależności od rodzaju nanocząstki, przy wzbudzaniu tylko jedną długością fali.[244] Nanomateriały mogą stanowić podstawę konstrukcji biomateriałów, których rola w projektowaniu urządzeń medycznych oraz inżynierii tkankowej rośnie (Rys. II.53). Nanowłókna polimerowe (np. PEG, alkohol poliwinylowy) dzięki właściwościom biomimetycznym, biokompatybilności oraz łatwości przetwarzania, posiadają wiele zastosowań biomedycznych. Brak funkcjonalnych biologicznie domen sprawia, że nie niosą one ryzyka uruchomienia wrodzonego układu odpornościowego.[245] Modyfikacje nanomateriału można wykorzystać także w roli czynnika dostarczającego pożądaną molekułę (lek) do komórki, dzięki możliwości przekroczenia bariery błony komórkowej (Rys. II.53). Kwasy nukleinowe DNA i RNA stosowane w terapiach genowych, ze względu na ujemny ładunek grup fosforanowych nie są w stanie samodzielnie przeniknąć przez błonę komórkową. Problem ten rozwiązano, m. in. tworząc koniugat z nanorurką monowarstwową SWNT (ang. *Single Wall Nanotube*). W pracy Wu et al. 2008 zaprezentowano możliwość dostarczenia mRNA do komórki w formie kompleksu z DNA/SWNT.[246]

Powierzchnia nanomateriału może być modyfikowana na dwa sposóby, poprzez adsorpcję fizyczną lub reakcję chemiczną z utworzeniem wiązania kowalencyjnego. Adsorpcja

fizyczna powala na szybką i prostą modyfikację powierzchni. Przykładowo, nanocząstki złota w trakcie syntezy mogą zostać pokryte cytrynianem, który nadaje im ładunek ujemny[247]. W środowisku obojętnym (pH 7) także powierzchnia utlenionego grafenu jest naładowana ujemnie, głównie dzięki obecności zdeprotonowanych grup karboksylowych. Dzięki temu dodanio naładowane molekuły, np. białka mogą sfunkcjonalizować materiał oddziałując z nim elektrostatycznie. W przypadku węglowych nanomateriałów często obecne są także oddziaływania warstwowe, będące niekowalencyjnym oddziaływaniem układów aromatycznych dzięki obecności wiązań π. Dzięki silnej chemisorpcji reszty tiolowej –SH z Au powierzchnię nanocząstki można w łatwy sposób zmodyfikować wykorzystując łańcuch boczny cystein białka.[248] Szeroko stosowanymi metodami funkcjonalizacji nanomateriałów są reakcje bioortogonalne. W tym celu przyłączana molekuła oraz nanomateriał muszą posiadać odpowiednie ugrupowania chemiczne – azydek i alkin (CuAAC), azydek i cyklooktyn (SPAAC) bądź dien (np. tetrazyna) i dienofil (DA_{inv}).

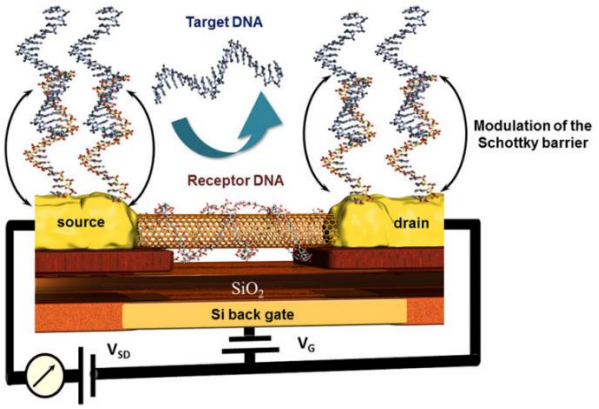


Rys. II.53. Zastosowania biologiczne koniugatów nanomateriałów z makromolekułami.

Sprzęganie nanomateriałów z molekułami biologicznymi reprezentuje jeden z kierunków rozwoju nanotechnologii w celu opracowania nowych narzędzi diagnostycznych. Wprowadzenie nanomateriałów do konstrukcji biosensorów enzymatycznych znacząco zwiększyło czułość oraz poprawiło ich ogólne działanie. Najbardziej obiecującym nanomateriałami węglowymi w rozwoju biosensorów są pochodne grafenu oraz nanorurki CNTs (ang. *carbon nanotubes*), ze względu na ich właściwości przewodzące. W sensorach biologicznych pełnią one rolę transduktora elektrycznego, bądź elektrochemicznego. W literaturze znane są przykłady koniugatów utlenionego grafenu z aptamerami,[249] chromoforami,[250] białkami[251] i kwasami nukleinowymi.[252]

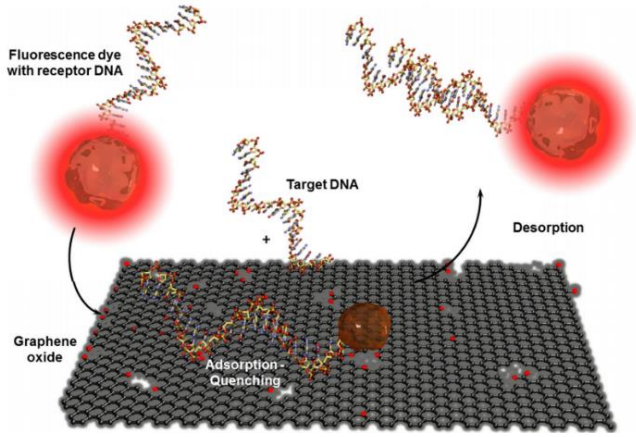
Wysokie powinowactwo CNT i nici oligonukleotydowych sprawia, że mogą być wykorzystane do konstrukcji sensora DNA. Zasady azotowe oligonukleotydu oddziałują warstwowo (π–π staking) z CNT poprzez owinięcie nici wokół nanorurki, uniemożliwiając oddziaływanie z nicią komplementarną.[253] Tang i współpracownicy[254] wykorzystali tę właściwość do konstrukcji biosensora w oparciu o zmiany przewodnictwa elektrycznego pomiędzy CNT oraz kontaktami ze złota (Rys. II.54). Część receptorowa została przyłączona do złotych elektrod wiązaniami tioestrowymi z ssDNA, modyfikowanego merkaptoheksanolem. Kontakty złote połączono ze sobą nanorurką, z owiniętą nicią receptorowego ssDNA.

Mechanizm detekcji przypisywany jest modulacji bariery Schottky'ego w kontakcie metal–nanorurka na skutek hybrydyzacji nici DNA na elektrodzie Au.



Rys. II.54. Schemat działania biosensora wykrywającego DNA, wykorzystującego tranzystor polowy CNT.[254] Rysunek zaczerpnięto z pracy Holzinger, et al. 2014.[255]

Tlenek grafenu GO posiada unikatową zdolność do wygaszania emisji fluorescencji molekuł adsorbujących na jego powierzchni. Dzięki obecności jonizowalnych grup funkcyjnych powierzchnia GO jest hydrofilowa, przez co jest on rozpuszczalny w środowisku wodnym, w przeciwieństwie do hydrofobowego grafenu. Oligonukleotydy oraz pojedyncze nici RNA lub DNA mogą odwracalnie adsorbować się na powierzchni GO i uwalniać na skutek selektywnego oddziaływania z molekułą w badanej próbce. Detekcja kwasów nukleinowych sprzężona z pomiarami fluorescencyjnymi wymaga obecności oddziałujących ze sobą dwóch znaczników fluorescencyjnych, bądź pary fluorofor–wygaszacz, dla których intensywność fluorescencji zależy od odległości pomiędzy komponentami układu. Stosując GO układ pomiarowy można ograniczyć tylko do jednego fluorofora. Przykładem tego typu sensora jest kolorymetryczny sensor DNA, wykorzystujący proces adsorpcji receptorów ssDNA zmodyfikowanych różnymi znacznikami fluorescencyjnymi na powierzchni GO, zaprezentowany w pracy He, et al. 2010.[256] Autorzy pracy wykorzystali znakowanie trzema różnymi fluoroforami – fluoresceiną, rodaminą oraz cyjaniną 5, różniących się położeniem maksimum emisji fluorescencji. W ten sposób możliwe było wykrywanie obecności trzech różnych ssDNA o określonej sekwencji w mieszaninie. Fluorescencja znakowanych ssDNA po adsorpcji na powierzchni GO ulegała wygaszeniu. W obecności komplementarnego ssDNA w badanym roztworze obydwie nici hybrydyzowały, prowadząc do odblokowania emisji fluorescencji (Rys. II.55).



Rys. II.55. Schemat działania biosensora wykrywającego DNA, wykorzystującego zdolność utlenionego grafenu do wygaszania fluorescencji.[256] Rysunek zaczerpnięto z pracy Holzinger, et al. 2014.[255]

Nanomateriały funkcjonalizowane molekułami o znaczeniu biologicznym pełnią rolę platformy, która może zostać wykorzystana w badaniach biofizycznych oddziaływań typu białko–ligand. Sensory pozwalające na oznaczanie stężeń białek zaangażowanych w procesy chorobotwórcze (np. markery nowotworowe) mogą być użytecznym narzędziem diagnostycznym. Właśnie ten aspekt wykorzystania unikalnych właściwości nanomateriałów jest jednym z celów badawczych niniejszej pracy doktorskiej.

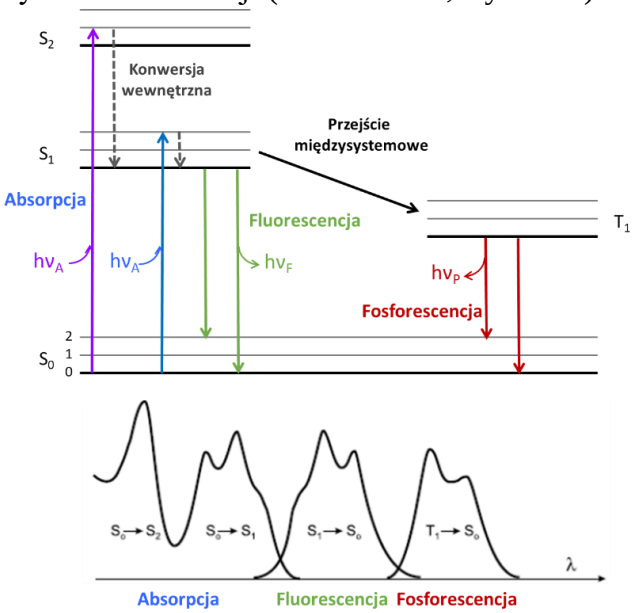
III. Metodyka badań

III.1. Metody spektroskopowe w charakterystyce fluorescencyjnych nukleotydów

Metody badania oddziaływań białko–ligand, zaprojektowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej w szczególności oparte są o fluorescencyjne techniki detekcji. Z tego względu w poniższym rozdziale zostaną omówione najczęściej stosowane fluorescencyjne metody pomiarowe.

III.1.1. Intensywność fluorescencji (FLINT)

Pomiar intensywności fluorescencji FLINT (ang. *Fluorescence Intensity*) jest najbardziej podstawowym sposobem analizy układu fluoryzującego. Fluorescencja jest zjawiskiem związanym z przejściem promienistym z elektronowego stanu wzbudzonego do podstawowego (Rys. III.1). W przypadku fluorescencji stan wzbudzony jest singletowy, co oznacza, że spiny elektronów w stanie podstawowym i wzbudzonym są sparowane. Konsekwencją jest szybkie przejście elektronu do stanu podstawowego z jednoczesną emisją fotonu. Typowe czasy życia stanu wzbudzonego wynoszą 10 ns. Innym rodzajem luminescencji (obok fluorescencji) jest fosforescencja, będąca emisją światła z wzbudzonego stanu trypletowego, w którym to wzbudzony elektron ma tą samą orientację spinu, co elektron stanu podstawowego. Przejścia tego typu są wzbronione stąd też długie czasy życia fosforescencji (od 1 do 10^3 s; Rys. III.1).



Rys. III.1. Przykładowy Diagram Jabłońskiego.

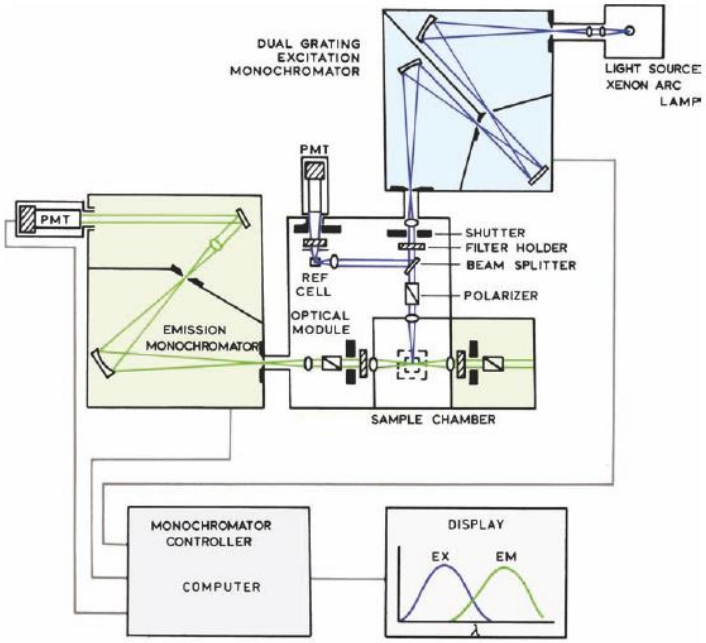
Najprostszym układem pomiarowym fluorescencji jest spektrofluorymetr. Pozwala on na rejestrację widm zarówno emisji, jak i wzbudzania fluorescencji. Widmo emisji reprezentuje intensywność fluorescencji o danej długości fali, przy wzbudzaniu falą o stałej, pojedynczej długości. Z kolei widmo wzbudzenia przedstawia zależność intensywności fluorescencji w danej długości fali dla różnych długości fal wzbudzenia. Bardzo często kształt widma wzbudzenia fluorescencji substancji pokrywa się z jej widmem absorpcyjnym. Schemat budowy typowego spektrofluorymetru przedstawiono na Rys. III.2. Powszechnie stosowanym źródłem promieniowania wzbudzającego jest ksenonowa lampa łukowa. Ponadto spektrofluorymetr jest wyposażony w zautomatyzowane monochromatory, których funkcją jest selekcja fali wzbudzającej oraz rejestrowanej emitowanej o konkretnej energii. Zwykle rolę monochromatora pełni siatka dyfrakcyjna. Na ścieżce wzbudzania znajdują się także dodatkowe filtry oraz dzielnik wiązki (ang. *beam splitter*), będący cienkim fragmentem czystego kwarcu, którego funkcją jest rozszczepienie wiązki światła na dwie części. W ten sposób część promieniowania

wzbudzającego przekierowana jest na próbkę referencyjną, zawierającą stabilny fluorofor. W centrum układu znajduje się kuweta z badaną próbką. Kuwety do pomiarów fluorescencyjnych zwykle wykonane są z transparentnego kwarcu. Kwarc przepuszcza światło UV i może być stosowany w zakresie długości fali promieniowania od 190 do 2500 nm (zgodnie z artykułem *How to Select Cuvettes for UV VIS Measurements & Cuvette Material Guide*, udostępnionym przez producenta kuwet FireflySci Cuvette Shop).

Fluorescencja, w przeciwieństwie do pomiaru absorpcji, zazwyczaj mierzona jest pod kątem prostym w stosunku do kierunku promieniowania wzbudzającego, dzięki czemu rejestrowane jest jedynie światło emitowane. Pomiar po kątem 180° wymaga dodatkowego usuwania promieniowania wzbudzającego, które przeszło przez próbkę. Zastosowanie pomiarów pod kątem 90° poprawia stosunek sygnału do szumu oraz zwiększa czułość nawet o 10000 razy.[257] Ilość promieniowania padającego na próbkę oraz wychodzącego z próbki (rejestrowanego) organiczone są szerokością szczelin (kilka–kilkanaście nm) umieszczonych na drodze optycznej. Emitowane w procesie fluorescencji promieniowanie ostatecznie trafia do detektora (fotopowielacz) oraz jest charakteryzowane ilościowo z użyciem odpowiednich urządzeń elektrycznych. Idealny układ pomiaru fluorescencji powinien charakteryzować się:

i) Źródłem światła generującym fotony przy wszystkich długościach fali;
ii) Monochromatorem przepuszczającym fotony o wszystkich długościach fali;
iii) Detektorem wykrywającym fotony o wszystkich długościach fali z jednakową wydajnością.

Źródła światła, monochromatory oraz detektory o idealnej charakterystyce nie są dostępne, w związku, z czym projektując układ pomiarowy należy stosować odpowiednie korekty odpowiedzi urządzenia.

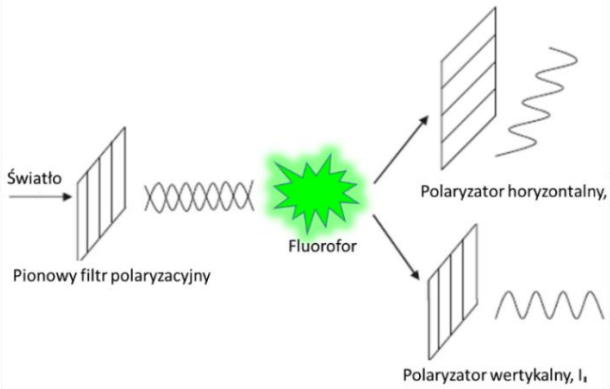


Rys. III.2. Schematyczne przedstawienie budowy spektrofluorymetru. Rysunek zaczerpnięto z książki *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz.[184]

Warto także pamiętać, że na mierzoną intensywność fluorescencji mogą wpływać dodatkowe parametry, takie jak gęstość optyczna próbki (tzw. efekt filtra wewnętrznego objawiający się zaburzeniem liniowej zależności intensywności fluorescencji od stężenia substancji) oraz mętność roztworu (pojawiają się dodatkowe wpływy od rozpraszania światła).

III.1.2. Polaryzacja fluorescencji (FP)

Przykładem innego mierzalnego aspektu fluorescencji jest pomiar polaryzacji fluorescencji FP (ang. *Fluorescence Polarization*). Podstawą fizyczną FP jest obecność absorpcyjnego i emisyjnego momentu przejścia, przyjmujących określone kierunki w strukturze fluorofora. W ośrodku homogenicznym, w stanie podstawowym fluorofora są one zorientowane losowo. Natomiast w obecności spolaryzowanego światła preferencyjnie wzbudzane są fluorofory, których absorpcyjny moment przejścia jest zorientowany wzdłuż wektora elektrycznego promieniowania wzbudzającego. Sprawia to, że populacja stanu wzbudzonego jest częściowo zorientowana. Schematyczne przedstawienie pomiaru polaryzacji fluorescencji przedstawiono na Rys. III.3. Zazwyczaj próbka wzbudzana jest światłem spolaryzowanym pionowo (wektor elektryczny światła równoległy do osi *z*).



Rys. III.3. Podstawy pomiaru polaryzacji fluorescencji.

Promieniowanie emitowane przez próbkę przechodzi przez polaryzator, przepuszczający światło o określonej polaryzacji liniowej. Gdy polaryzator emisji jest zorientowany równolegle do kierunku wzbudzającego światła spolaryzowanego rejestrowana intensywność emisji zapisywana jest, jako $I\|$. Z kolei, gdy polaryzacja promieniowania emitowanego jest prostopadła do polaryzacji światła wzbudzającego jego intensywność oznaczana jest $I\perp$. Na podstawie obydwu rejestrowanych sygnałów obliczana jest wielkość zwana polaryzacją P, którą opisuje wzór:

$$P = \frac{I_{\|} - I_{\perp}}{I_{\|} + I_{\perp}}$$

Polaryzacja stosowana jest w starszej literaturze, natomiast obecnie częściej wykorzystuje się wielkość zwaną anizotropią r. Anizotropię fluorescencji można obliczyć z wartości polaryzacji, korzystając z następującego wzoru:

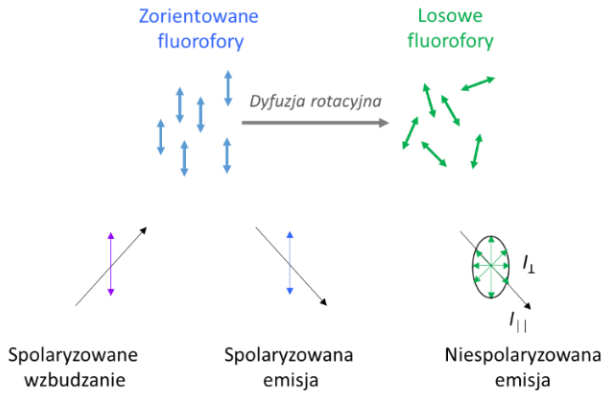
$$r = \frac{I_{\|} - I_{\perp}}{I_{\|} + 2I_{\perp}} = \frac{2P}{3 - P}$$

Zarówno polaryzacja, jak i anizotropia są wielkościami bezwymiarowymi, niosącymi tę samą informację o układzie, zwykle niezależnymi od stężenia substancji. Jednak zaletą stosowania anizotropii jest jej niezależność od całkowitej intensywności $I\| + 2I\perp$, do której jest ona znormalizowana.

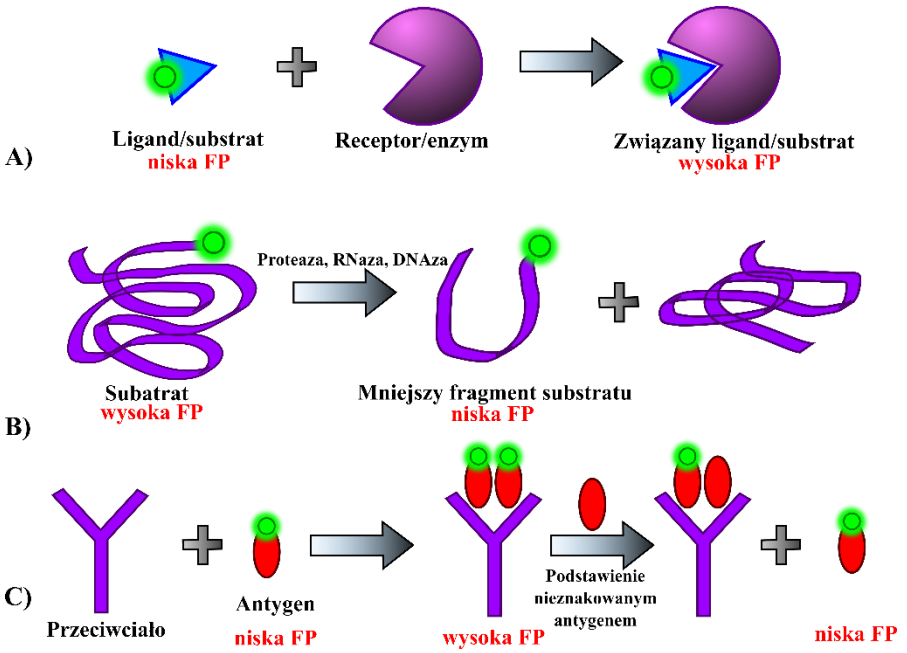
Depolaryzację fluorescencji może powodować wiele czynników, w tym dyfuzja rotacyjna fluoryzującej molekuły (Rys. III.4). Powoduje ona zmiany kierunku momentów przejścia i jest jednym z głównych przyczyn depolaryzacji. Szybkość dyfuzji rotacyjnej zależy m.in. od lepkości otoczenia oraz obecności zawad sterycznych. Z tego względu emisja małych fluoroforów

swobodnie rotujących w rozpuszczalniku o niskiej lepkości jest niespolaryzowana, a wartość anizotropii zbliżona do 0 ($I\| \approx I\perp$).

Pomiary polaryzacji fluorescencji lub anizotropii fluorescencji FA (ang. *Fluorescence Anisotropy*) są szeroko stosowane w wielu typach metod fluorescencyjnych.[258] Podstawowym zastosowaniem jest monitorowanie tworzenia kompleksu białko–ligand w celu wyznaczenia parametrów fizycznych tego oddziaływania (Rys. III.5A). Fluorescencyjnie znakowany ligand (sonda) posiada dużą swobodę rotacyjną, co przekłada się na niską anizotropię. Po związaniu z białkiem rotacja liganda jest ograniczona prowadząc do wzrostu anizotropii. Zależność mierzonej anizotropii od stężenia białka w tym przypadku pozwala na wyznaczenie stałej dysocjacji kompleksu. Kompetycja sondy fluorescencyjnej w obecności niefluoryzującego liganda prowadzi do jej wyparcia z miejsca wiążącego białka oraz ponownego spadku anizotropii fluorescencji. Kolejnym przykładowym eksperymentem wykorzystującym pomiary *r* jest degradacja znakowanej fluorescencyjnie makromolekuły (wysoka anizotropia) na mniejsze fragmenty (niska anizotropia; Rys. III.5B). Zmiany polaryzacji fluorescencji w trakcie związania z makromolekułą stanowią także podstawę metod immunologicznych FPIA (ang *Fluorescence Polarization Immunoassay*; Rys. III.5C).



Rys. III.4. Schemat przedstawiający wpływ dyfuzji rotacyjnej na polaryzację/anizotropię promieniowania emitowanego.



Rys. III.5. Schemat ilustrujący wybrane zastosowania pomiarów FP: **A)** wiązanie receptor-ligand; **B)** hydroliza enzymatyczna; **C)** test immunologiczny polaryzacji fluorescencji FPIA.

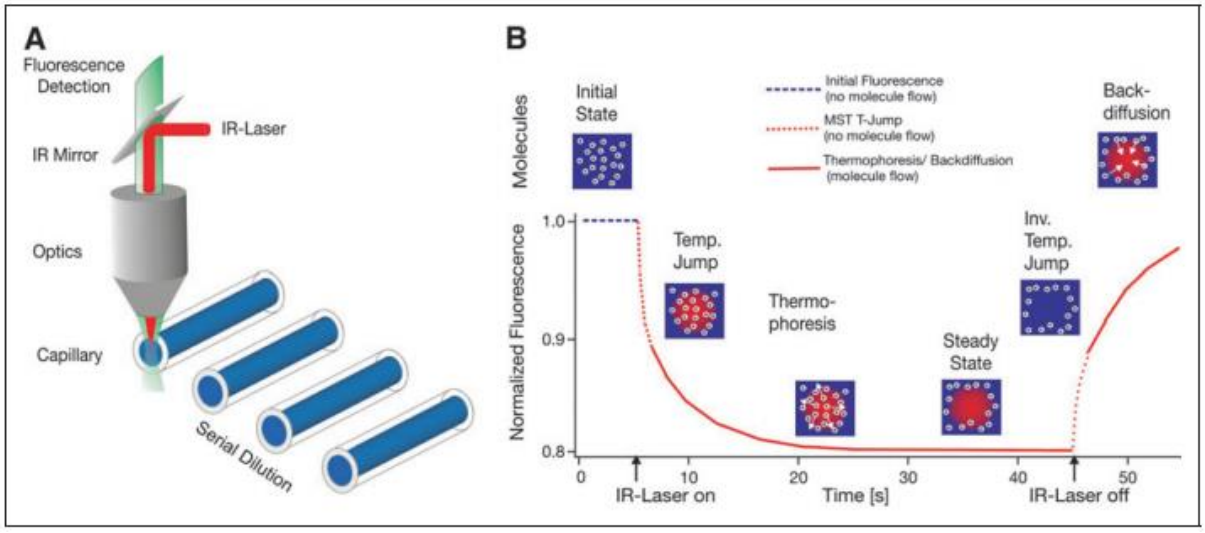
Pomiary anizotropii fluorescencji mają pewne zalety nad konwencjonalnym pomiarem intensywności fluorescencji. Sygnał tła zwykle jest niższy, co poprawia czułość metody. Ponadto nie wymagają one także zmiany intensywności fluorescencji w trakcie badanego procesu. Gdy

intensywność fluorescencji zmienia się w trakcie pomiaru, rejestrowaną anizotropię należy odpowiednio skorygować. W przeciwnym wypadku może to prowadzić do błędnych wyników.[259] Z drugiej strony pomiary anizotropii wymagają bardziej skomplikowanego układu pomiarowego w stosunku do standardowych pomiarów FLINT – konieczne jest stosowanie polaryzatorów promieniowania wzbudzającego oraz emitowanego.

III.1.3. Termoforeza mikroskalowa (MST)

Kolejną techniką pomiarowa, bazującą na zmianach fluorescencji jest termoforeza mikroskalowa MST (ang. *Microscale Thermophoresis*). Zjawisko termoforezy polega na ukierunkowanym ruchu molekuł w gradiencie temperatury i po raz pierwszy zostało opisane w 1856 roku przez Ludwiga.[260] Metodologia MST rozwinęła się w ciągu kilku ostatnich lat i umożliwia monitorowanie ruchu fluoryzujących molekuł w mikroskopowym gradiencie temperatury oraz w bardzo małych objętościach rzędu µl, co pozwala na precyzyjną analizę procesów wiązania, degradacji, zwijania białek oraz ich kinetyki i termodynamiki. Podejście to pozwala na detekcję zmian w rozmiarze, ładunku, a także otoczce hydratacyjnej molekuły.

Sygnał MST jest mierzony z próbki umieszczonej w kapilarze o objętości 4 µl. Fluorescencja jest wzbudzana i mierzona poprzez ten sam element optyczny. Układ pomiarowy MST składa się z lasera IR sprzężonego ze ścieżką optyczną promieniowania wzbudzającego i emitowanego za pomocą lustra dichroicznego (Rys. III.6A). Taka konfiguracja pozwala na precyzyjną obserwację termoforezy. Laser IR stanowi źródło ogrzewania próbki z dokładnością do mK i skupia się jedynie w jej niewiekim, mikrometrowym obszarze. Możliwość dystrybucji temperatury w skali mikroskopowej jest podstawą metody MST.

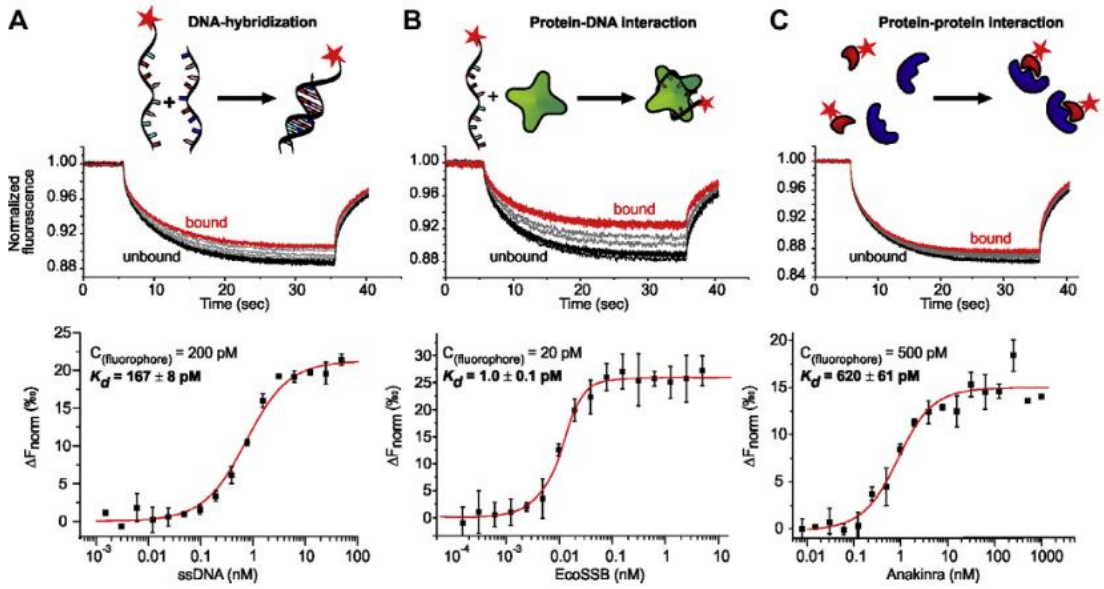


Rys. III.6. A) Schemat prezentujący sposób detekcji fluorescencji w kapilarach; **B)** Przebieg zmian fluorescencji w trakcie eksperymentu MST. Rysunek zaczerpnięto z pracy Jerabek-Willemsen et al. 2011.[261]

Sygnałem rejestrowanym w eksperymencie MST jest intensywność fluorescencji próbki. W jego skład wchodzi kilka następujących po sobie procesów, zależnych od źródła ciepła, i możliwych do niezależnej analizy (Rys. III.6B). W stanie początkowym rejestrowana jest intensywność fluorescencji nieogrzewanej próbki. Po kilku sekundach laser IR jest włączany, a sygnał fluorescencji ulega zmianie. W początkowej fazie intensywność fluorescencji maleje na skutek ogrzewania próbki, bez efektu termoforetycznego. Ten fragment krzywej termoforetycznej nazywany jest T-jump (ang. *Temperature jump*). Następnie molekuły

zaczynają migrować w gradiencie temperatur. Gdy molekuły migrują do źródła ciepła intensywność fluorescencji rośnie (termoforeza negatywna), natomiast w stronę przeciwną – fluorescencja maleje (termoforeza pozytywna).[262] Po wyłączeniu lasera (kilkadziesiąt s) intensywność fluorescencji zaczyna rosnąć tworząc odwrotny T-jump, wynikający z ochłodzenia próbki. W ostatniej fazie molekuły przemieszczają się na skutek dyfuzji („*Back-diffusion*"), a układ wraca do stanu początkowego. Każda z opisanych faz analizy termoforetycznej zawiera informacje o powinowactwie elementów układu oraz mechanizmie wiązania. Zmiany w termoforezie fluorescencyjnie znakowanych związków odzwierciedlają zmiany wpływające na mobilność termoforetyczną oraz współczynnik dyfuzji. Oznacza to, że takie parametry, jak rozmiar, ładunek oraz zmiana otoczki solwatacyjnej molekuły mają wpływ na jej migrację pod wpływem temperatury.

Dużą zaletą metody MST jest bardzo małe zużycie materiału potrzebnego do wykonania analizy. Niektóre urządzenia, np. Monolith® NT.115^{Pico} firmy NanoTemper pozwala na pomiary pM stężeń florofora w objętości µl, dzięki czemu możliwe jest wyznaczanie pikomolarnych stałych dysocjacji. Na Rys. III.7. zaprezentowano przykładowe eksperymenty, w których badano układy o bardzo wysokim powinowactwie.[263] W pierwszym z nich analizowano proces hybrydyzacji nici DNA, w którym szablonowy oligonukleotyd był znakowany cyjaniną 5 na jednym z końców. Zależność relatywnej zmiany termoforezy na skutek hybrydyzacji nici DNA pozwala na obliczenie K_D = 167 ± 8 pM (Rys. III.7A).



Rys. III.7. Wyznaczanie pikomolarnych K_D z wykorzystaniem systemu Monolith® NT.115^{Pico}. **A)** Oddziaływanie DNA–DNA; **B)** Oddziaływanie białko–ligand; **C)** Oddziaływanie białko–białko. Rysunek zaczerpnięto z pracy Jerabek-Willemsen et al. 2014.[263]

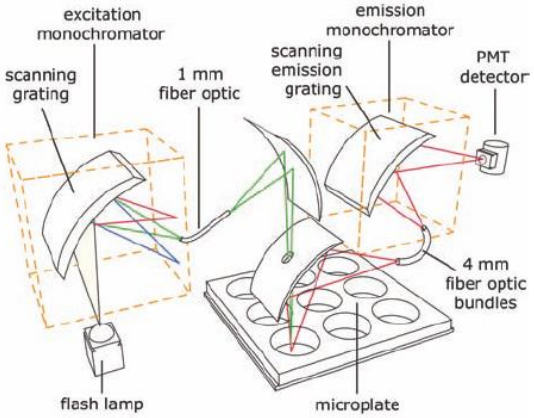
W kolejnym przykładzie przeprowadzono analizę wiązania nici DNA z białkiem EcoSSB wiążącym pojedyncze nici z bakterii *E. coli*. W eksperymencie wykorzystano 70-nukleotydową nić ssDNA, zbudowaną z nukleotydów deoksytymidynowych, znakowaną na jednym z końców cyjaniną 5. Powinowactwo białka EcoSSBB do nici powyżej 70 nukleotydów jest niezwykle wysokie z K_D rzędu pM, a nawet fM.[264] Metoda MST pozwala na wyznaczanie nawet tak niskich K_D, które w opisanym eksperymencie wynosiło 1,0 ± 0,1 pM (Rys. III.7B). Ostatnim przykładem wykorzystania MST jest badanie wiązania białko–białko, pomiędzy białkiem Anakinra, będącego antagonistą receptora interleukin-1 (IL-1) oraz samym receptorem IL-1. W eksperymencie fragment receptora IL-1 wyznakowano barwnikiem NT-647 oraz rejestrowano

efekt termoforetyczny w różnych stężeniach białka Anakinra, co pozwoliło na obliczenie stałej dysocjacji K_D = 620 ± 61 pM (Rys. III.7C).

III.1.4. Metody HTS

Metody fluorescencyjne są jednymi z najczęściej stosowanych w badaniach biofizycznych oddziaływań elementów układu biologicznego. Z tego względu są niezwykle użyteczne w projektowaniu leków nakierowanych na cele terapeutyczne. Obecnie w przemyśle farmaceutycznym oraz biotechnologicznym szczególną popularność zyskało podejście wysokoprzepustowych badań przesiewowych HTS (ang. *High-Throughput Screening*). Podejście to skupia się na charakterystyce bardzo dużych ilości związków w krótkim czasie. Zwykle eksperymenty HTS są wykonywane z zastosowaniem czytnika płytek. W czytniku stosowane są wielodołkowe płytki, przy czym każdy z dołków zastępuje jedną kuwetę z próbką pomiarową. Materiał wykonania płytki oraz ilość dołków różni się w zależności od rodzaju eksperymentu. Do pomiarów fluorescencyjnych wykorzystywane są czarne płytki, natomiast do pomiarów absorpcji przezroczyste, których dno przepuszcza promieniowanie. Liczba dołków może wynosić 6, 12, 24, 48, 96, 384 lub 1536 ułożonych w kształt prostokąta w stosunku 2:3, tzn. płytka 96-dołkowa składa się z ośmiu wierszy i dwunastu kolumn.

Ze względu na inny kształt naczynia zawierającego próbkę optyka czytnika płytek różni się od standardowych spektrofluorymetrów. Płytka jest ustawiona pionowo, aby utrzymać ciecz w dołku, co wyklucza stosowanie detekcji emisji pod kątem prostym. Na Rys. III.8 przedstawiono ścieżkę optyczną promieniowania wykorzystywaną w czytniku płytek. Źródłem promieniowania jest ksenonowa lampa błyskowa, a pożądana długość fali wzbudzającej selekcjonowana przez monochromator. Promieniowanie przechodzi przez układ luster i ostatecznie trafia na powierzchnię próbki przez charakterystyczny otwór zwierciadła. To samo zwierciadło zbiera promieniowanie emitowane, które po przejściu przez monochromator jest rejestrowane przez detektor. Z kolei do pomiaru absorpcji stosowane jest drugie lustro, umieszczone pod płytką. W trakcie pomiaru płytka przesuwana jest w płaszczyźnie *x*–*y*, w taki sposób, aby zarejestrować sygnał z wybranych dołków.



Rys. III.8. Schematyczne przedstawienie układu optycznego stosowanego w czytniku płytek. Rysunek zaczerpnięto z książki *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz.[184]

Aby metodę można było stosować w pomiarach HTS musi ona spełniać określone warunki dokładności pomiaru. Jakość pomiaru musi być wystarczająca, aby było możliwe odróżnienie spośród badanych związków tych dających wynik pozytywny (hits) od tych dających wynik negatywny (non-hits). Parametrem wyznaczanym w celu walidacji metody jest tzw.

paramter *z* lub *z'*,[265] będący odzwierciedleniem szerokości okna pomiarowego oraz zmienności rejestrowanych sygnałów. Parametr *z* opisany jest wzorem:

$$z = 1 - \frac{3(\sigma_{pos} + \sigma_{neg})}{|\mu_{pos} - \mu_{neg}|}$$

gdzie μ i σ to odpowiednio wartości średnie i odchylenia standardowe kontroli pozytywnej (maksymalny rejestrowany sygnał) oraz negatywnej (minimalny rejestrowany sygnał). Parametr *z* jest bezwymiarowy i zawiera się w zakresie od 0 do 1. Gdy $z = 0$ sygnał próbki i tła nakładają się ze sobą, natomiast $z = 1$ odpowiada idealnej metodzie. Zwykle przyjmuje się, że metoda spełnia kryterium wysokoprzepustowości, gdy $z > 0{,}5$.

III.2. Metody spektroskopowe w charakterystyce koniugatów nukleotydów z nanomateriałami

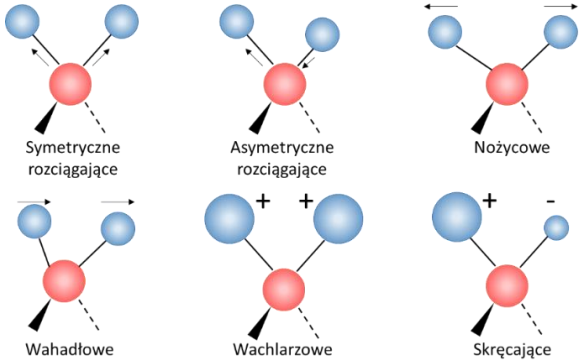
Część projektu doktorskiego obejmowała zaprojektowanie sondy molekularnej, w której mierzalnym sygnałem analitycznym są zmiany parametrów przepływu prądu elektrycznego w sfunkcjonalizowanym grafenie lub strukturach półprzewodnikowych, na których odłożono modyfikowane płatki grafenu, na skutek specyficznego oddziaływania analogu kapu z białkiem. W tym celu zaplanowano otrzymanie:

a) koniugatu analogu kapu z grafenem epitaksjalnym, hodowanym na węgliku krzemu (SiC);
b) odłożenie sfunkcjonalizowanych płatków grafenu/GO na strukturze tranzystora polowego na bazie azotku galu (GaN).

W niniejszym rozdziale skupiono się na metodach pomiarowych szczególnie użytecznych w charakterystyce pochodnych grafenu.

III.2.1. Spektroskopia FTIR

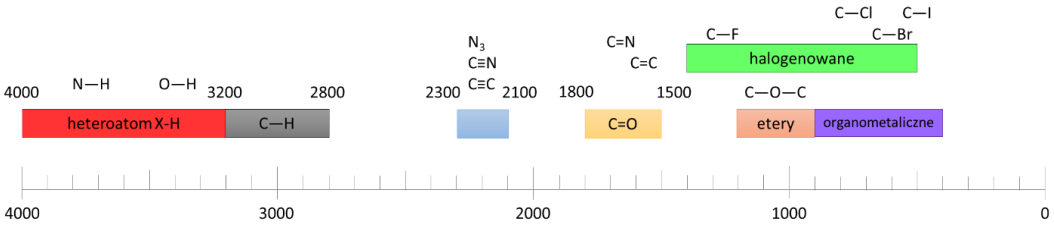
Spektroskopia IR jest rodzajem spektroskopii optycznej odnoszącej się do absorpcji promieniowania podczerwonego w zakresie 100–5000 cm^{-1}, w szczególności przejść pomiędzy energetycznymi stanami oscylacyjno-rotacyjnymi.[266] Częstotliwość promieniowania podczerwonego jest zbliżona do częstotliwości drgań molekuł. Wieloatomowe molekuły drgają w sposób złożony, który można rozłożyć na niezależne od siebie (ortogonalne) drgania normalne. Pojęcie drgania normalnego obejmuje jednoczesny ruch zrębów atomowych z tą samą częstością i zgodnie w fazie. Rodzaje drgań normalnych w cząsteczce tetraedrycznej przedstawiono na Rys. III.9. Drgania normalne można wzbudzać niezależnie od siebie, a ich liczbę określa liczba stopni swobody. Liczbę stopni swobody molekuły *N*-atomowej nieliniowej opisuje wzór $3N–6$, natomiast liniowej $3N–5$. Warunkiem aktywności drgania na widmie IR jest zmiana elektrycznego momentu dipolowego.



Rys. III.9. Drgania normalne cząsteczki tetraedrycznej.

Spektroskopia IR jest użyteczna szczególnie w identyfikacji grup funkcyjnych wchodzących w skład badanej molekuły. Jest to możliwe dzięki obecności drgań charakterystycznych, będących drganiem normalnym molekuły, w którym amplituda wychyleń

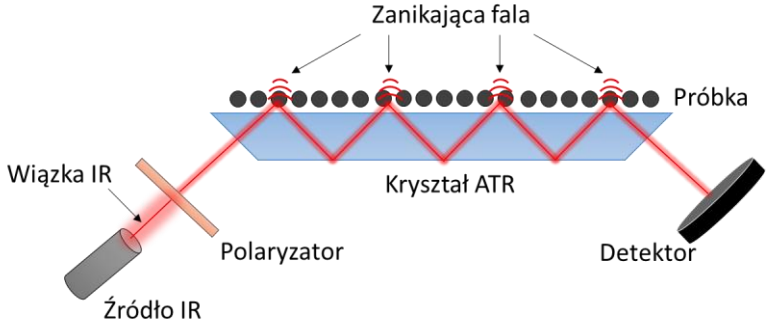
jednego z wiązań jest dominująca. Otoczenie chemiczne (np. zmiana podstawnika) tylko w niewielkim stopniu wpływa na drganie, pozwalając na wyznaczenie zakresów energii, w obrębie, których pojawiają się pasma odpowiadające drganiom danego wiązania (Rys. III.10).



Rys. III.10. Główne drgania grup funkcyjnych widoczne na widmie IR.

Pomiar widma FTIR (ang. *Fourier transform infrared*) polega na naświetleniu próbki promieniowaniem podczerwonym.[266] Jedna z wiązek światła kierowana jest na lustro nieruchome, natomiast druga na ruchome, co wprowadza zmienną w czasie różnicę dróg optycznych. Rejestrowany jest tzw. interferogram, będący zależnością interferencji od położenia zwierciadła ruchomego. Właściwe widmo FTIR uzyskuje się wykonując transformatę Fouriera interferogramu.

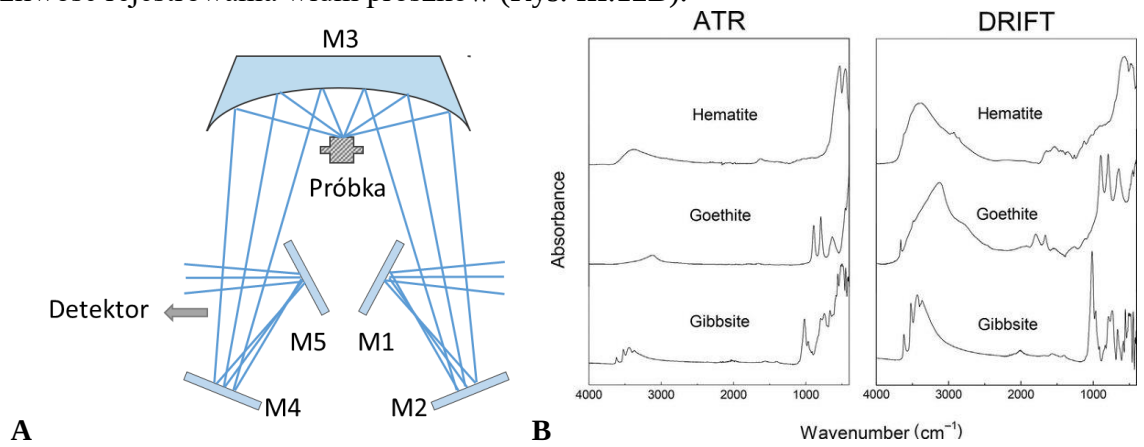
Widma FTIR są możliwe do zarejestrowania zarówno w fazie ciekłej, jak i w ciele stałym. Jedną z metod pomiarowych powszechnie stosowanych w badaniach materii skondensowanej jest spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni ATR (ang. *Attenuated Total Reflectance*). Układ pomiarowy ATR składa się z kryształu o dużym współczynniku załamania (np. german, diament, krzem) oraz szczelnie przylegającej do niego próbki o niższym współczynniku załamania. Wiązka promieniowania IR wprowadzana jest do kryształu gdzie ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu. Część wiązki penetruje próbkę na niewielkiej odległości 0,5–2 μm[267] (zjawisko podobne tunelowaniu), gdzie zostaje zaabsorbowana (Rys. III.11). Wychodząca z kryształu wiązka jest następnie rejestrowana przez detektor. W pomiarze ATR istotne jest, aby warstwa powietrza pomiędzy próbką, a kryształem była jak najcieńsza.



Rys. III.11. Schemat działania metody ATR IR (źródło własne na podstawie Ausili et. al. 2015[268]).

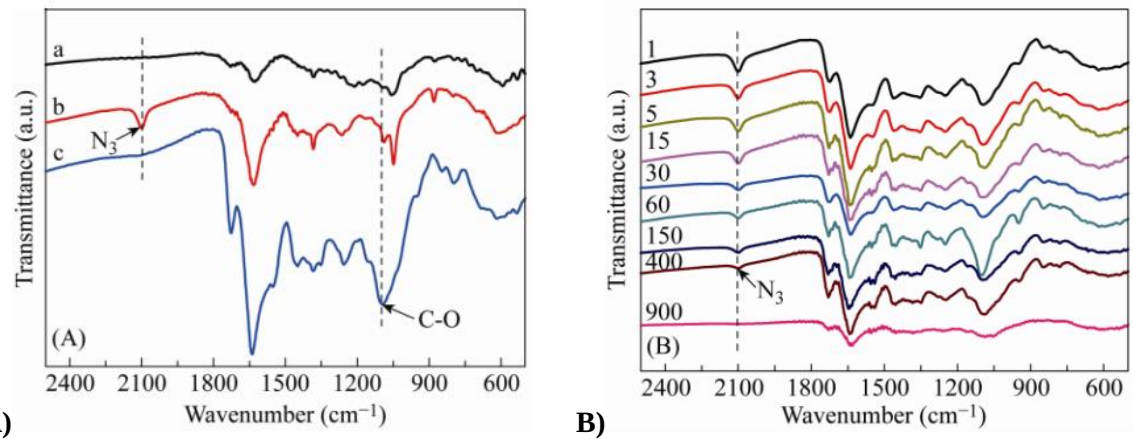
Inną techniką stosowaną w pomiarach widm FTIR ciał stałych jest spektroskopia rozproszonego odbicia DRIFTS (ang. *Diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy*).[269] Światło oświetlające próbkę w formie proszku jest częściowo lustrzanie odbijane, częściowo rozpraszane we wszystkich kierunkach oraz częściowo wnika w próbkę, ulegając absorpcji lub dyfrakcji na kolejnych ziarnach próbki i wnosząc składową do światła odbijanego od jej powierzchni. Do detektora trafia zarówno promieniowanie wnikające w materiał, gdzie ulega załamaniom absorpcji, odbiciu, po czym wraca na jego powierzchnię, jak i frakcja promieniowania, ulegająca zwierciadlanemu odbiciu. Promieniowanie jest zbierane przez paraboliczne zwierciadło (Rys. III.12A), a następnie kierowane do detektora. Zaletą stosowania

metody DRIFTS jest brak konieczności wcześniejszego przygotowania próbki do pomiaru oraz możliwość rejestrowania widm proszków (Rys. III.12B).



Rys. III.12. A) Układ optyczny stosowany w pomiarach widm IR metodą rozproszonego odbicia; **B)** Porównanie widm ATR oraz DRIFTS tlenków metali: hematytu (Fe_2O_3), goethytu (FeO(OH)) oraz gibbsytu ($Al.(OH)_3$). Widma zaczerpnięto z pracy Margenot, et al. 2017.[270]

Spektroskopia FTIR jest użytecznym narzędziem w badaniu modyfikacji chemicznych nanomateriałów, w tym pochodnych grafenu. Metoda ta pozwala na weryfikację poprawności przebiegu reakcji. Przykładem jest reakcja polegająca na wprowadzeniu grupy azydkowej poprzez aktywację grup karboksylowych na brzegach płatka utlenionego grafenu, a następnie utworzenie wiązania amidowego z 3-azydopropano-1-aminą. Produkt tej reakcji jest możliwy do identyfikacji dzięki pojawieniu się charakterystycznego pasma drgań rozciągających grupy azydkowej na widmie FTIR przy ~2090 cm^{-1} (Rys. III.13A). W wyniku reakcji CuAAC z pochodną polimeru PEG modyfikowanego grupą alkinową pasmo azydku zanika w czasie jej trwania (Rys. III.13B). Pasmo azydkowe widma FTIR pozwala zatem na selektywne monitorowanie syntezy koniugatów pochodnych grafenu z wybranymi molekułami w reakcji CuAAC, które ze względu na nieregularność kształtu płatków grafenu jest utrudnione innymi metodami.

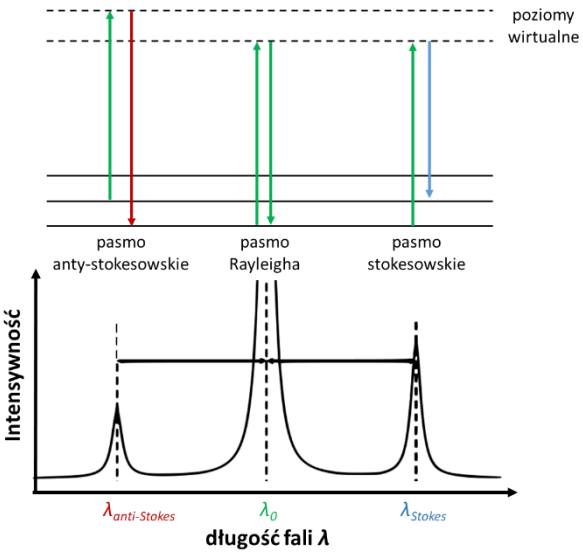


Rys. III.13. A) Widma FTIR utlenionego grafenu GO (a), GO modyfikowanego grupą azydkową przed (b) oraz po reakcji CuAAC z pochodną polimeru PEG (c); **B)** widma FTIR GO modyfikowanego grupą azydkową, zarejestrowane po różnym czasie trwania reakcji CuAAC z pochodną polimeru PEG. Widma zaczerpnięto z pracu Kou, et. al. 2013.[271]

III.2.2. Spektroskopia ramanowska

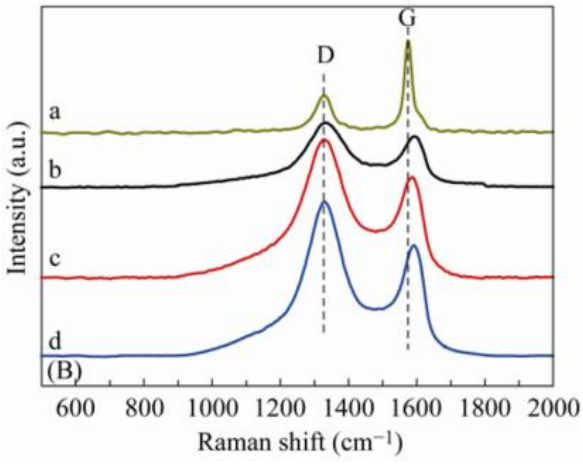
Spektroskopia ramanowska jest kolejną ważną dziedziną badającą oddziaływanie materii z promieniowaniem. W tym przypadku rejestrowane jest światło rozproszone przez próbkę. Najbardziej prawdopodobne jest elastyczne rozproszenie światła, nazywane rozproszeniem rayleighowskim (ang. *Rayleigh scattering*). Nieelastyczne rozpraszanie światła związane jest ze zmianą energii fotonu – może on częściowo oddać lub pobrać energię od układu w porcjach odpowiadających energii jego drgań normalnych lub innych wzbudzeń elementarnych. Zjawisko to nazywane jest efektem Ramana.[266] Jeśli energia jest oddawana do układu (rozproszony foton ma mniejszą energię) mamy do czynienia z pasmem stokesowskim, a jeśli jest pochłaniana (rozproszony foton ma większą energię) – antystokesowskim (Rys. III.14). Zmiana energii odpowiada energii wzbudzenia elementarnego (molekuły, drgań sieci, defektu, domieszki itp.). Pasmo antystokesowskie jest mniej intensywne niż stokesowskie gdyż w celu przekazania części energii fotonowi, układ musi znajdować się w stanie wzbudzonym, co jest tym bardziej prawdopodobne im wyższa temperatura układu.

Drgania aktywne ramanowsko muszą spełnić warunek mówiący, że pochodna polaryzowalności elektrycznej po współrzędnej normalnej drgania musi być różna od zera.[272] Czyni to ze spektroskopii ramanowskiej metodę komplementarną do spektroskopii absorpcyjnej, w której to warunkiem aktywności drgania jest niezerowanie pochodnej momentu dipolowego po współrzędnej normalnej drgania. Zjawisko to znane jest pod nazwą zakazu alternatywnego, według którego drganie układu zawierającego środek symterii może być aktywne jedynie w jednym rodzaju spektroskopii – ramanowskiej lub IR. Zaletą spektroskopii ramanowskiej jest możliwość badania próbek w środowisku wodnym – woda wykazuje silną absorpcję promieniowania podczerwonego. Ponadto w spektroskopii ramanowskiej można używać laserów emitujących światło nie tylko w podczerwieni, ale również obszarze widzialnym i UV. Widmo ramanowskie często interpretowane jest, jako odcisk palca molekuły, unikatowy dla cząsteczki lub jej fragmentu. Położenia pasm na widmie związanych z drganiem konkretnego wiązania, na które otoczenie chemiczne ma niewielki wpływ, podobnie jak w przypadku widm IR występują w określonych zakresach. Jednak w przypadku pochodnych grafenu widmo ramanowskie jest mało użyteczne w wykrywaniu wprowadzonych modyfikacji chemicznych. Obserwowane zmiany głównych pasm nie są specyficzne i są trudne do zinterpretowania (Rys. III.15). Mogą występować przy różnych modyfikacjach, jako wyraz zdefektowania próbki.



Rys. III.14. Schemat przedstawiający różnice między rozpraszaniem Rayleigha i ramanowskim (Stokes i anty-Stokes).

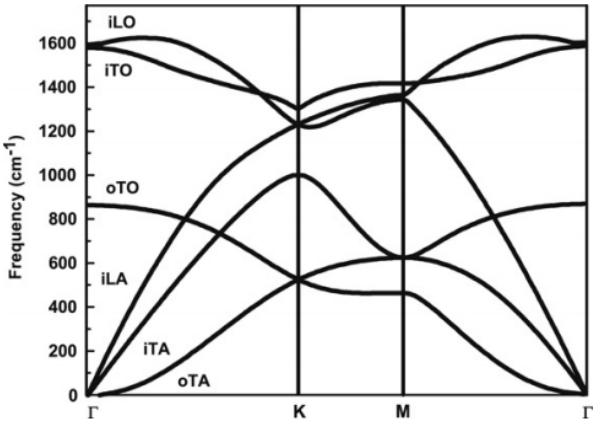
Widma ramanowskie dostarczają natomiast wielu informacji o charakterystyce fizycznej materiału, np. o rodzaju fazy krystalicznej, formy polimorficznej oraz naprężeniach wewnętrznych. W przypadku pochodnych grafenu spektroskopia ramanowska jest



Rys. III.15. Widma ramanowskie grafitu (a) utlenionego grafenu GO (b), GO modyfikowanego grupą azydkową przed (c) oraz po reakcji CuAAC z pochodną polimeru PEG (d). Widma zaczerpnięto z pracy Kou, et. al. 2013.[271]

powszechnie stosowana do wyznaczania liczby oraz orientacji warstw, koncentracji nośników swobodnych oraz naprężeń.[273] Grafen posiada łącznie sześć gałęzi fononowych – trzy akustyczne (A) oraz trzy optyczne (O). Dwie gałęzie optyczne oraz dwie akustyczne i (ang. *in plane*) są związane z drganiem w płaszczyźnie. Drganiom poza płaszczyzną o (ang. *out of plane*), odpowiada jedna gałąź optyczna i jedna akustyczna. Mody drgań fononów podłużnych opisujących drgania równoległe do kierunku rozchodzenia się fononu (czyli jego wektora falowego) oznaczane są L, natomiast opisujących drgania poprzeczne – T. Wzdłuż kierunków ΓM i ΓK (punkty strefy Brillouina) można wyróżnić mody fononowe iLO, iTO, oTO, iLA, iTA oraz oTA (Rys. III.16).

Grafen jest dwuwymiarowym, wysoce ustrukturyzowanym materiałem. Na widmo grafenu składają się głównie pasma G (~1600 cm^{-1}) oraz 2D (~2700 cm^{-1}). Pasmo G odpowiada modowi fononów iTO oraz iLO w centrum strefy Brillouina (punkt Γ). Pasmo D wymaga do aktywacji obecności defektów. Powstaje na skutek drugorzędowego procesu obejmującego fonon iTO w punkcie K strefy Brillouina oraz defektu. Sygnał 2D powstaje w wyniku emisji dwóch fotonów. Na widmie zdefektowanego grafenu obecne mogą być także inne sygnały: D', D + D', D + D" oraz 2D' (Rys. III.17A), będące złożeniem wielu procesów fononowych.[273]

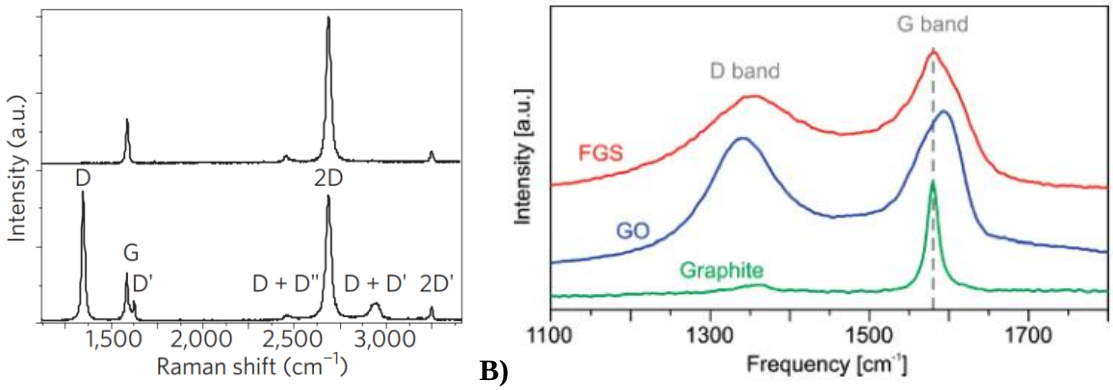


Rys. III.16. Obliczona dyspersja fononów w grafenie. Rysunek zaczerpnięto z pracy Malard, et al. 2009.[274]

Na skutek utleniania grafenu lub grafitu pasma G i D ulegają zmianie, których końcową fazą jest amorfizacja grafenu – wtedy w widmach ramanowskich pojawia się duży udział węgli o hybrydyzacji sp^3. Zwiększenie zaburzeń struktury grafenu prowadzi do poszerzenia pasma G oraz pojawienia szerokiego pasma D (Rys. III.17B). Ponadto położenie sygnału G przesunięte jest w stronę wyższych częstości.[275]

Stosując pomiary widm ramanowskich, a następnie analizę paramerów widma, takich jak intensywność pasm, szerokość połówkowa oraz położenie (energia), można uzyskać wiele informacji dotyczących parametrów fizycznych grafenu. Przykładowo duża szerokość połówkowa pasma 2D oraz większy stosunek powierzchni pod pasmem G do 2D oznacza dużą liczbę warstw grafenowych.[276] Z kolei zmiana energii pasma 2D na większą wskazuje na obecność naprężeń ściskających, natomiast na mniejszą – naprężeń rozciągających.[277] Naprężenia ściskające wpływają także na zwiększenie energii pasma G. Koncentracja nośników grafenu wpływa na położenie pasma G – jego szerokość spektralna zmniejsza się wraz ze wzrostem koncentracji swobodnych nośników. Ponadto z zależności położenia pasm G i 2D

możliwe jest jednoczesne uzyskanie informacji o koncentracji nośników oraz naprężeniach w próbce.[278]

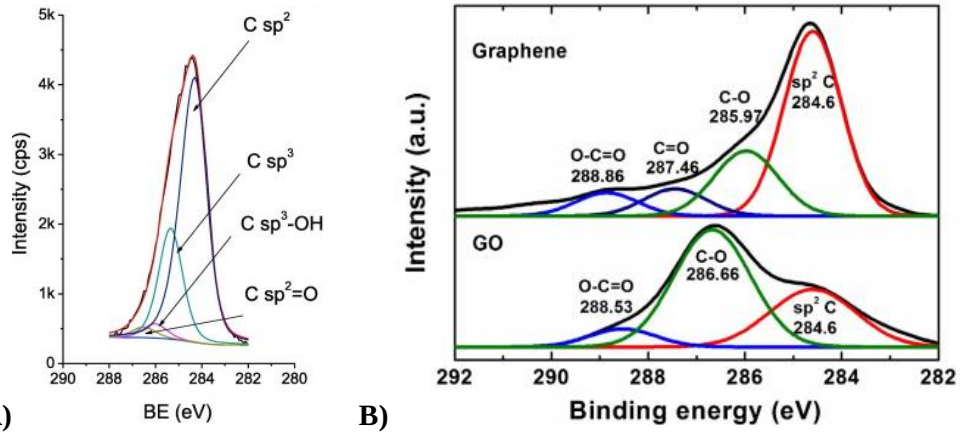


Rys. III.17. A) Widma ramanowskie pierwotnego (góra) i zdefektowanego (dół) grafenu. Rysunek zaczerpnięto z pracy Ferrari, et al. 2013;[273] **B)** Widma ramanowskie grafitu (zielony), tlenku grafenu GO (niebieski) oraz sfunkcjonalizowanych pojedynczych warstw grafenu FGS (czerwony). Rysunek zaczerpnięto z pracy Kudin, et al. 2008.[275]

III.2.3. Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS)

Na skutek oddziaływania próbki z promieniowaniem rentgenowskim (X) możliwe jest zajście dwóch zjawisk elektronowych: emisji promieniowania charakterystycznego oraz tzw. efektu Augera. Wybicie elektronu z wewnętrznej powłoki na skutek promieniowania zewnętrznego prowadzi do przejścia elektronu z wyższej powłoki z jednoczesną emisją promieniowania charakterystycznego (fotonu) dla danego atomu. Spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X XPS (ang. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) jest przykładem spektroskopii elektronowej stosowanej powszechnie do badań modyfikacji chemicznych nanomateriałów.[279, 280] XPS opiera się na zjawisku fotoelektrycznym – padający na próbkę foton o wystarczająco dużej energii może wybić elektron z molekuły (lub atomu). Energia kinetyczna fotonu padającego jest równa sumie energii kinetycznej wybitego elektronu oraz energii jonizacji. Widmo XPS pozwala nie tylko na charakterystykę składu pierwiastkowego próbki, ale także niesie informację o rodzaju wiązań. Ze względu na niewielki obszar emisji fotoelektronów metoda ta stosowana jest w badaniach powierzchni próbek.

Defektowanie grafenu (tworzonego w wyniku hybrydyzacji sp^2 węgla) prowadzi do zwiększenia udziału wiązań sp^3. Metoda XPS pozwala na ilościowe zobrazowanie zawartości atomów węgla o konkretnej hybrydyzacji w badanym materiale, poprzez analizę sygnału linii węgla C 1s (282–290 eV; Rys. III.18A). Widma ramanowskie także niosą informację o zawartości różnych hybrydyzacji węgla – pasmo G związane jest z węglem sp^2, natomiast D z sp^3. Jednak użyteczność spektroskopii ramanowskiej w analizie modyfikacji chemicznych grafenu jest ograniczona. Widmo XPS grafenu zawiera linię węgla C 1s, której dominujący wkład pochodzi od węgli sp^2 (284,6 eV; Rys. III.18B). Widoczne są także niewielkie wkłady węgla związanego z tlenem w konfiguracji: C–O (285,97 eV), C=O (287,46 eV) oraz O–C=O (288,86 eV). Po utlenieniu grafenu na linii węgla C 1s widma XPS zauważalny jest przyrost wkładu węgli związanych z atomem tlenu (Rys. 18B) oraz węgla o hybrydyzacji sp^3. W literaturze istnieją także przykłady, w których przy pomocy spektroskopii XPS możliwe było wykrycie azotu, np. w tlenku grafenu modyfikowanego poli(ε-kaprolaktonem), wprowadzonym w reakcji CuAAC.[281]



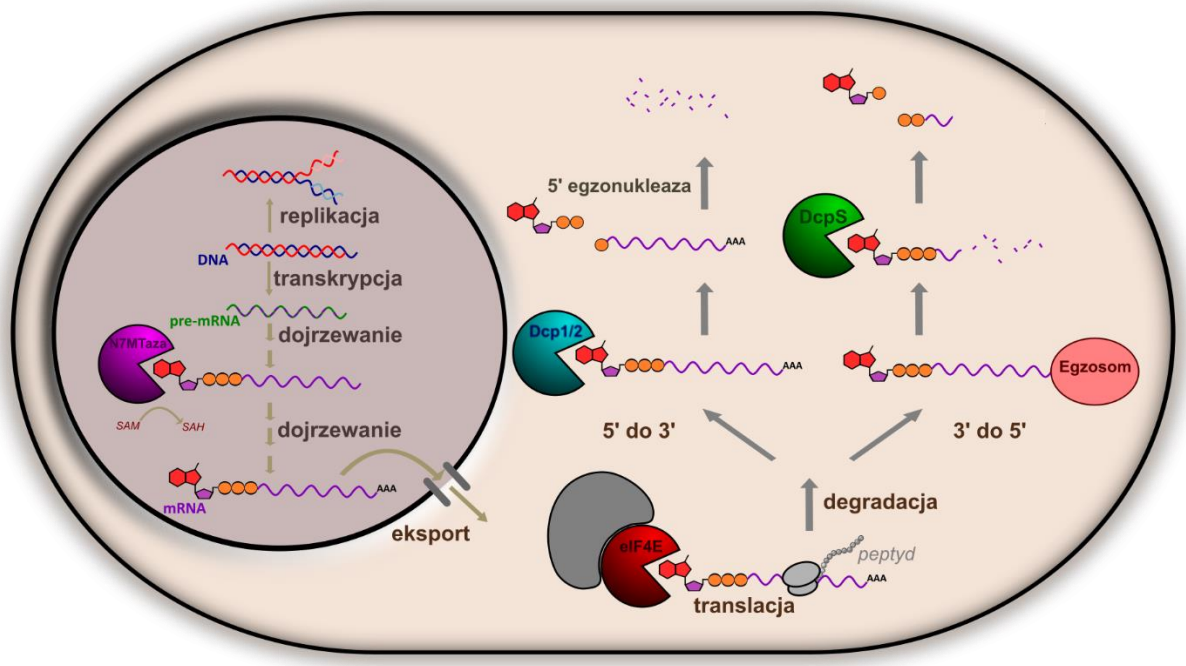
Rys. III.18. A) Widmo XPS próbki diamentu nanokrystalicznego – zbliżenie na pasmo węgla z zaznaczonymi składowymi sygnału;[279] **B)** Widma XPS grafenu oraz utlenionego grafenu GO – zbliżenie na pasmo węgla z zaznaczonymi składowymi sygnału.[282]

Z punktu widzenia niniejszej pracy doktorskiej spektroskopia XPS stanowi narzędzie identyfikacji chemicznych modyfikacji warstw grafenowych w próbkach, dla których nie było możliwe zarejestrowanie widma IR z użyciem dostępnej aparatury (ATR i DRIFTS).

IV. Badania własne

IV.1. Motywacja pracy

Koniec 5’ mRNA (kap) bierze udział w wielu istotnych procesach biologicznych, niezbędnych do wzrostu i funkcjonowania komórek. Kap jest nietypową strukturą nukleotydową, zbudowaną z 7-metyloguanozyny połączonej mostkiem 5’5’-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem. Dzięki obecności ładunku dodatniego w pierścieniu 7-metyloguanozyny kap może specyficznie oddziaływać z wieloma jądrowymi i cytoplazmatycznymi białkami (Rys. IV.1).



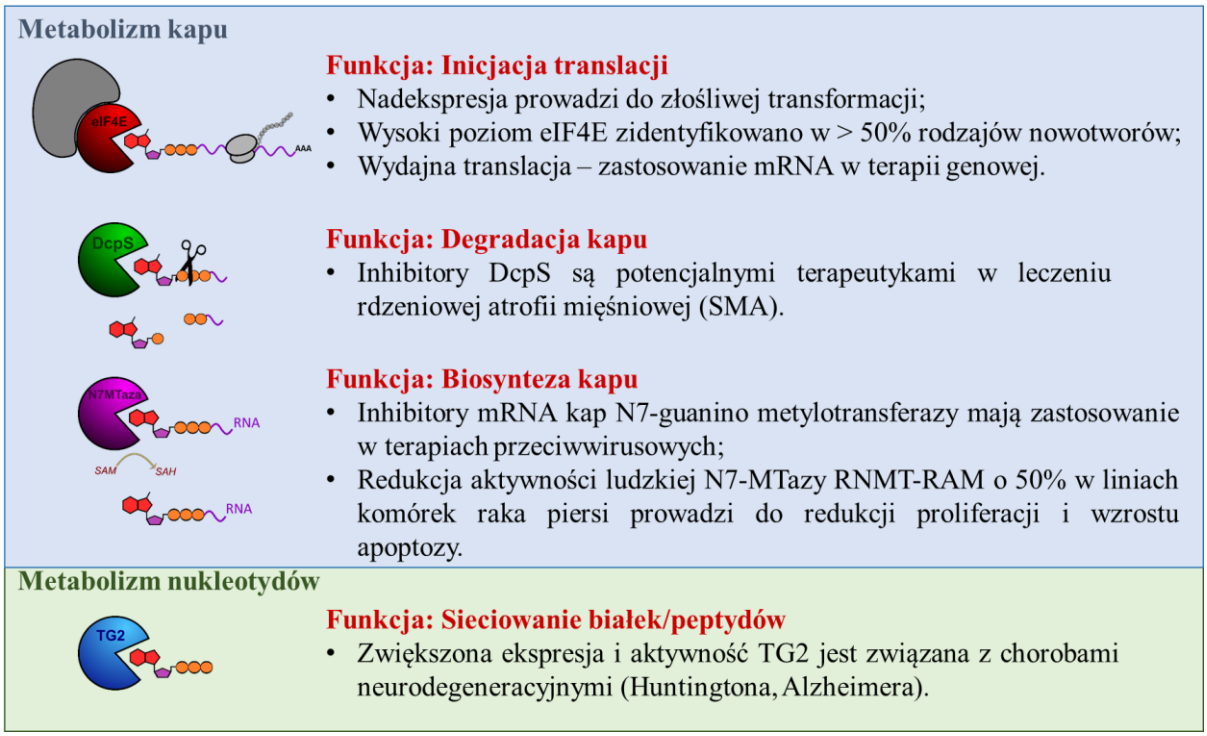
Rys. IV.1. Przekrój procesów komórkowych, w które zaangażowana jest struktura kapu.

Białka metabolizujące kap biorą udział w procesach niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki. Tym samym ich dysfunkcja – zmiana poziomu ekspresji lub aktywności może prowadzić do wielu procesów patofizjologicznych (Rys. IV.2). Przykładem takiego białka wiążącego kap jest eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (eIF4E), wchodzący w skład wielobiałkowego kompleksu, w którym 4E bezpośrednio oddziałuje z 7-metyloguanozyną kapu. Białko eIF4E jest odpowiedzialne za wzrost komórki, a jego nadekspresja prowadzi do dużych zmian fenotypowych, w tym proliferacji i transformacji nowotworowej.[283] Zwiększony poziom eIF4E został zidentyfikowany w >50% rodzajach nowotworów, w tym piersi,[284] krtani i gardła[78] oraz prostaty.[285] Właściwości onkogenne eIF4E są skutkiem silnego wpływu jego stężenia na translację niektórych mRNA (tzw. „słabe mRNA”), które często kodują białka związane z onkogenezą i przetrwaniem komórki.[286] Wszystko to sprawia, że białko eIF4E stanowi cel terapeutyczny w wielu terapiach przeciwnowotworowych. Ponadto kompleks eIF4E–kap stanowi ważny element udoskonalania terapii genowych z wykorzystaniem terapeutycznego mRNA. W tym celu na końcu 5’ mRNA wprowadzane są chemicznie modyfikowane analogi kapu silnie wiążące się z eIF4E oraz

zwiększające wydajność translacji. Przykładem tego typu związków są dinukleotydowe analogi kapu zawierające modyfikację tiofosforanową.[176, 183]

Kolejnym białkiem oddziałującym z kapem o istotnym znaczeniu terapeutycznym jest enzym DcpS (*Decapping Scavenger enzyme),* zaangażowany w ścieżkę 3'→5' degradacji mRNA. Odpowiada on za hydrolizę wiązania pirofosforanowego z uwolnieniem cząsteczki m^7GMP. Inhibitory aktywności DcpS są potencjalnymi terapeutykami w leczeniu rdzeniowej atrofii mięśniowej (*Spinal Muscular Atrophy*).[119, 287] Znane są także odporne na hydrolizę oraz inhibujące aktywność DcpS syntetyczne analogi kapu, zawierające takie modyfikacje jak metylenobisfosfonianowa,[168] boranofosforanowa,[164] czy tiofosforanowa.[121].

Trzecim procesem będącym przedmiotem badań niniejszego projektu doktorskiego jest synteza enzymatyczna kapu na końcu 5' powstającego transkryptu, będąca obok splicingu i poliadenylacji jednym z najważniejszych etapów post-transkrypcyjnego dojrzewania mRNA. Jednym z etapów biosyntezy kapu jest specyficzna metylacja pozycji N7. Proces ten jest katalizowany przez enzym RNA kap N7–guanino metylotransferazę (N7–MTazę), który odpowiada za przeniesienie grupy metylowej z cząsteczki *S*-adenozylometioniny (SAM) w pozycję N7 guanozyny na końcu 5' mRNA. Niektóre wirusy w celu uniknięcia odpowiedzi układu odpornościowego oraz zwiększenia ekspresji białek wirusowych wykorzystują maszynerię kapującą gospodarza lub kodują własne białka biosyntezy kapu. W związku z tym aktywność N7–MTazy powiązana jest z wieloma infekcjami wirusowymi, przez co stanowi cel terapeutyczny.



Rys. IV.2. Znaczenie terapeutyczne białek badanych w ramach niniejszego projektu doktorskiego.

Mnogość biologicznych funkcji 5' kapu oraz jego związek z rozwojem i leczeniem wielu chorób sprawia, że stanowi on interesujący cel badań. Odpowiednio zaprojektowane modyfikacje chemiczne kapu wpływają na właściwości całego mRNA, takie jak zwiększenie wydajności translacji czy odporność na degradację enzymatyczną. Z tego względu wciąż poszukiwane są nowe analogi kapu silnie wiążące się z białkiem eIF4E, bądź hamujące degradację przez DcpS o właściwościach odpowiednio przeciwnowotworowych i anty–SMA.

Do tych celów wymagana jest szybka i efektywna selekcja małocząsteczkowych ligandów oparta o czułe metody screeningowe, tzw. HTS (*High-Throughput Screening*), umożliwiające charakterystykę całych bibliotek związków. Scharakteryzowanie biblioteki odbywa się poprzez wyznaczenie parametru oddziaływania związku z białkiem, np. stałej wiązania K_D lub IC_{50} (ang. *half-maximal inhibitory concentration*). W literaturze opisano metody pozwalające na obliczanie stałych asocjacji kompleksów kap–białko. Miareczkowanie fluorescencyjne (tsFQT, *time-synchronized fluorescence quenching titration*),[86, 110, 120] czy też izotermiczna kalorymetria miareczkująca (ITC)[288] uznawane są za standardowe metody charakterystyki wiązania kap–eIF4E. Badanie miejsca wiążącego eIF4E możliwe jest także przy użyciu powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR),[289] bądź polaryzacji fluorescencji.[113, 290] Metody badania aktywności, inhibicji DcpS, a także wiązania ligandów obejmują radioznakowanie,[96] wysokosprawną chromatografię cieczowa (HPLC)[123] oraz sondy kowalencyjne.[291] Metody te zapewniły istotny wkład w badania funkcji białek wiążących kap, jednak posiadają one pewne ograniczenia, takie jak wysokie koszty, skomplikowany układ eksperymentalny oraz czasochłonność, co sprawia, że nie są odpowiednie do bezpośrednich badań wysokoprzepustowych. Inhibitory syntezy kapu również posiadają istotne znaczenie terapeutyczne pełniąc funkcję czynników przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych. Jednak opracowanie metody badania N7–metylacji jest wymagające gdyż naturalnym substratem większości N7–MTaz jest Gppp–RNA, którego synteza na dużą skalę jest utrudniona.[292] Wedle najlepszej wiedzy Autorki nie istnieją bezpośrednie metody pozwalające na monitorowanie aktywności N7–MTazy w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem małocząsteczkowych sond.

Biorąc pod uwagę potencjał terapeutyczny białek metabolizujących kap wysokoprzepustowe metody przesiewowe oparte o łatwe w syntezie molekuły i czułą detekcję, które nie są czaso- i pracochłonne, są nadal wysoce użyteczne. Rozwijane metodologie mogą być następnie przystosowywane do badań białek oddziałujących z innymi nukleotydami o znaczeniu terapeutycznym (Rys. IV. 2).

IV.2. Plan badań

Jedną z najbardziej czułych technik pomiarowych oddziaływań białko–ligand jest spektroskopia fluorescencyjna. Dlatego też znakowanie fluorescencyjne molekuł biologicznie czynnych jest często wykorzystywanym podejściem do monitorowania ich oddziaływań z białkami. Układ tego typu nazywany jest sondą molekularną, gdzie struktura liganda odpowiada za specyficzność oddziaływania, a znacznik fluorescencyjny za generowanie mierzalnego sygnału analitycznego. Najprostszym zastosowaniem metod fluorescencyjnych jest pomiar zmian intensywności fluorescencji (FLINT), zachodzących trakcie procesu. Alternatywnym podejściem w wysokoprzesiewowych pomiarach fluorescencyjnych jest metoda polaryzacji fluorescencji (FP) oraz mikroskalowej termoforezy (MST). Jednak w przypadku degradacji enzymatycznej małej cząsteczki kapu przez DcpS, czy też N7–metylacji masa molekuły zmienia się nieznacznie, co uniemożliwia stosowanie pomiarów FP i MST. Metody te mogą być natomiast z powodzeniem zastosowane w badaniach tworzenia kompleksu białko–ligand.

Założeniem projektu doktorskiego było wykorzystanie prostych metod syntetycznych (cykloaddycja azydkowo-alkinowa katalizowana jonami miedzy (I) CuAAC, *S*-alkilowanie) w celu otrzymania uniwersalnych narzędzi, służących do opracowania szybkich i wydajnych metod fluorescencyjnych umożliwiających wysokoprzepustowe badania bibliotek małocząsteczkowych ligandów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. W szczególności

skupiono się na wykorzystaniu zjawiska FLINT w oparciu o pojawianie lub zanikanie oddziaływań wygaszających pomiędzy znacznikiem i częścią nukleotydową. Metody te mają posłużyć do badań przesiewowych oraz ewaluacji potencjalnych inhibitorów białek metabolizujących kap. Wyselekcjonowane związki mogą zostać następnie wykorzystanie do eksperymentów biologicznych w komórkach. W pierwszym etapie projektu doktorskiego skupiono się na białkach eIF4E i DcpS, jako modelowych obiektach o istotnym znaczeniu terapeutycznym. Następnie opracowaną metodologię wykorzystującą proste strukturalnie substraty planowano przystosować do badań N7–MTazy w celu wyselekcjonowania nowych inhibitorów białka. Proces opracowania metody można opisać w kilku punktach:

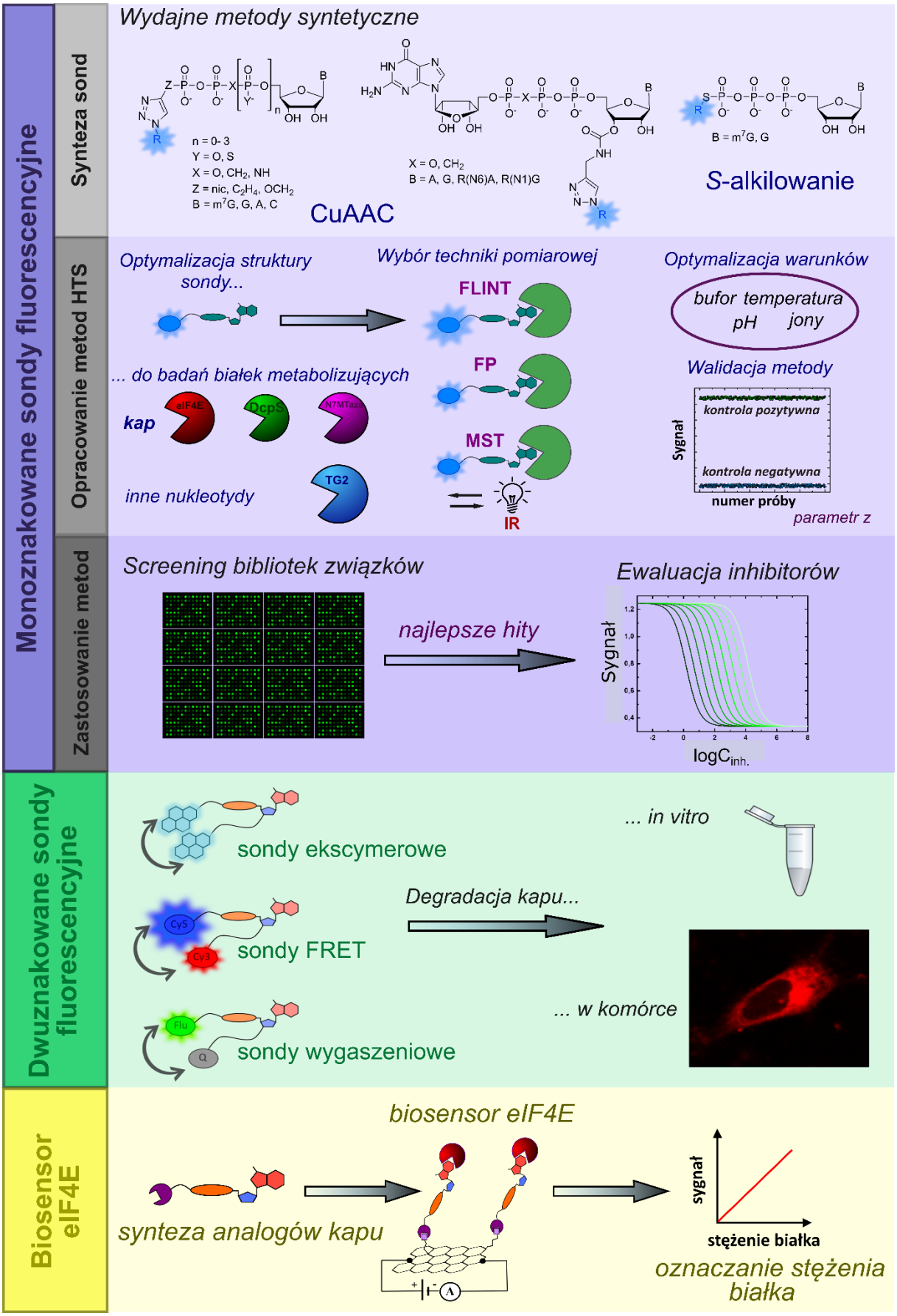
- Synteza serii znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów (sond molekularnych);
- Scharakteryzowanie właściwości spektroskopowych sond oraz zmian fluorescencji w trakcie oddziaływania z białkiem;
- Podział sond na dwie grupy: zmieniające intensywność fluorescencji w trakcie procesu (metoda FLINT) oraz niezmieniające intensywności fluorescencji (metody FP i MST);
- Optymalizacja struktury sondy: wyznaczenie parametrów powinowactwa lub parametrów kinetycznych reakcji;
- Opracowanie metody fluorescencyjnej – optymalizacja warunków, korelacja wyników uzyskanych nową metodą z danymi literaturowymi;
- Walidacja metody – wyznaczenie parametru z, mówiącego, o jakości metody.

Tak opracowana i scharakteryzowana metoda HTS może zostać następnie zastosowana do badań przesiewowych, inhibicji, tworzenia kompleksu białko–ligand, a także do badań w bardziej skomplikowanych układach (np. ekstrakty komórkowe).

Największą zaletą zaproponowanego podejścia jest zastosowanie małocząsteczkowych sond fluorescencyjnych, które są bardzo czułe i nie wymagają stosowania dużych ilości białka. Ponadto opracowane przez Autorkę procedury mogą zostać zaadaptowane do badań innych białek wiążących nukleotydy. Przykładem jest enzym tranglutaminaza II, będąca obiektem badań Autorki w trakcie stażu badawczego w grupie dr Markusa Pietscha (Uniwersytet w Kolonii).

W jednej z części niniejszej pracy, w ramach współpracy w projekcie, zamierzano przeprowadzić charakterystykę spektroskopową i enzymatyczną dwuznakowanych analogów mononukleotydów – w tym kapu, wykorzystujących zjawiska fluorescencyjne oparte o oddziaływania międzymolekularne (ekscymery, FRET, wygaszanie). Tego typu sondy molekularne miały posłużyć do badań degradacji kapu zarówno z użyciem rekombinowanego, jak i endogennego enzymu DcpS.

W ramach interdyscyplinarności projektu doktorskiego zaplanowano także opracowanie biosensora wykorzystującego sfunkcjonalizowany analogiem kapu grafen oraz zmiany przewodnictwa elektrycznego w celu oznaczania stężenia białka eIF4E, będącego markerem nowotworowym.

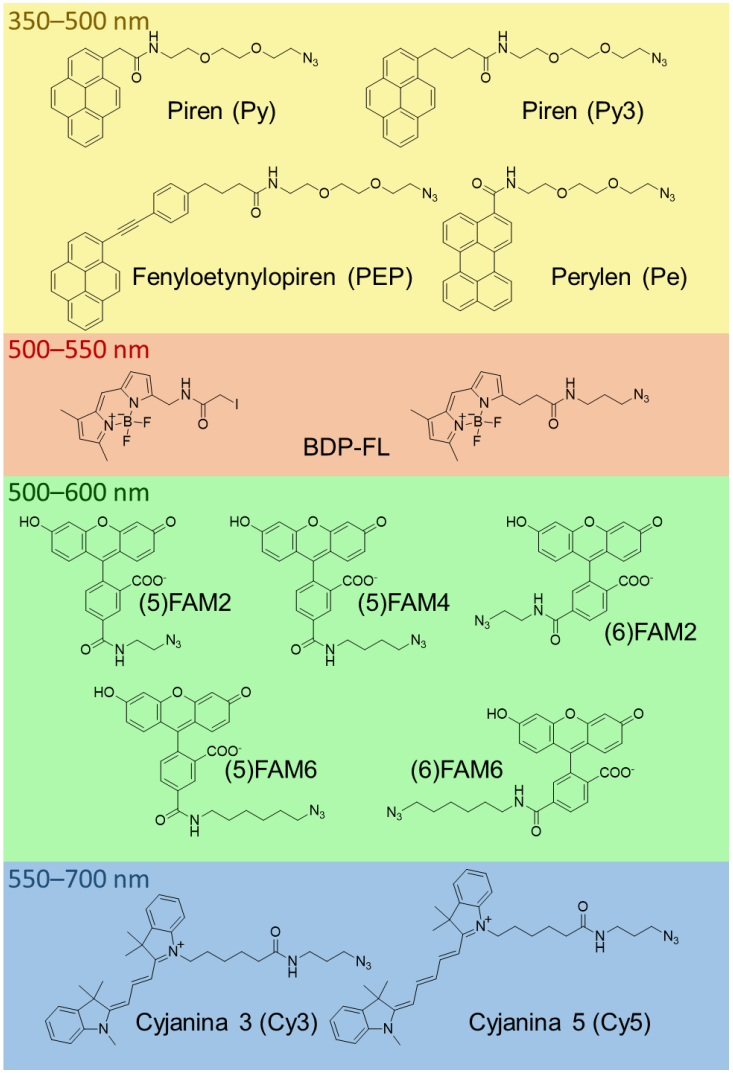


Rys. IV.3. Schematyczne przedstawienie planów badawczych niniejszego projektu doktorskiego.

IV.3. Synteza fluorescencyjnych nukleotydów

W ramach projektu doktorskiego, korzystając ze znanych metod syntetycznych, otrzymano łącznie 39 nowych, fluorescencyjnych nukleotydów, w tym:

- 15 mononukleotydowych analogów kapu (Serie A i B);
- 13 dinukleotydowych analogów GpppA lub GpppG (Seria C);
- 11 analogów nukleotydów guanozynowych (Seria D);
- pozostałe związki otrzymane w ramach kontroli (np. nukleotydy zawierające inne zasady azotowe, znakowane fosforany/fosfoniany).



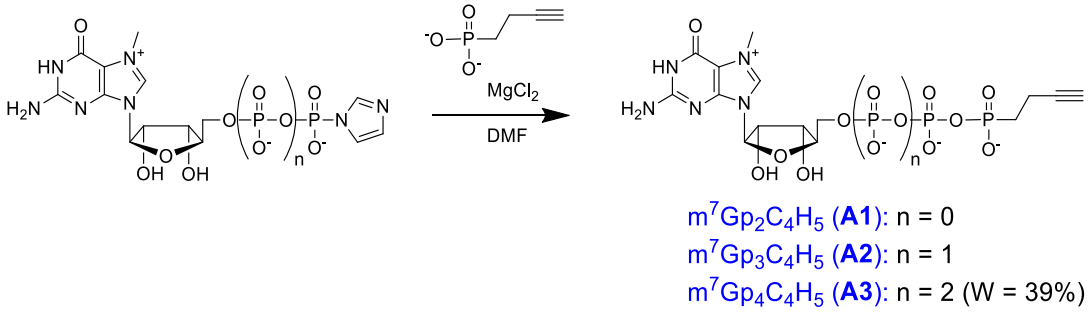
Rys. IV.4. Struktury znaczników fluorescencyjnych wykorzystanych w syntezie sond molekularnych wraz z zakresem długości fal emisji. Znaczniki uporządkowano na podstawie struktury fluorofora.

Ogólny schemat syntezy nukleotydów obejmował dwa etapy. W pierwszym z nich do odpowiedniej struktury nukleotydowej wprowadzano grupę alkinową lub tiolową. Otrzymane sfunkcjonalizowane nukleotydy (w postaci soli amonowej lub trietyloamoniowej – w pojedynczych przypadkach) w ostatnim etapie znakowano fluorescencyjnie w reakcji katalizowanej jonami miedzi (I) cykloaddycji azydkowo-alkinowej (CuAAC), bądź *S*-alkilowania. Postęp reakcji chemicznej monitorowano z użyciem RP HPLC oraz analizy MS. Strukturę oczyszczonego produktu potwierdzano poprzez zarejestrowanie wysokorozdzielczych widm masowych HR MS oraz widm NMR (^{1}H, ^{31}P i COSY ^{1}H-^{1}H) w przypadku

niefluorescencyjnych nukleotydów. Na Rys. IV.4 przedstawiono struktury znaczników wykorzystywanych w niniejszej pracy doktorskiej.

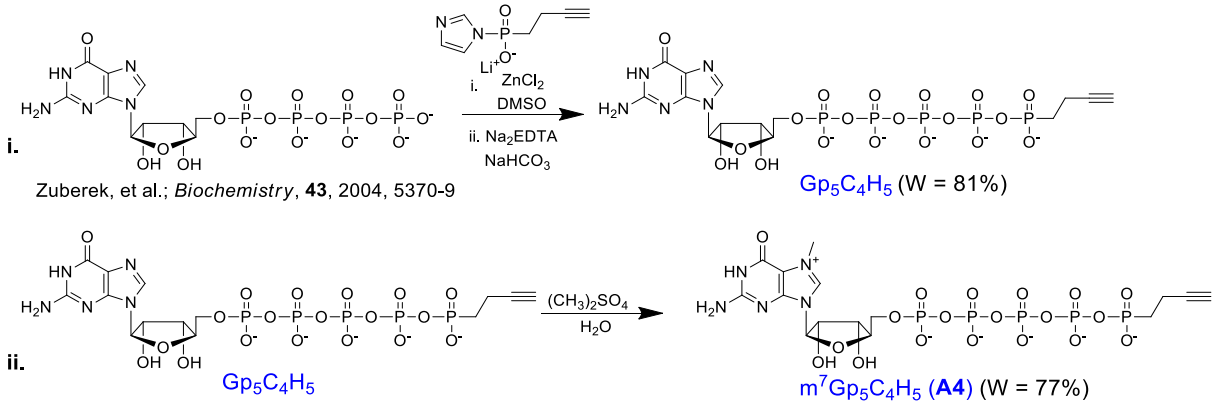
IV.3.1. Synteza analogów m^{7}GTP do badań białka eIF4E – seria A

Małocząsteczkowe sondy molekularne, przeznaczone do badań białka eIF4E zostały zaprojektowane w oparciu o strukturę m^{7}GTP. Wybór mononukleotydu podyktowany był jego dziesięciokrotnie wyższym powinowactwem do eIF4E w stosunku do m^{7}GpppG (K_{AS}(m^{7}GTP) = 119,7 μM^{-1} i K_{AS}(m^{7}GpppG) = 12,5 μM^{-1}).[115] Wydłużanie łańcucha oligofosforanowego także zwiększa powinowactwo nukleotydu do eIF4E,[115] jednak może skutkować osłabieniem oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych, pomiędzy zasadą azotową i znacznikiem (spadek czułości). Z tego względu, w celu zoptymalizowania struktury sondy fluorescencyjnej otrzymano serię m^{7}G nukleotydów, zawierających od dwóch do pięciu reszt fosforanowych (Rys. IV.5–6). Związki **A1** i **A2** otrzymała w ramach pracy doktorskiej dr Sylwia Ciechanowicz (Walczak) w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW.



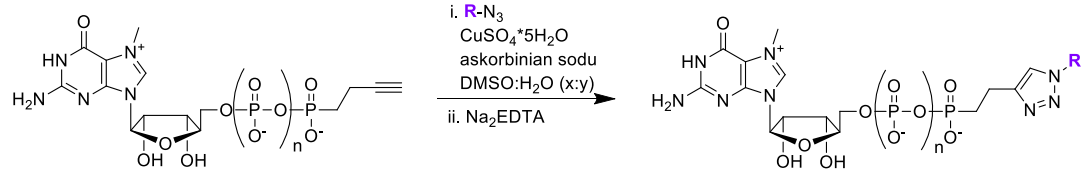
Rys. IV.5. Schemat syntezy 3-butynylo-*C*-fosfonianowych analogów nukleotydów 7-metyloguanozynowych.

W przypadku syntezy pentafosforanowego analogu 7-metyloguanozyny (**A4**) zastosowano nieco inne podejście syntetyczne, ze względu na problem w otrzymaniu *P*-imidazolidu Gp$_4$ (Rys. IV.6). W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję sprzęgania pomiędzy *P*-imidazolidem 3-butynylo-*C*-fosfonianu w soli litu, a tetrafosforanem guanozyny (sól TEA). Produkt reakcji wyizolowano metodą RP HPLC. Otrzymany ε-*C*-(3-butynylo) pentafosforan guanozyny (Gp$_5$C$_4$H$_5$) poddano następnie metylowaniu w środowisku wodnym z użyciem siarczanu dimetylu (CH$_3$)$_2$SO$_4$. Produkt m^{7}Gp$_5$C$_4$H$_5$ (**A4**) wyizolowano w postaci soli amonowej z wykorzystaniem RP HPLC.

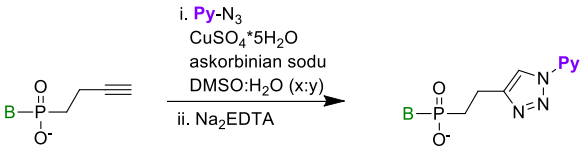


Rys. IV.6. Schemat syntezy ε-*C*-(3-butynylo) pentafosforanu 7-metyloguanozyny (m^{7}Gp$_5$C$_4$H$_5$, **A4**).

Wszystkie otrzymane analogi m^7GTP modyfikowane grupą alkinową poddano reakcji CuAAC z wybranymi znacznikami fluorescencyjnymi, zawierającymi ugrupowanie azydkowe (Rys. IV.7). Testowano znaczniki, których emisja pokrywa szeroki zakres światła widzialnego oraz bliskiego UV, takie jak piren (Py), fenyloetynylopiren (PEP), pochodną barwnika BODIPY (BDP-FL), 6-karboksyfluoresceinę ((6)FAM2), cyjaninę 3 (Cy3) oraz cyjaninę 5 (Cy5). W ramach kontroli otrzymano także 3-butynylo-*C*-fosfonian znakowany pirenem (pC_4Py) oraz znakowane nukleotydy, zawierające inne zasady azotowe: guaninę (Gp_3C_4Py), cytozynę (Cp_3C_4Py) oraz adeninę (Ap_3C_4Py; Rys. IV.7). Nukleotydy 7-metyloguanozynowe różniące się długością łańcucha fosforanowego (tetra- i pentafosforan) znakowano jedynie pirenem, który wyselekcjonowano w badaniach biofizycznych. Przykładowy chromatogram RP HPLC z reakcji otrzymywania oraz oczyszczonej sondy **A4-1** zaprezentowano na Rys. IV.8 natomiast na Rys. IV.9 profil HR MS sondy oraz prekursora (**A4**).

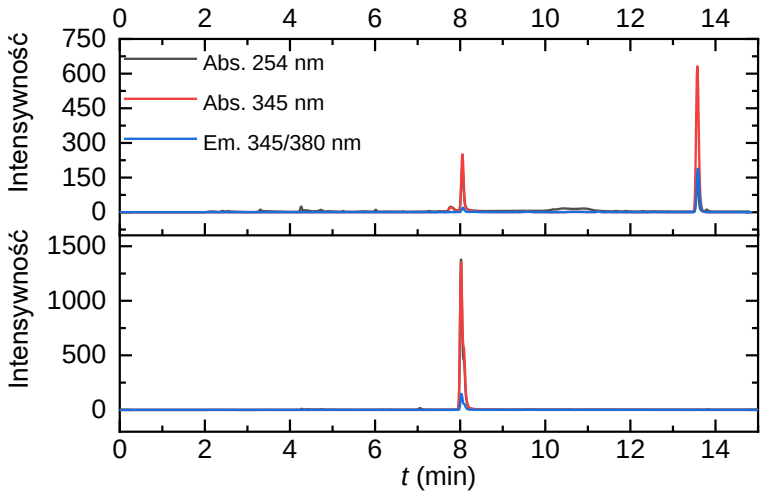


$m^7Gp_2C_4Py$ (**A1-1**): n = 1, R = Py (W = 83%)
$m^7Gp_2C_4$(6)FAM2 (**A1-2**): n = 1, R = (6)FAM2 (W = 55%)
$m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**): n = 2, R = Py (W = 62%)
$m^7Gp_3C_4$PEP (**A2-2**): n = 2, R = PEP (W = 36%)
$m^7Gp_3C_4$BDP-FL (**A2-3**): n = 2, R = BDP-FL (W = 52%)
$m^7Gp_3C_4$(6)FAM2 (**A2-4**): n = 2, R = (6)FAM2 (W = 96%)
$m^7Gp_3C_4Cy3$ (**A2-5**): n = 2, R = Cy3 (W = 40%)
$m^7Gp_3C_4Cy5$ (**A2-6**): n = 2, R = Cy5 (W = 40%)
$m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**): n = 3, R = Py (W = 75%)
$m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**): n = 4, R = Py (W = 80%)

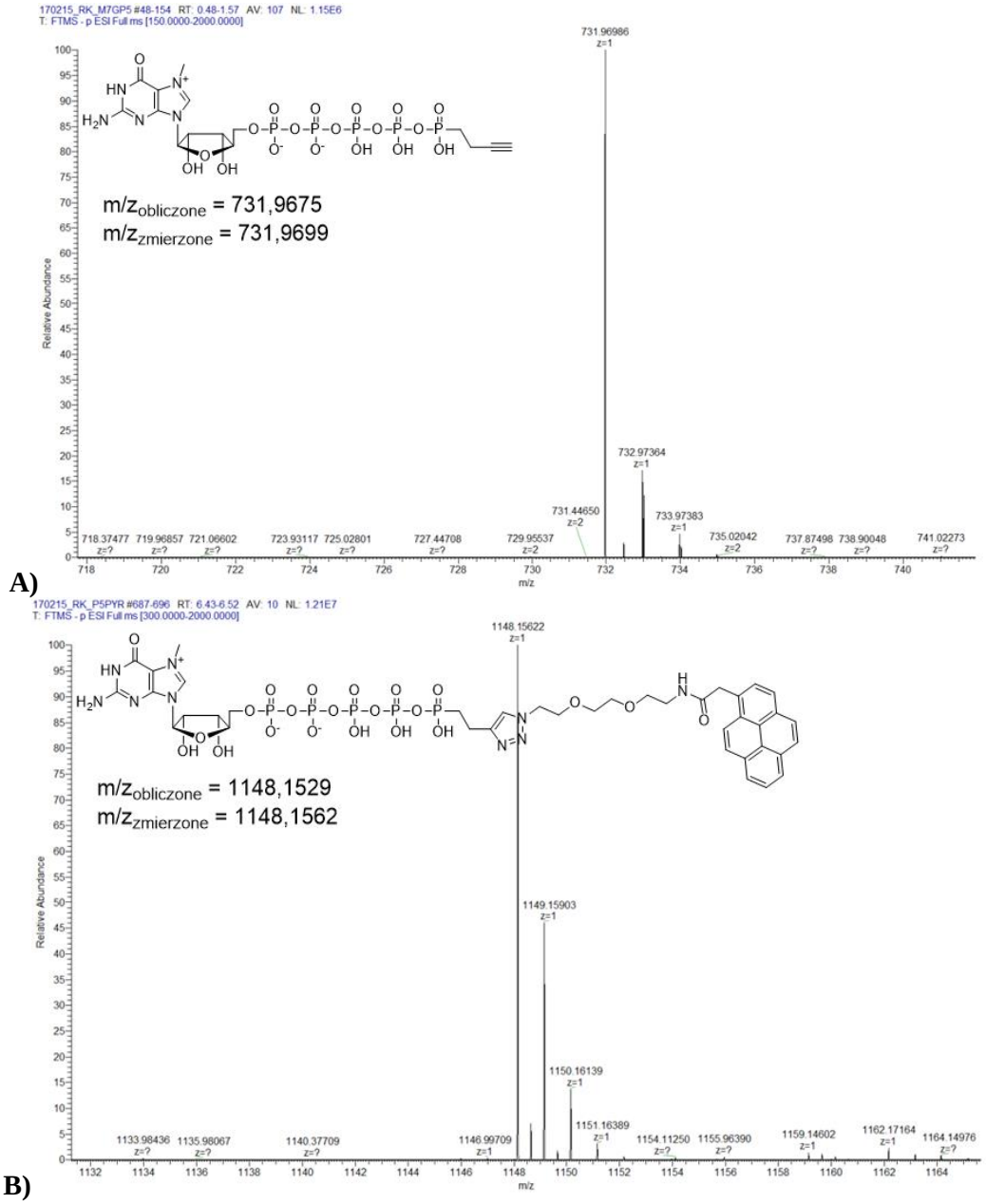


Gp_3C_4Py: B = GDP (W = 91%)
Cp_3C_4Py: B = CDP (W = 90%)
Ap_3C_4Py: B = ADP (W = 89%)
pC_4Py: B = O^- (b.d.)

Rys. IV.7. Schemat syntezy fluorescencyjnie znakowanych, mononukleotydowych analogów kapu w reakcji CuAAC.



Rys. IV.8. Przykładowy chromatogram z reakcji otrzymywania oraz oczyszczonego $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**); $t_R(m^7Gp_5C_4Py)$ = 8,0 min, t_R(Py-N_3) = 13,5 min (eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T).



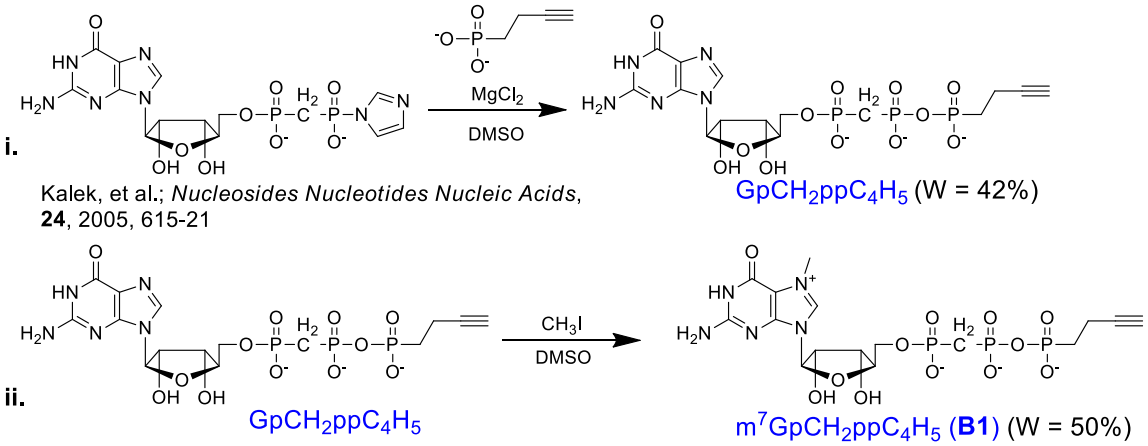
Rys. IV.9. Przykładowe widma HR MS substratu i produktu reakcji CuAAC:**A)** $m^7Gp_5C_4H_5$ (**A4**) i **B)** $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**).

Łącznie zsyntetyzowano 10 fluorescencyjnych, mononukleotydowych analogów kapu, które następnie zostały scharakteryzowane fluorescencyjnie oraz przetestowane w eksperymencie oddziaływania z białkiem eIF4E (Rozdział IV.4).

IV.3.2. Synteza analogów m^7GTP do badań białka DcpS – Seria B

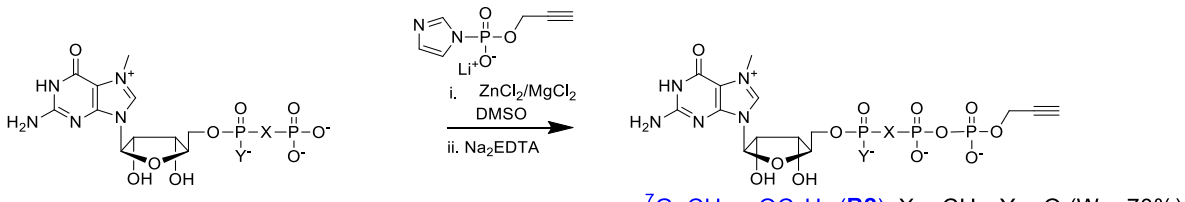
Wszystkie analogi m^7G nukleotydów, których syntezę opisano w poprzednim rozdziale, są substratami w reakcji hydrolizy katalizowanej przez enzym DcpS. Z tego względu do badań wiązania nukleotydów z enzymem DcpS, zaprojektowana sonda musi być odporna na degradację. W niniejszej pracy przetestowano wybrane modyfikacje chemiczne łańcucha oligofosforanowego, takie jak α-β-metylenobisfosfonianowa (-CH_2-), α-β-imidofosforanowa (-NH-) oraz α-tiofosforanowa (-S^-). Pierwszy nukleotyd przeznaczony do badań wstępnych posiadał modyfikację α-β-metylenobisfosfonianową oraz terminalną resztę 3-butynylo-*C*-

fosfonianową. Jego syntezę przeprowadzono w dwóch etapach (Rys. IV.10). W pierwszym z nich przeprowadzono reakcję sprzęgania 3-butynylo-*C*-fosfonianu z *P*-imidazolidem $GpCH_2p$ w obecności jonów Mg^{2+}. Produkt reakcji $GpCH_2ppC_4H_5$ oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej na złożu Sephadex i wyizolowano w postaci soli trietyloamoniowej. Następnie przeprowadzono selektywne N7–metylowanie w DMSO z użyciem jodku metylu CH_3I jako odczynnika alkilującego. Ostateczny produkt $m^7GpCH_2ppC_4H_5$ (**B1**) otrzymano w postaci soli amonowej po oczyszczeniu mieszaniny reakcyjnej metodą RP HPLC. Substraty do reakcji sprzęgania zsyntetyzowano korzystając ze znanych z literatury procedur.[169, 174, 293]



Rys. IV.10. Schemat syntezy trifosforanu γ-*C*-(3-butynylo) α-β-metyleno 7-metyloguanozyny ($m^7GpCH_2ppC_4H_5$, **B1**).

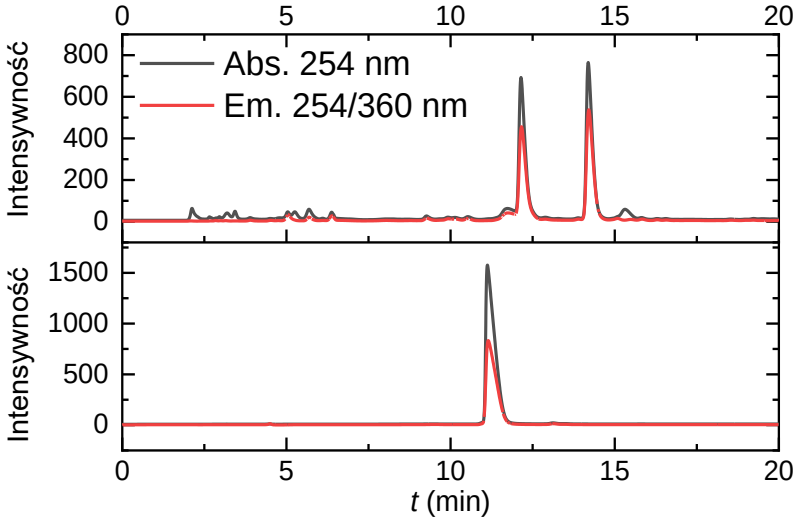
W trakcie prac syntetycznych nad analogami nukleotydów modyfikowanych grupą alkinową często pojawiały się problemy z otrzymaniem czystej podjednostki 3-butynylo-*C*-fosfonianu (do 50% zanieczyszczenia fosforanem). W efekcie w reakcji otrzymywania nukleotydów w dużych ilościach powstawały produkty uboczne – fosforany nukleozydów. Prowadziło to nie tylko do spadku wydajności syntezy alkinowych nukleotydów, ale także do problemów z ich oczyszczaniem. Z tego względu w kolejnych syntezach zdecydowano się na zastosowanie 2-propargilo-fosforanu. W reakcji sprzęgania nukleotydu modyfikowanego w łańcuchu fosforanowym z *P*-imidazolidem 2-propargilo-fosforanu w obecności jonów Zn^{2+}/Mg^{2+} otrzymano cztery analogi, przeznaczone do reakcji CuAAC: γ-O-(2-propargilo) α-β-metylenotrifosforan 7-metyloguanozyny (**B2**), γ-O-(2-propargilo) α-β-imidotrifosforan 7-metyloguanozyny (**B3**) oraz γ-O-(2-propargilo) α-tiotrifosforan 7-metyloguanozyny (diastereoizomery D1: *S* – **B4** i D2: *R* – **B5**; Rys. IV.11).



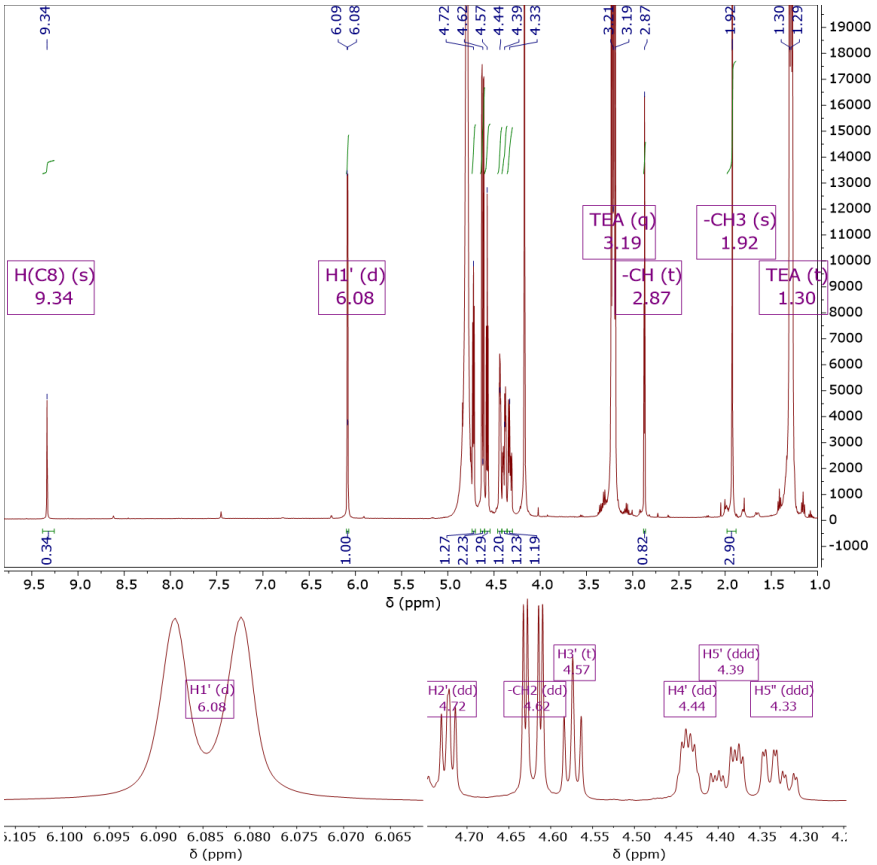
$m^7GpCH_2ppOC_3H_3$ (**B2**): X = CH_2, Y = O (W = 70%)
$m^7GpNHppOC_3H_3$ (**B3**): X = NH, Y = O (W = 78%)
$m^7Gp_SppOC_3H_3$ D1 (**B4**): X = O, Y = S (W = 80%)
$m^7Gp_SppSOC_3H_3$ D2 (**B5**): X = O, Y = S (W = 81%)

Rys. IV.11. Schemat syntezy 2-propargilo-fosforanowych analogów nukleotydów 7-metyloguanozynowych, modyfikowanych w łańcuchu oligofosforanowym.

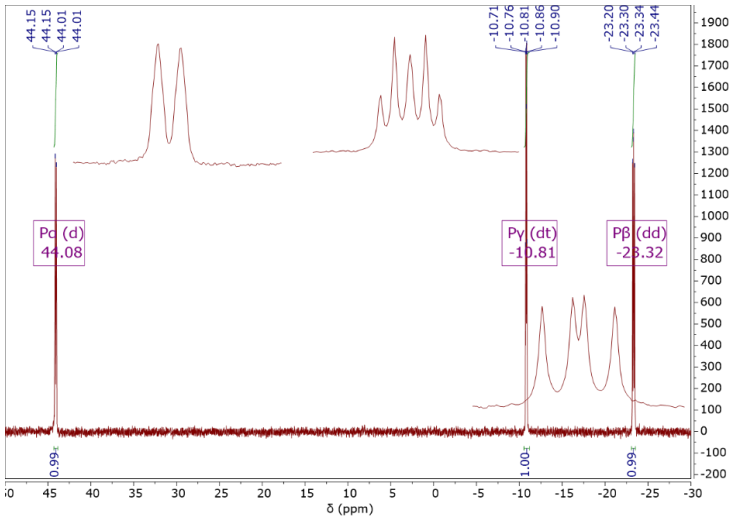
Obecność podstawnika siarkowego prowadzi do utworzenia centrum stereogenicznego na fosforze α. W reakcji sprzęgania *P*-imidazolidu 2-propargilo-fosforanu z mieszaniną izomerów m^7GpsP powstają $m^7GpsppOC_3H_3$ D1 (**B4**) oraz $m^7GpsppSOC_3H_3$ D2 (**B5**), które rozdzielono metodą RP HPLC (D1 i D2 oznaczają kolejność elucji diastereoizomeru w technice RP HPLC; Rys. IV.12). Wszystkie zsyntetyzowane związki zostały scharakteryzowane poprzez rejestrację widm HR MS oraz NMR. Przykładowe widmo NMR analogu $m^7GpsppOC_3H_3$ D1 (**B4**) przedstawiono na Rys. IV.13–14.



Rys. IV.12. Przykładowy chromatogram z reakcji otrzymywania oraz oczyszczonego $m^7GpsppOC_3H_3$ D1 (**B4**); $t_R(m^7GpsppOC_3H_3$ D1) = 12,2 min, $t_R(m^7GpsppSOC_3H_3$ D2) = 14,3 min (eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: 50% eluentu A/50% MeOH; gradient liniowy 0–15% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T).

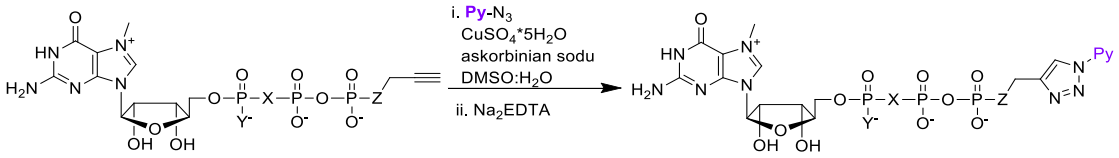


Rys. IV.13. Widmo ^1H NMR $m^7GpsppOC_3H_3$ D1 (**B4**) z przybliżonymi sygnałami rybozy.



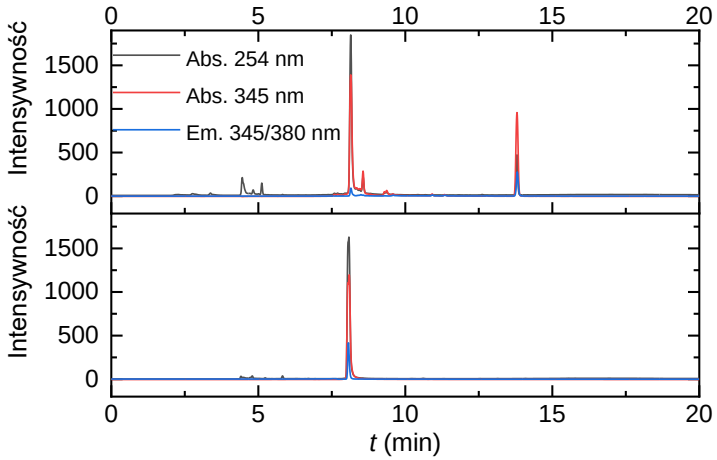
Rys. IV.14. Widmo ^{31}P NMR m^{7}GpSppOC$_3$H$_3$ D1 (**B4**).

Zsyntetyzowane prekursory nukleotydowe zostały w kolejnym etapie poddane reakcji CuAAC z pirenem, zawierającym grupę azydkową (Rys IV.15, 16). Związki znakowane pirenem zostały przeznaczone do badań powinowactwa nukleotydów do białka DcpS z wykorzystaniem pomiarów intensywności fluorescencji.



m^{7}GpCH$_2$ppC$_4$Py (**B1-1**): X = CH$_2$, Y = O, Z = C (W = 81%)
m^{7}GpCH$_2$ppOC$_3$Py (**B2-1**): X = CH$_2$, Y = O, Z = O (W = 82%)
m^{7}GpNHppOC$_3$Py (**B3-1**): X = NH, Y = O, Z = O (W = 80%)
m^{7}GpSppOC$_3$Py D1 (**B4-1**): X = O, Y = S, Z = O (88%)
m^{7}GpSppOC$_3$Py D2 (**B5-1**): X = O, Y = S, Z = O (79%)

Rys. IV.15. Schemat syntezy fluorescencyjnie znakowanych, mononukleotydowych analogów kapu, modyfikowanych w łańcuchu oligofosforanowym.

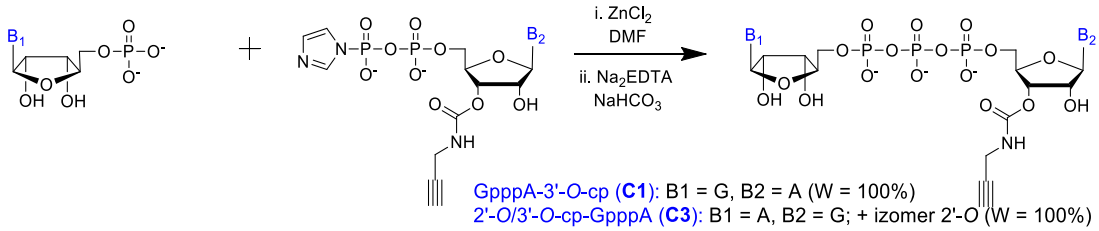


Rys. IV.16. Przykładowy chromatogram z otrzymywania oraz oczyszczonego m^{7}GpSppOC$_3$Py D1 (**B4-1**); t_R(m^{7}GpSppOC$_3$Py D1) = 8,0 min, t_R(Py-N$_3$) = 13,8 min (eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T).

Końcowym rezultatem przeprowadzonych syntez było otrzymanie zestawu małocząsteczkowych sond molekularnych (Seria B), przeznaczonych do badań wiązania z białkiem DcpS, która zawiera 5 nowych związków fluorescencyjnych.

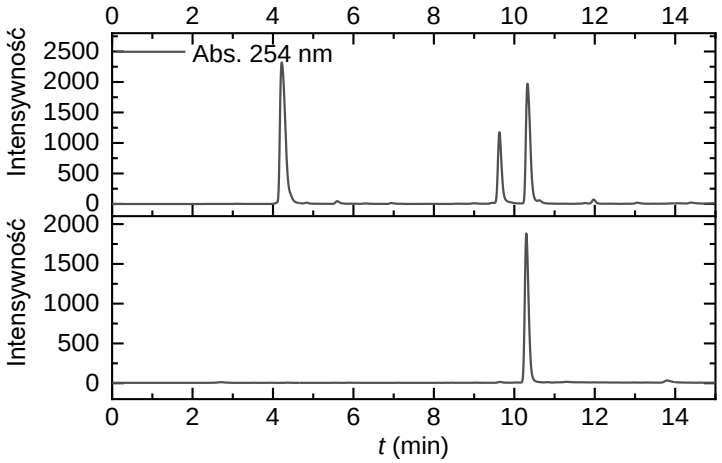
IV.3.3. Synteza analogów Gp_3A do badań białka N7–MTazy – Seria C

Mononukleotydowe analogi nukleotydów guanozynowych są słabymi substratami w reakcji enzymatycznej N7–metylacji. Dlatego przy projektowaniu serii związków C, przeznaczonej do badań N7–MTaz wykorzystano bardziej złożone struktury dinukleotydowe. Pierwszy zestaw związków został zsyntetyzowany w dwóch etapach, wychodząc z prekursora ADP modyfikowanego resztą alkinową w pozycji 3'-*O* rybozy. Monofosforan guanozyny poddano reakcji sprzęgania z *P*-imidazolidem (*N*-propargilo)-3'-trifosforanu karbamoiloadenozyny w obecności jonów Zn^{2+}, w wyniku czego otrzymano analog GpppA modyfikowany propargiloaminą (**C1**; Rys. IV.17). Bazując na modyfikacji rybozy zaprojektowano także analog GpppA modyfikowany propargiloaminą w pozycji 2'-*O*/3'-*O* guanozyny (**C3**; Rys. IV.17). Substrat guanozynowy został w tym przypadku użyty w postaci mieszaniny izomerów, ze względu na trudności w ich separacji w stosowanym układzie RP HPLC.[294] Przykładowy chromatogram otrzymywania GpppA-3'-*O*-cp oraz GpppA-2'-*O*-cp przedstawiono na Rys. IV.18.

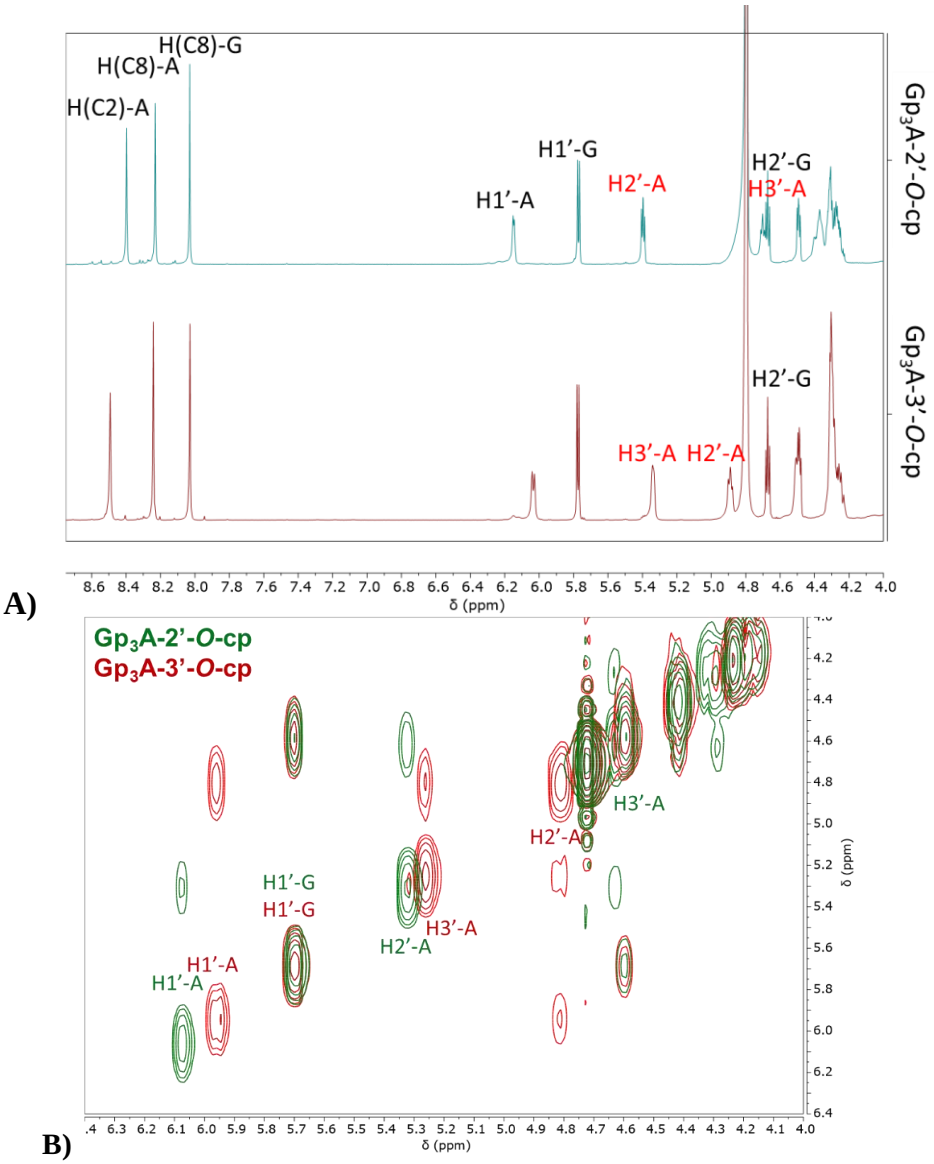


Rys. IV.17. Schemat syntezy dinukleotydów GpppA, zawierających modyfikację alkinową wprowadzoną w pozycji 2'-*O*/3'-*O* rybozy.

Izomery 2'-*O* i 3'-*O* podstawionych analogów GpppA (w rybozie adenozyny) są rozróżnialne na chromatogramie – izomer 3'-*O* ma dłuższy czas retencji t_R oraz powstaje w stosunku 3:2 do izomeru 2'-*O*. Potwierdzeniem tej obserwacji są widma ^{1}H oraz COSY ^{1}H-^{1}H NMR (Rys. IV.19). Podstawienie grupy –OH propargiloaminą skutkuje odekranowaniem protonu, znajdującego się w tej samej pozycji pierścienia rybozy, przez co zwiększa się wartość przesunięcia chemicznego δ jego sygnału. W przypadku analogu 2'-*O* przesunięcie chemiczne protonu 2' adenozyny wynosi 5,39 ppm, natomiast H3' – 4,70 ppm, podczas gdy proton H2' adenozyny izomeru 3'-*O* posiada δ = 4,89 ppm, a proton 3' 5,34 ppm (Rys. IV.19A). Przypisanie protonów na widmie 1D ^{1}H NMR zostało wykonane na podstawie dwuwymiarowego widma COSY z korelacją proton-proton (Rys. IV.19B).

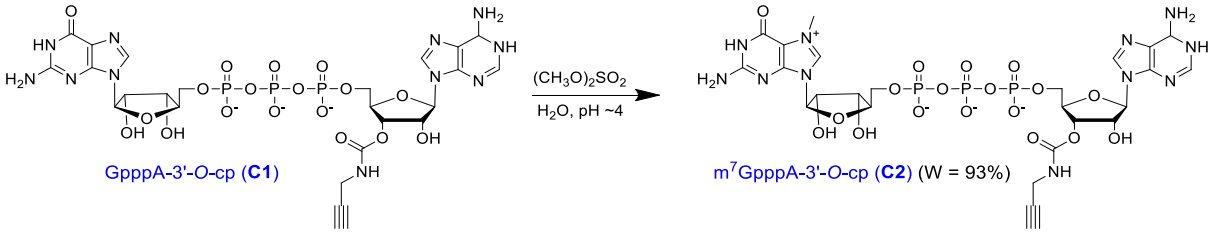


Rys. IV.18. Przykładowy chromatogram z reakcji otrzymywania oraz oczyszczonego GpppA-3'-*O*-cp (**D1**); t_R(GMP) = 4,2 min, t_R(GpppA-2'-*O*-cp) = 9,6 min, t_R(GpppA-3'-*O*-cp) = 10,3 min.



Rys. IV.19. Złożenie widm **A)** ^{1}H NMR i **B)** COSY ^{1}H-^{1}H czystych izomerów GpppA-2'-*O*-cp oraz GpppA-3'-*O*-cp.

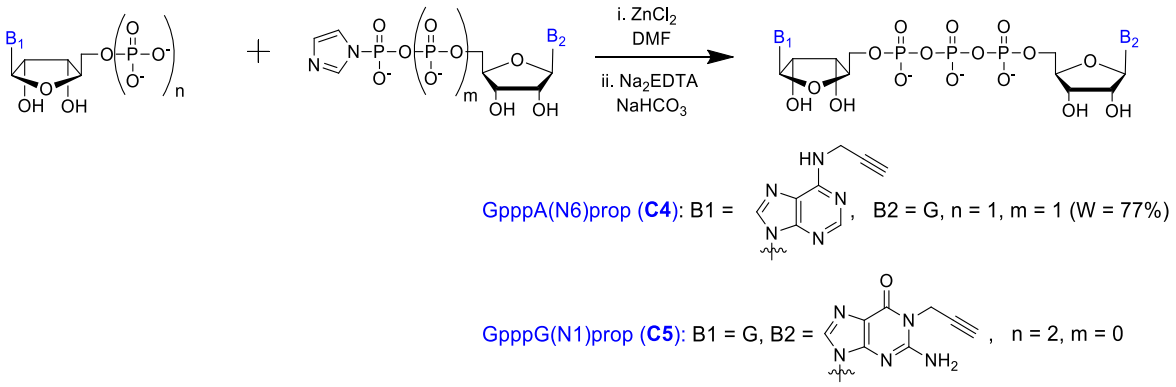
W ramach kontroli poprzez N7–metylowanie związku **C1** zsyntetyzowany został analog m^{7}GpppA-3'-*O*-cp, posiadający dodatkową metylację guanozyny w pozycji N7 (**C2**; Rys. IV.20).



Rys. IV.20. Schemat syntezy dinukleotydu m^{7}GpppA-3'-*O*-cp (**C2**).

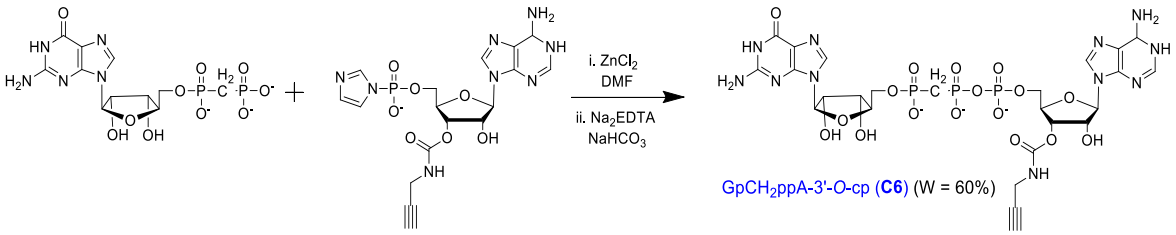
W celu przetestowania innych niż ryboza pozycji podstawienia zsyntetyzowany został także analog GpppA modyfikowany propargiloaminą w pozycji N6 adeniny w reakcji pomiędzy monofosforanem N6-propargiloadenozyny[295], a *P*-imidazolidem difosforanu guanozyny (Rys. IV.21). Aby zweryfikować wpływ drugiej zasady azotowej otrzymano także analog GpppG startując z difosforanu guanozyny i *P*-imidazolizu (N1-propargilo)-monofosforanu guanozyny

(Rys. IV.21).[296] Związek **C5** otrzymał mgr Michał Kopciał w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT i Wydziału Fizyki UW.

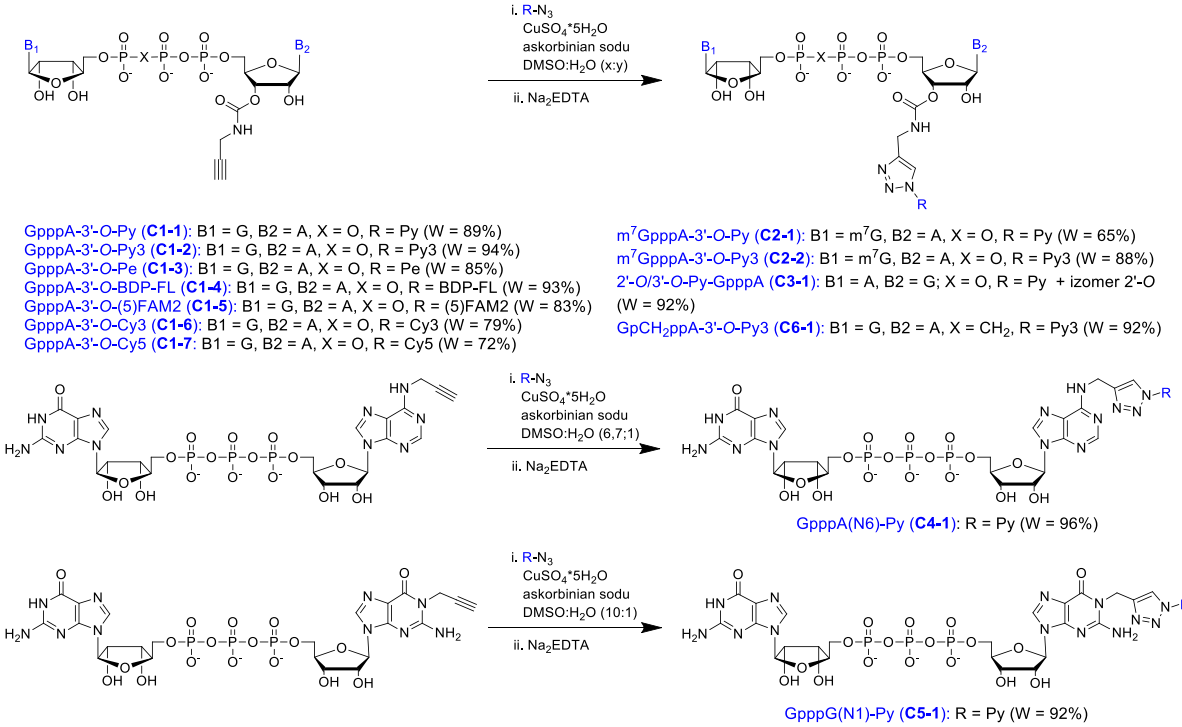


Rys. IV.21. Schemat syntezy dinukleotydów GpppA(N6)prop (**C4**) i GpppG(N1)prop (**C5**).

Ostatnim nukleotydem zawierającym grupę alkinową, zsytnetyzowanym w ramach serii C był GpppA-3'-*O*-cp (**C1**) modyfikowany grupą metylenową w pozycji β–γ łańcucha fosforanowego. Reakcję przeprowadzono pomiędzy β–γ-metylenobisfosfonianem guanozyny i *P*-imidazolidem (*N*-propargilo)-3'-monofosforanu karbamoiloadenozyny (Rys. IV.22).

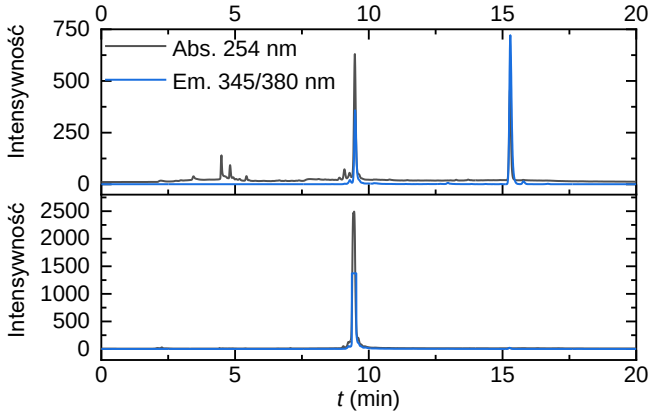


Rys. IV.22. Schemat syntezy analogu związku **C1**, zawierającego modyfikację β–γ metylenobisfosfonianową (**C6**).



Rys. IV.23. Schemat syntezy analogów dinukleotydów znakowanych w reakcji CuAAC (Seria C).

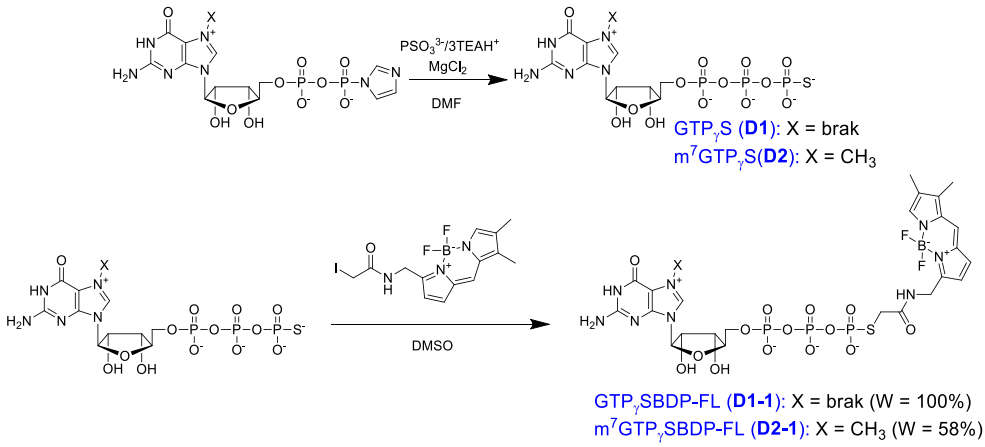
Wszystkie fluorescencyjne nukleotydy zostały zsyntetyzowane w reakcji CuAAC pomiędzy otrzymanymi nukleotydami z grupą alkinową, a znacznikami fluorescencyjnymi zawierającymi ugrupowanie azydkowe (Rys. IV.23). Ostateczne związki wyizolowano metodą RP HPLC w postaci soli amonowych. Przykładowy profil otrzymywania oraz oczyszczonego analogu GpppA-3'-*O*-Py3 przedstawiono na Rys. IV.24. Korzystając z podejścia CuAAC otrzymano 13 nowych nukleotydów fluorescencyjnych, które zostały przetestowane, jako substraty katalizowanej enzymatycznie reakcji N7–metylacji.



Rys. IV.24. Przykładowy chromatogram z reakcji otrzymywania oraz oczyszczonego GpppA-3'-*O*-Py3 (**C1-2**); t_R(GpppA-3'-*O*-Py3) = 9,5 min, t_R(Py3-N_3) = 15,3 min.

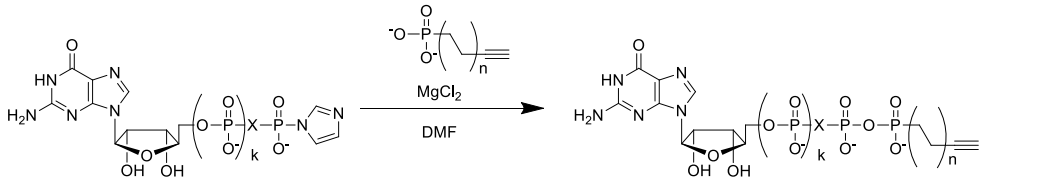
IV.3.4. Synteza analogów GTP do badań białka TG2 – Seria D

Mononukleotydowe sondy guanozynowe okazały się być nieodpowiednimi substratami dla N7–MTazy. Jednak z powodzeniem wykorzystano je w celu opracowania metody monitorowania wiązania ligandów z białkiem transglutaminazą II (TG2), metabolizującą G–nukleotydy (badania prowadzone we współpracy z grupą dr Markusa Pietscha z Uniwersytetu w Kolonii). Zsyntetyzowano analogi GTP oraz m^7GTP znakowane BDP-FL poprzez terminalną resztę tiofosforanową. W literaturze istnieje przykład wykorzystania GTP znakowanego BDP-FL do badania miejsca wiążącego TG2.[297] W pierwszym etapie syntezy przeprowadzono reakcję sprzęgania tiofosforanu trietyloamoniowego z *P*-imidazolidem GDP lub m^7GDP (Rys. IV.25). Następnie otrzymane w ten sposób analogi GTP$_\gamma$S (**D1**) i m^7 GTP$_\gamma$S (**D2**) poddano reakcji *S*-alkilowania z pochodną jodoacetylową barwnika BDP-FL (Rys. IV.25). Otrzymane fluorescencyjne nukleotydy GTP$_\gamma$SBDP-FL (**D1-1**) i m^7GTP$_\gamma$SBDP-FL (**D2-1**) scharakteryzowano spektroskopowo oraz w oddziaływaniach z białkiem TG2 (Rozdział IV.8).



Rys. IV.25. Schemat syntezy analogów GTP$_\gamma$S i m^7GTP$_\gamma$S znakowanych BDP-FL w reakcji *S*-alkilowania.

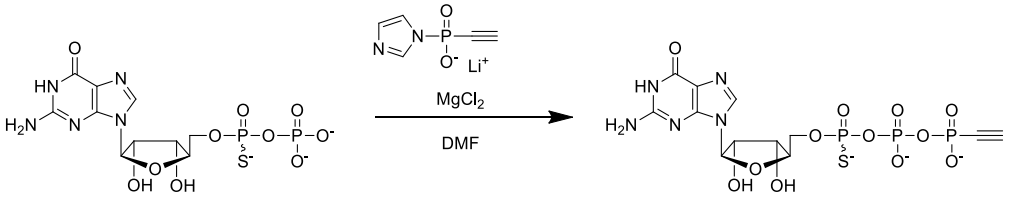
Ze względu na niekorzystne właściwości fluorescencyjne GTP$_\gamma$SBDP-FL (**D1-1**) w kolejnych syntezach do znakowania wykorzystano pochodne karboksyfluoresceiny. Optymalizację struktury sondy przeprowadzono poprzez otrzymanie serii G-nukleotydów, różniących się terminalnym *C*-fosfonianem (3-butynylo-*C*-fosfonian lub etynylo-*C*-fosfonian), liczbą grup fosforanowych (2 do 3), obecnością modyfikacji chemicznych łańcucha fosforanowego (-CH_2-, -S^-) oraz długością linkera, którym zmodyfikowano karboksyfluoresceinę (dwu-, cztero- lub sześciowęglowy). W pierwszym etapie syntezy przeprowadzono reakcję sprzęgania odpowiedniego prekursora nukleotydowego z 3-butynylo-*C*-fosfonianem lub etynylo-*C*-fosfonianem (Rys. IV.26). Związki **D3**–**D6** otrzymała w ramach pracy doktorskiej dr Sylwia Ciechanowicz (Walczak) w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW.



Gp$_2$C$_2$H (**D3**): X = O, k = 0, n = 0
Gp$_2$C$_4$H$_5$ (**D4**): X = O, k = 0, n = 1
Gp$_3$C$_2$H (**D5**): X = O, k = 1, n = 0
Gp$_3$C$_4$H$_5$ (**D6**): X = O, k = 1, n = 1
GpCH$_2$ppC$_2$H (**D7**): X = CH$_2$, k = 1, n = 0 (W = 90%)

Rys. IV.26. Schemat syntezy 3-butynylo- i etynylo-*C*-fosfonianowych analogów nukleotydów guanozynowych.

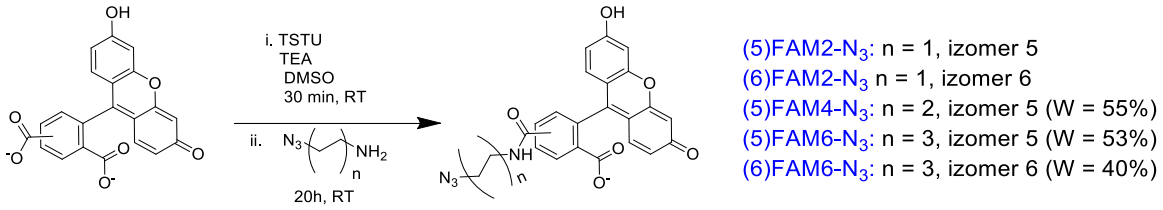
W przypadku syntezy stereoizomerów *S* i *R* γ-*C* -(etynylo) α-tiotrifosforanu guanozyny (**D8** i **D9**) podobnie jak dla m^{7}GpSppOC$_3$H$_3$ (**B4** i **B5**) otrzymanie *P*-imidazolidu GpSp jest utrudnione. W związku z tym reakcję sprzęgania przeprowadzono pomiędzy *P*-imidazolidem etynylo-*C*-fosfonianu oraz mieszaniną izomerów GpSp (Rys. IV.27). Otrzymano w ten sposób mieszaninę izomerów GpSppC$_2$H (D1: *S*–**D8** i D2: *R*–**D9**), która została rozdzielona z użyciem metody RP HPLC.



GpSppC$_2$H D1 (**D8**) (W = 26%)
GpSppC$_2$H D2 (**D9**) (W = 58%)

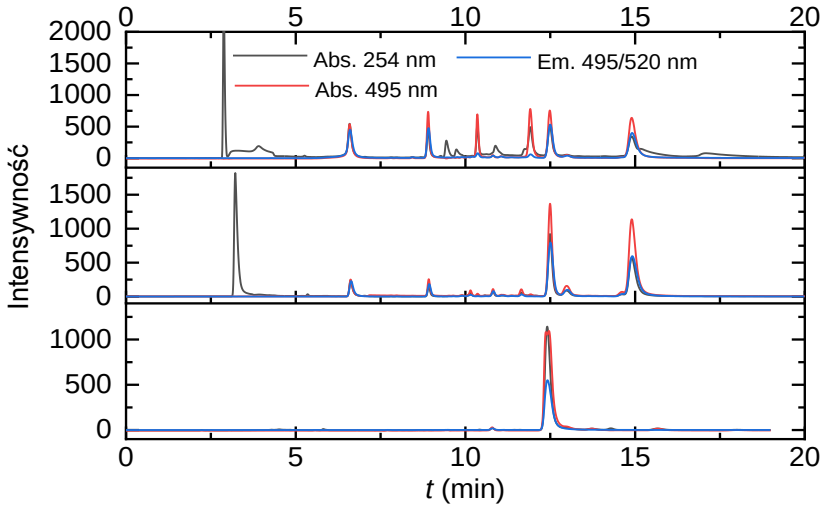
Rys. IV.27. Schemat syntezy γ-*C*-etynylo-α-*S*-tiotrifosforanu guanozyny (GpSppC$_2$H D1, **D8**) oraz γ-*C*-etynylo-α-*R*-tiotrifosforanu guanozyny (GpSppC$_2$H D2, **D9**).

Znaczniki fluoresceinowe stosowane do otrzymania serii D zostały zsyntetyzowane w reakcji (5/6)-karboksyfluoresceiny z linkerem o wybranej długości łańcucha węglowego: 1-azydo-2-etyloaminą, 1-azydo-4-butyloaminą i 1-azydo-6-heksyloaminą. Grupa karboksylowa w pozycji 5 i 6 pierścienia karboksyfluoresceiny w pierwszej kolejności była aktywowana przez TSTU z utworzeniem estru NHS. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano odpowiedni linker azydo-aminowy w wyniku, czego tworzy się wiązanie amidowe pomiędzy grupą karboksylową karboksyfluoresceiny i aminową linkera (Rys. IV.28). Barwniki (5)FAM2-N$_3$ i (6)FAM2-N$_3$ otrzymał mgr Przemysław Wanat w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT i Wydziału Fizyki UW.



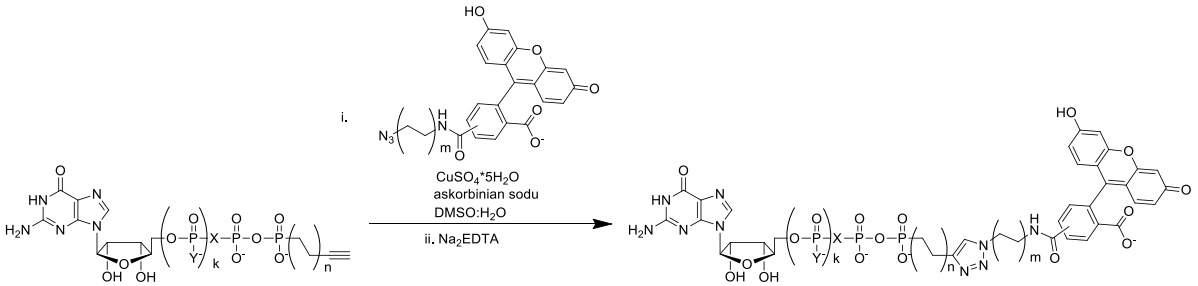
Rys. IV.28. Schemat syntezy pochodnych karboksyfluoresceiny, modyfikowanych linkerem zakończonym grupą azydkową.

Po zakończeniu reakcji produkty oczyszczano w dwóch etapach. Pierwsze oczyszczanie przeprowadzono na preparatywnych płytkach TLC (układ faz normalnych) w celu usunięcia resztek substratu. Następnie izomery 5 i 6 rozdzielano metodą RP HPLC. Przykładowy chromatogram z syntezy oraz po pierwszym i drugim oczyszczaniu amidu 6-N-(4-azydobutylo)-fluoresceiny ((6)FAM4-N_3) przedstawiono na Rys. IV. 29.



Rys. IV.29. Przykładowy chromatogram z reakcji otrzymywania, po wstępnym oczyszczaniu oraz oczyszczonego (6)FAM4-N_3; t_R((6)FAM4-N_3) = 12,5 min, t_R((5)FAM-N_3) = 15 min.

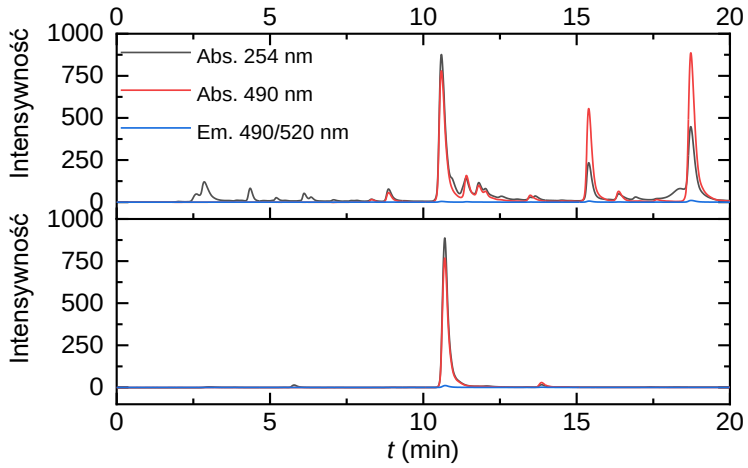
Po zsyntetyzowaniu modyfikowanych nukleotydów oraz znaczników fluorescencyjnych w reakcji CuAAC otrzymano serię fluorescencyjnych sond molekularnych (seria D) przeznaczonych do badań transglutaminazy II (Rys. IV.30).



Gp_2C_2(5)FAM2 (**D3-1**): Y = O, X = O, k = 0, n = 0, m = 1 (W = 77%)
Gp_2C_4(5)FAM2 (**D4-1**): Y = O, X = O, k = 0, n = 1, m = 1 (W = 69%)
Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**): Y = O, X = O, k = 1, n = 0, m = 1 (W = 87%)
Gp_3C_2(5)FAM4 (**D5-2**): Y = O, X = O, k = 1, n = 0, m = 2 (W = 91%)
Gp_3C_2(5)FAM6 (**D5-3**): Y = O, X = O, k = 1, n = 0, m = 3 (W = 51%)
Gp_3C_2(6)FAM6 (**D5-4**): Y = O, X = O, k = 1, n = 0, m = 3 (W = 40%)
Gp_3C_4(5)FAM2 (**D6-1**): Y = O, X = O, k = 1, n = 1, m = 1 (W = 98%)
$GpCH_2ppC_2$(5)FAM2 (**D7-1**): Y = O, X = CH_2, k = 1, n = 0, m = 1 (W = 62%)
Gp_SppC_2(5)FAM2 D1 (**D8-1**): Y = S, X = O, k = 1, n = 0, m = 1 (W = 41%)
Gp_SppC_2(5)FAM2 D2 (**D9-1**): Y = S, X = O, k = 1, n = 0, m = 1 (W = 68%)

Rys. IV.30. Schemat syntezy analogów nukleotydów guanozynowych, znakowanych karboksyfluoresceiną w reakcji CuAAC.

Przykładowy chromatogram z syntezy analogu Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**) oraz po oczyszczeniu, zaprezentowano na Rys. IV.31.



Rys. IV.31. Przykładowy chromatogram z reakcji otrzymywania oraz oczyszczonego Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**); $t_R(Gp_3C_2(5)FAM2)$ = 10,6 min, $t_R((5)FAM2\text{-}N_3)$ = 18,8 min.

W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymano 11 analogów G-nukleotydów oraz jeden m^7G, które wykorzystano do opracowania metody wysokoprzepustowej, przeznaczonej do badania wiązania ligandów z transglutaminazą II. Badania fluorescencyjne zostały przeprowadzone w grupie doktora Markusa Pietscha na Uniwersytecie w Kolonii, w trakcie wyjazdu badawczego w ramach programu Erasmus+.

IV.4. Metoda fluorescencyjna do badań tworzenia kompleksu nukleotyd-eIF4E (PyFLINT-B)

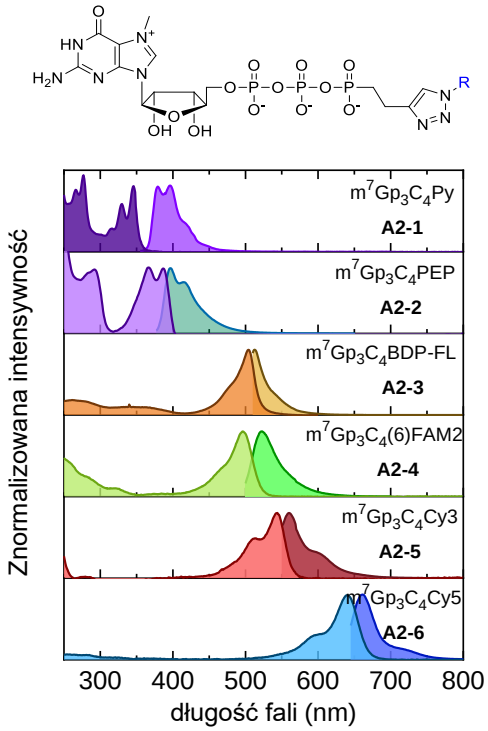
Jednym z projektów rozwijanych w ramach pracy doktorskiej było opracowanie wysokoprzepustowej, fluorescencyjnej metody, przeznaczonej do charakterystyki kompleksu kap-eIF4E (PyFLINT-B – ang. *pyrene-based fluorescence intensity binding assay*). W tym celu zsyntetyzowano bibliotekę analogów kapu, znakowanych poprzez terminalną resztę *C*-fosfonianową różnymi znacznikami fluorescencyjnymi. Struktura sondy była dalej optymalizowana, poprzez zwiększenie ilości grup fosforanowych celem zwiększenia powinowactwa do białka. Na podstawie wyznaczonych wartości K_D wytypowano najlepszą sondę oraz wykorzystano ją do zaprojektowania metody fluorescencyjnej. Walidacji metody dokonano poprzez wyznaczenie K_D serii nukleotydów o znanym powinowactwie do eIF4E i korelację z wartościami literaturowymi. Dla najlepszej sondy wyznaczono także parametr *z*, który określa czy metoda spełnia warunki wysokoprzepustowości. Ostatecznie opracowana metoda została wykorzystana do charakterystyki biblioteki analogów kapu, modyfikowanych pierścieniem triazolowym.

IV.4.1. Charakterystyka spektroskopowa – Seria A

Analogi kapu zsyntetyzowane w Serii A zostały scharakteryzowane spektroskopowo poprzez pomiar widm absorpcji, wzbudzania oraz emisji fluorescencji. Widma zarejestrowano w stężeniu związku 1 µM w temperaturze 30°C, w buforze przeznaczonym do badań białka eIF4E o składzie: 50 mM HEPES–KOH, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, pH 7,2. Przetestowano różne znaczniki fluorescencyjne, dobrane w ten sposób, aby ich emisja pokrywała jak najszerszy zakres światła widzialnego i bliskiego UV: piren (Py), fenyloetynylopiren (PEP), pochodną

BODIPY (BDP-FL), 6 karboksyfluoresceinę ((6)FAM2), cyjaninę 3 (Cy3) oraz cyjaninę 5 (Cy5). Zaobserwowano, że położenie maksimów absorpcji oraz emisji było zbliżone do wartości odpowiadającym izolowanym znacznikom (Rys. IV.32). W przypadku pirenu w badanym stężeniu (< 10 μM) obserwowano jedynie pasmo emisji monomerowej.

Kolejnym etapem charakterystyki sond fluorescencyjnych było wyznaczenie wartości ich wydajności kwantowych (QY, ang. *quantum yield*). Eksperyment przeprowadzono według procedury literaturowej[298] tzw. metodą porównawczą. Polega ona na wykonaniu pomiaru widm absorpcji oraz emisji badanego związku oraz wzorca, o znanej dokładnej wartości wydajności kwantowej. Widma absorpcji i emisji sond zarejestrowano w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,0 w temperaturze 25°C. Do wyznaczenia QY analogów pirenowych stosowanym wzorcem był roztwór siarczanu chininy (QS) w 0,1 mM H_2SO_4. Wzorcem wykorzystanym do charakterystyki analogów BDP-FL i (6)FAM2 był roztwór fluoresceiny w 0,1 M NaOH. Dla związków znakowanych Cy3 i Cy5 wzorcem był roztwór odpowiednio cyjaniny 3 i cyjaniny 5 w etanolu. Wyznaczone wartości wydajności kwantowych zamieszczono w tabeli IV.1. Sonda znakowana pirenem $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) miała najniższą wartość QY, wynoszącą 2,0%, spośród analogów m^7Gp_3 zawierających inne znaczniki fluorescencyjne. Ponadto porównując wartość tą do QY = 36,0 % dla 3-butynylo-*C*-fosfonianu znakowanego pirenem pC_4Py (**A5**) można wywnioskować, że w przypadku nukleotydu obecne są oddziaływania wygaszające.



Rys. IV.32. Widma absorpcji i emisji fluorescencji (wzbudzanie w maksimum absorpcji) fluorescencyjnie znakowanych analogów m^7Gp_3. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

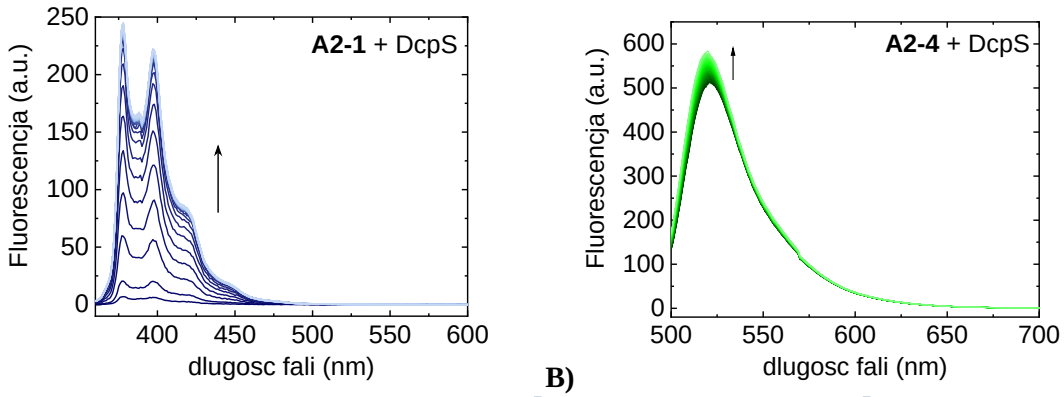
Tabela IV.1. Właściwości spektroskopowe fluorescencyjnie znakowanych analogów m^7GTP. Do każdej z sond zaproponowano odpowiedni typ eksperymentu badania wiązania kap–białko w oparciu o wartość Q_b. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	Absorpcja λ_{max} (nm)	Emisja λ_{max} (nm)	QY (%)	Q_b	Q_c	Typ eksprymentu
$m^7GTP_\gamma S$-AcPy[177]	282, 369	388, 410, 475	b.d.	b.d.[a]	0,5	FLINT
$m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**)	330, 345	378, 398	2,0 ± 0,1 (QS)	8,1	34,6	FLINT
$m^7Gp_3C_4PEP$ (**A2-2**)	367, 387	397, 415	18,3 ± 0,7 (QS)	1,1	1,4	FP, MST
$m^7Gp_3C_4$BDP-FL (**A2-3**)	504	512	49,3 ± 1,3 (FAM)	0,6	1,5	FP, MST
$m^7Gp_3C_4$(6)FAM (**A2-4**)	496	523	67,3 ± 8,6 (FAM)	0,9	1,1	FP, MST

$m^7Gp_3C_4Cy3$ (**A2-5**)	544	560	24,5 ± 0,2 (Cy3)	1,7	0,9	FP, MST
$m^7Gp_3C_4Cy5$ (**A2-6**)	640	660	10,8 ± 0,5 (Cy5)	1,0	0,9	FP, MST
pC_4Py (**A5**)	327, 343	377, 397	36,0 ± 1,2 (QS)	b.d.	b.d.	brak

[a] Wartość nie mogła być wyznaczona ze względu na obecność niespecyficznych oddziaływań acetylopiren-białko.

W celu wyselekcjonowania najlepszej sondy działającej w oparciu o proste pomiary intensywności fluorescencji (FLINT) zbadano jak zmieniają się właściwości fluorescencyjne na skutek związania z białkiem eIF4E, bądź hydrolizy enzymatycznej katalizowanej przez enzym DcpS. W pierwszej kolejności fluorescencyjnie znakowane analogi m^7Gp_3 poddano całkowitej hydrolizie przez DcpS. W każdym z eksperymentów rejestrowano widma emisji w stałych odstępach czasowych aż do zaniku zmian (Rys. IV. 33). Zmiany intensywności fluorescencji sondy w trakcie degradacji wyrażono ilościowo w postaci współczynnika wygaszania Q_c (Q – ang. *quenching*; c – ang. *cleavage*), obliczonego, jako stosunek intensywności fluorescencji po całkowitej hydrolizie (I_∞) do intensywności przed procesem (I_0). Wartości Q_c opisują rodzaj oddziaływań pomiędzy 7-metyloguanozyną, a znacznikiem fluorescencyjnym: $Q_c > 1$ (sonda „turn-on"), $Q_c <$ (sonda „turn-off") i $Q_c \sim 1$ (sonda inna niż FLINT). Wyznaczone wartości Q_c zostały przedstawione w tabeli IV.1. Jedynie analog znakowany pirenem **A2-1** wykazywał znaczącą zmianę emisji pod wpływem hydrolizy ($Q_c \sim 35$), podczas gdy Q_c sond **A2-2–6** były zbliżone do 1. Analog m^7GTP znakowany acetylopirenem ($m^7GTP_\gamma S$-AcPy), charakteryzowany w poprzednich badaniach,[177] posiadał $Q_c \sim 0{,}5$ co wystarczyło aby umożliwić monitorowanie degradacji przez DcpS, jednak był to znacznie mniej czuły układ w porównaniu do $m^7Gp_3C_4Py$ (**A4-1**). Zatem znakowany pirenem $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) jest sondą fluorescencyjną, odpowiednią do rozwoju czułej metody FLINT. Pozostałe sondy, znakowane innymi niż piren znacznikami, mogą nadal być eksplorowane w badaniach powinowactwa nukleotydów do eIF4E, jednak z zastosowaniem innych technik pomiarowych, takich jak polaryzacja fluorescencji (FP) i mikroskalowa termoforeza (MST).

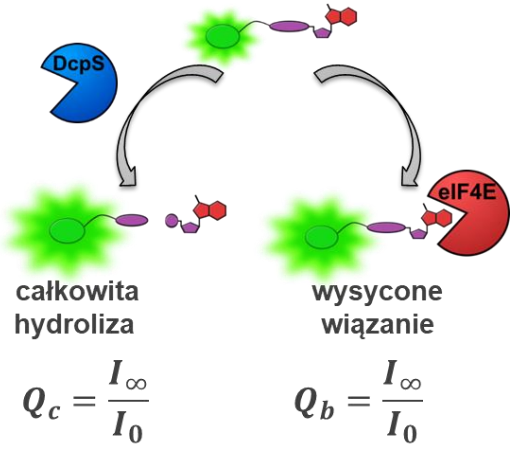


Rys. IV.33. Widma emisji fluorescencji **A)** $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) i **B)** $m^7Gp_3C_4$(6)FAM2 (**A2-4**) zarejestrowane w trakcie inkubacji z enzymem DcpS. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

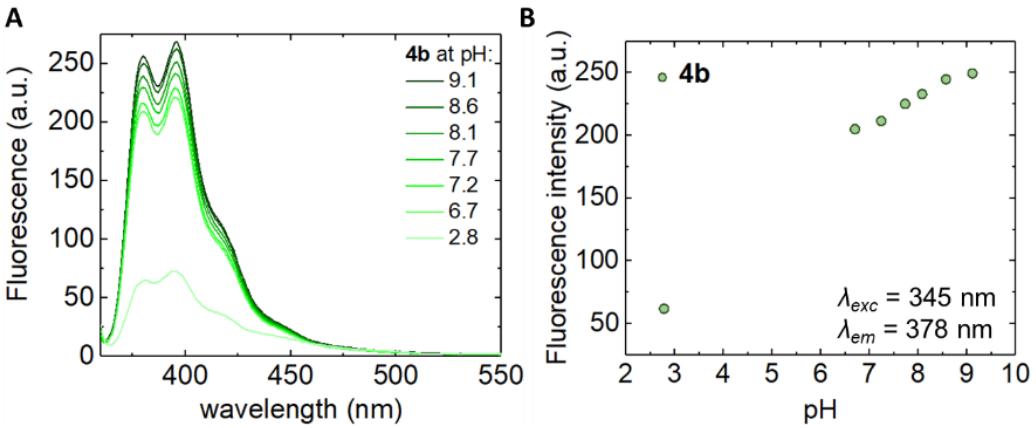
Zmiana intensywności fluorescencji na skutek degradacji sondy różni się od zmiany powstałej na skutek jej związania przez białko. Dlatego też w kolejnym eksperymencie wyznaczono współczynnik wygaszania analogów m^7GTP (**A2-1–6**) z białkiem eIF4E Q_b (Q – ang. *quenching*; b – ang. *binding*). Sondy **A2-1–6** inkubowano z rosnącymi stężeniami białka eIF4E aż do wysycenia rejestrowanego sygnału fluorescencyjnego. Także w tym przypadku wartość Q_b analogu pirenowego **A2-1** była wyższa w porównaniu do pozostałych znakowanych

nukleotydów jednak niższa od swojego Q_c czterokrotnie (8 vs. 35, Tabela IV.1). Efektem przeprowadzonych badań była selekcja analogu kapu znakowanego pirenem $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) do dalszych prac nad zaprojektowaniem metody przeznaczonej do badań degradacji lub wiązania struktury kapu przez białko (Rys. IV.34).

Ostatnim etapem charakterystyki nukleotydów z Serii A było zbadanie wpływu pH na emisję związku **A2-1** w celu zweryfikowania jego użyteczności, jako sondy fluorescencyjnej. Właściwości emisyjne sondy **A2-1** w sposób nieznaczny ulegały zmianie pod wpływem zmian pH w zakresie 7 do 9, będącym optymalnym pH do badań większości białek oddziałujących z kapem (Rys. IV.35). Oznacza to, że proces protonacji/deprotonacji 7-metyloguanozyny (pKa ~ 7,3) nie wpływa znacząco na emisję pirenu.



Rys. IV.34. Schematyczne przedstawienie zasady działania sond FLINT, przeznaczonych do monitorowania degradacji kapu katalizowanej przez enzym DcpS, bądź wiązania z białkiem eIF4E. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]



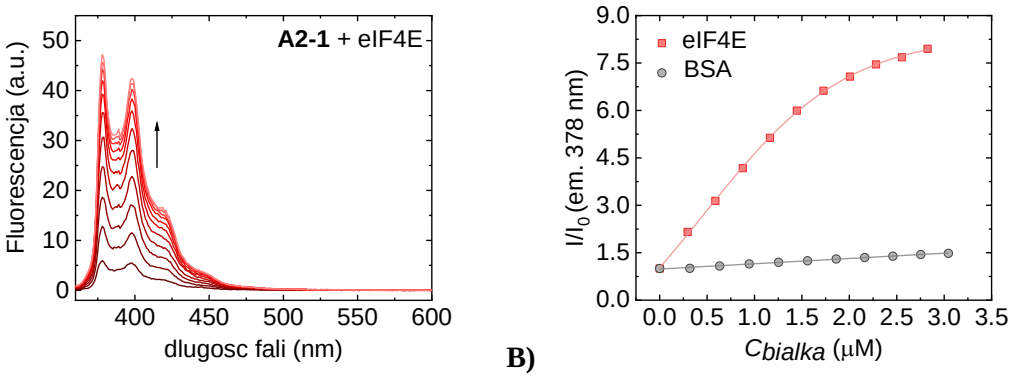
Rys. IV.35. Zmiany intensywności fluorescencji $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) w roztworach o różnym pH. **A)** widma emisji 2,5µM roztworów **A2-1** w 50 mM Tris–HCl o różnym pH w 30°C; **B)** intensywność fluorescencji w 378 nm w zależności od pH buforu. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

IV.4.2. Optymalizacja struktury sondy – wyznaczanie K_D kompleksu nukleotyd-eIF4E

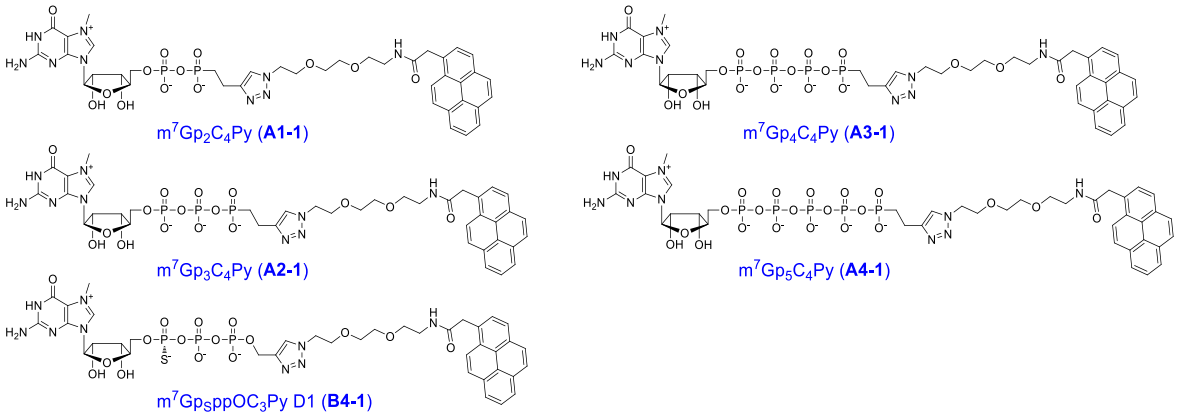
Specyficzność oddziaływania związku **A2-1** z białkiem eIF4E została zweryfikowanie poprzez wykonanie eksperymentu miareczkowania białkiem BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*). Wraz ze wzrostem stężenia BSA intensywność fluorescencji analogu **A2-1** zmieniała się w nieznaczny sposób (Rys. IV.36), co wskazuje na specyficzność wiązania **A2-1**–eIF4E.

W kolejnym etapie badań skupiono się na zoptymalizowaniu struktury sondy, w celu poprawy jej oddziaływania z białkiem eIF4E. Kompleks kap-eIF4E jest stabilizowany przez zarówno oddziaływania hydrofobowe, jak i elektrostatyczne. 7-metyloguanozyna jest rozpoznawana głównie przez dwie reszty tryptofanu, które formują tzw. kanapkowy kompleks warstwowy (ang. *sandwich stacking complex*) z zasadą azotową, podczas gdy łańcuch

oligofosforanowy tworzy mostki solne i wiązania wodorowe (bezpośrednie lub pośrednie z udziałem wody) z łańcuchami bocznymi lizyn i arginin w miejscu wiążącym białka. Zgodnie z literaturą, zwiększanie liczby grup fosforanowych prowadzi do zwiększenia powinowactwa kapu do eIF4E.[86, 115] Z tego względu optymalizując strukturę sondy skupiono się na zwiększeniu liczby grup fosforanowych zaczynając od dwóch i kończąc na pięciu. Zbadano także jeden związek zsyntetyzowany w ramach serii B, zawierający modyfikację α-tiofosforanową (**B4-1**), która również zwiększa powinowactwo kapu do białka eIF4E (w szczególności diastereoizomer D1).[174, 300] Struktury badanych nukleotydów zaprezentowano na Rys. IV. 37.



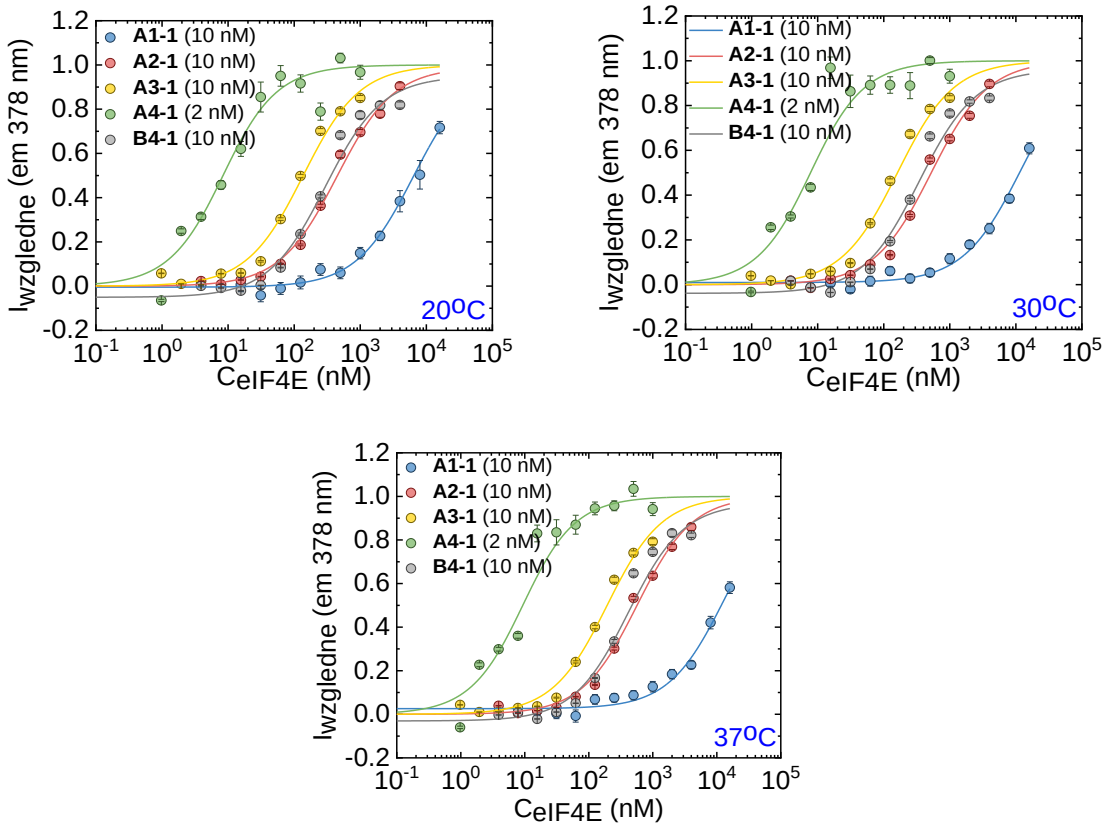
Rys. IV.36. Widma emisji fluorescencji $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) zarejestrowane w trakcie miareczkowania białkiem eIF4E; **B)** Zmiany intensywności fluorescencji sondy **A2-1** zarejestrowane w trakcie miareczkowania białkami eIF4E i BSA. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]



Rys. IV.37. Struktury sond zastosowanych do badań białka eIF4E.

Wszystkie związki przetestowano w eksperymencie monitorowania ich bezpośredniego wiązania z eIF4E w celu wyznaczenia stałych dysocjacji (K_D). Wartości K_D wyznaczono poprzez miareczkowanie stałego stężenia badanego związku znakowanego pirenem rosnącymi stężeniami eIF4E (fluorescencja rośnie). Stężenia wynosiły 10 nM dla sond **A1-1**, **A2-1**, **A3-1** i **B4-1** oraz 2 nM dla sondy **A4-1** ze względu na przypuszczalnie najwyższe powinowactwo (stężenie związku powinno być niższe od K_D). Do zmian intensywności fluorescencji poszczególnych sond w zależności od stężenia białka dopasowano krzywą wiązania bezpośredniego (Rys. IV.38). Eksperymenty wykonano w trzech temperaturach: 20°C, 30°C i 37°C. Wyznaczone wartości stałych K_D zamieszczono w tabeli IV.2. Najniższą stałą dysocjacji (największe powinowactwo do białka) miała sonda pentafosforanowa $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**; K_D = 7,4 ± 1,5 nM), a najwyższą sonda difosforanowa $m^7Gp_2C_4Py$ (**A1-1**; K_D = 6400 ± 1000 nM), co jest zgodne z badaniami literaturowymi dla związków nieznakowanych (K_{AS} (m^7Gp_2) = 28,9 ± 1,5 μM^{-1}; K_{AS} (m^7Gp_5) = 1625 ± 195 μM^{-1}).[115] Wprowadzenie modyfikacji siarką w pozycji α

spowodowało obniżenie stałej dysocjacji związki $m^7Gp_SppOC_3Py$ D1 (**B4-1**; K_D = 290 ± 60 nM) w porównaniu do niemodyfikowanego analogu trifosforanowego $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**; K_D = 440 ± 60 nM), jednak wciąż najwyższe powinowactwo do eIF4E miał analog $m^7Gp_5C_4Py$.



Rys. IV.38. Krzywe wiązania analogów kapu znakowanych pirenem **A1-1**, **A2-1**, **A3-1**, **A4-1** i **B4-1** z białkiem eIF4E. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD. Obliczone wartości K_D w trzech temperaturach 20, 30 i 37°C zaprezentowano w tabeli IV.2. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

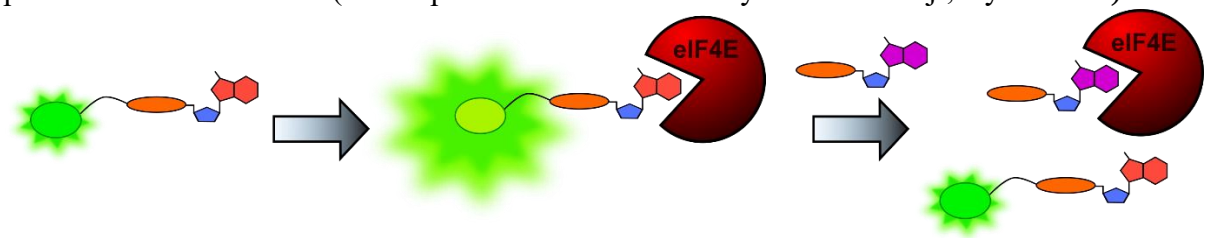
Tabela IV.2. Wyznaczone wartości K_D sond **A1-1**, **A2-1**, **A3-1**, **A4-1** i **B4-1** do białka eIF4E. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	K_D (μM)		
	20°C	30°C	37°C
$m^7Gp_2C_4Py$ (**A1-1**)	6,4 ± 1,0	11,9 ± 3,8	13,0 ± 4,9
$m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**)	0,44 ± 0,06	0,52 ± 0,09	0,56 ± 0,11
$m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**)	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,04
$m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**)	$(7,4 \pm 1,5)\cdot10^{-3}$	$(6,8 \pm 1,2)\cdot10^{-3}$	$(8,2 \pm 1,5)\cdot10^{-3}$
$m^7Gp_SppOC_3Py$ D1 (**B4-1**)	0,29 ± 0,06	0,34 ± 0,07	0,41 ± 0,09

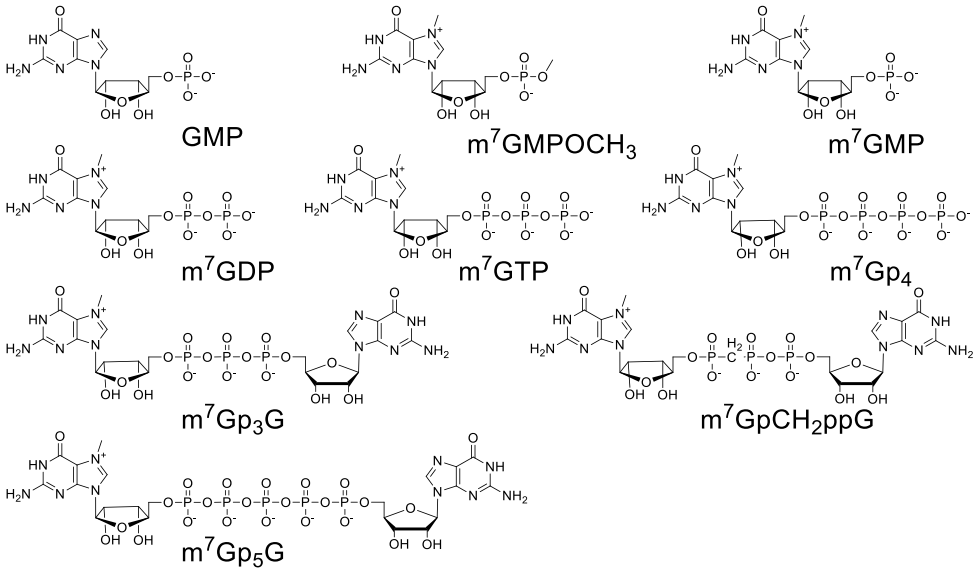
IV.4.3. Wyznaczanie K_D serii niefluoryzujących nukleotydów

Analogi kapu znakowane pirenem **A2-1**, **A3-1** i **A4-1** wykorzystano w eksperymencie kompetycyjnym (Rys. IV.39) do wyznaczenia stałych dysocjacji ośmiu wybranych ligandów eIF4E, o znanych wartościach K_D w zakresie od nM do μM: $m^7GMPOCH_3$, m^7GMP, m^7GpCH_2ppG, m^7Gp_3G, m^7GDP, m^7GTP, m^7Gp_5G i m^7Gp_4 oraz GMP, jako kontroli negatywnej (Rys. IV.40). Stałe K_D wyznaczono w eksperymentach wiązania kompetycyjnego, w

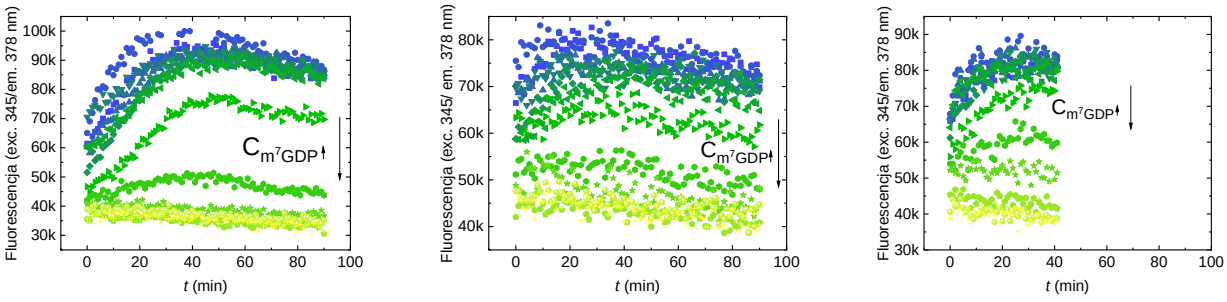
zoptymalizowanych warunkach: 75 nM **A2-1**/400 nM eIF4E, 10 nM **A3-1**/200 nM eIF4E oraz 10 nM **A4-1**/75 nM eIF4E. Stężenia białka dobrano w ten sposób, aby obserwowany sygnał fluorescencji odpowiadał ~80% maksymalnego. Rejestrowana intensywność fluorescencji maleje wraz ze wzrostem stężenia badanego liganda. Każda z sond wymaga odpowiedniego czasu inkubacji z eIF4E i ligandem do osiągnięcia stanu równowagi, który jest zależny od jej powinowactwa do białka (niższe powinowactwo – dłuższy czas inkubacji; Rys. IV. 41).



Rys. IV.39. Schemat działania metody PyFLINT-B dla białka eIF4E.

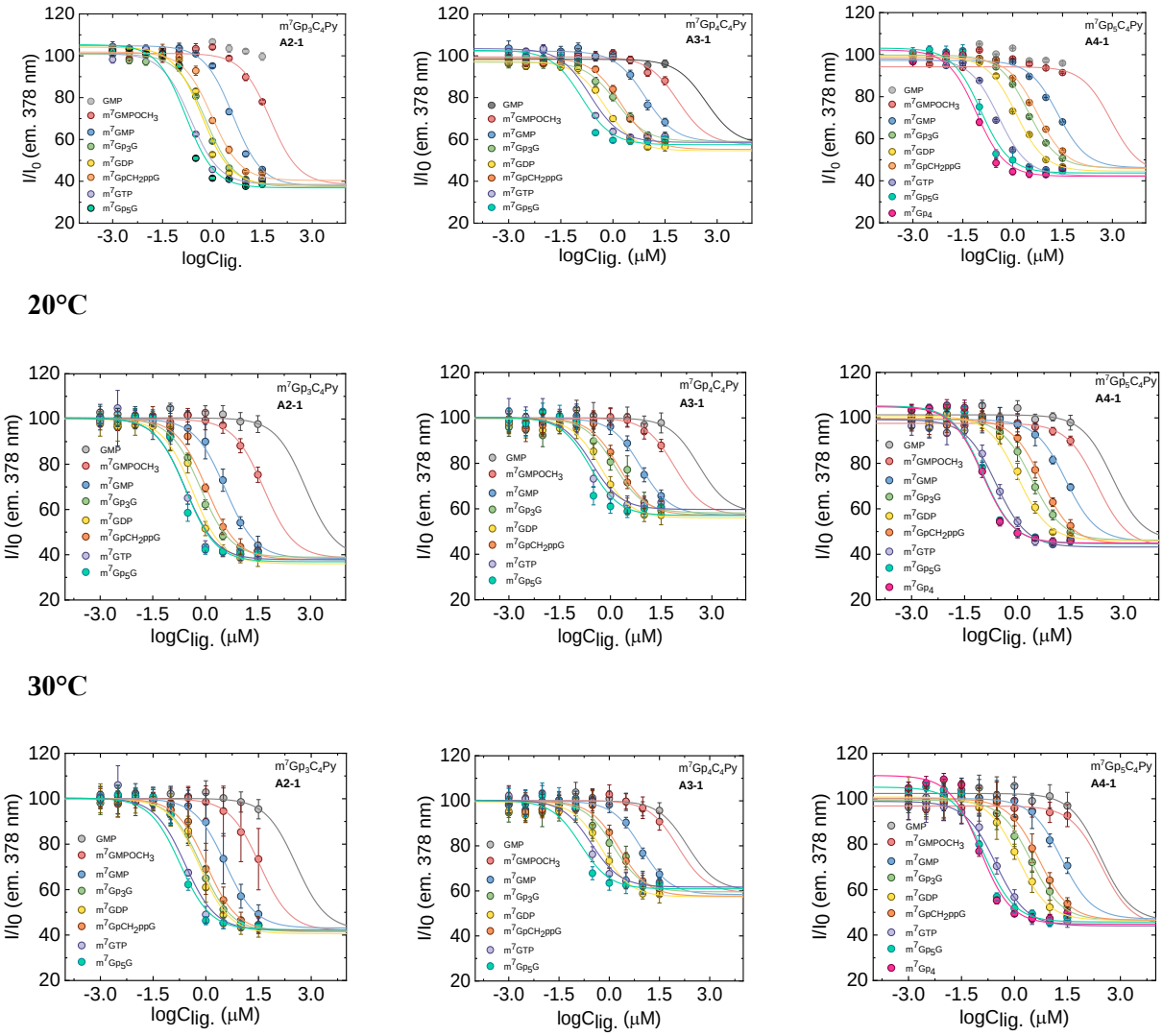


Rys. IV.40. Struktury analogów kapu scharakteryzowanych opracowaną metodą PyFLINT-B.



Rys. IV.41. Zmiany intensywności fluorescencji w czasie sondy: **A)** $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**), **B)** $m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**) i **C)** $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**) w trakcie inkubacji z eIF4E, w obecności rosnącego stężenia m^7GDP.

Do uzyskanych zależności intensywności fluorescencji od stężenia liganda dopasowano równanie (4) i wyznaczono wartości IC_{50} (Rys. IV.42, Tabela IV.3). Stałe dysocjacji K_D badanych ligandów zostały obliczone na podstawie IC_{50}, korzystając z wcześniej opracowanego algorytmu.[301]



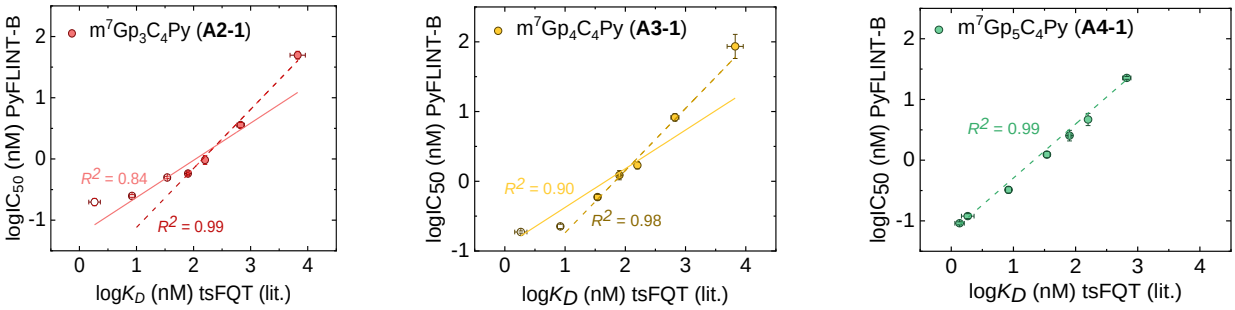
Rys. IV.42. Krzywe miareczkowania kompetycyjnego uzyskane dla ośmiu ligandów eIF4E i GMP, jako kontroli, z użyciem sond **A2-1**, **A3-1** i **A4-1** w trzech różnych temperaturach (20°C, 30°C i 37°C). Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

Tabela IV.3. Wartości K_{AS} niefluoryzujących nukleotydów, wyznaczone w trzech temperaturach 20, 30 i 37°C, z wykorzystaniem sondy $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**), $m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**) i $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**). Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

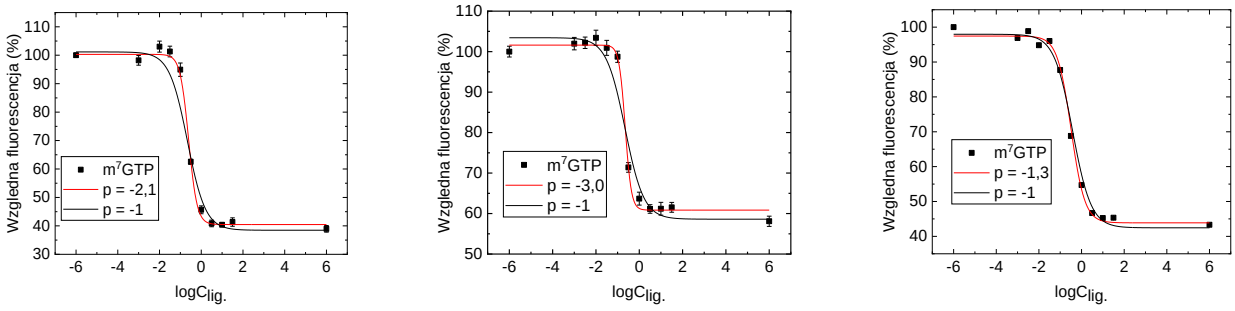
$m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**)			
Ligand	K_{AS} w 20°C (μM^{-1})	K_{AS} w 30°C (μM^{-1})	K_{AS} w 37°C (μM^{-1})
GMP	< 0,1	< 0,1	< 0,1
$m^7GMPOCH_3$	0,042 ± 0,004	0,039 ± 0,003	0,052 ± 0,008
m^7GMP	0,57 ± 0,38	0,53 ± 0,04	0,53 ± 0,05
m^7Gp_3G	4,1 ± 0,6	3,8 ± 0,6	3,6 ± 0,6
m^7GDP	10,6 ± 4,7	9,7 ± 4,7	4,2 ± 1,1
m^7GpCH_2ppG	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3
m^7GTP	~ 100	~ 70	< 70
m^7Gp_5G	~ 100	~ 70	< 70
$m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**)			
Ligand	K_{AS} w 20°C (μM^{-1})	K_{AS} w 30°C (μM^{-1})	K_{AS} w 37°C (μM^{-1})
GMP	< 0,1	< 0,1	< 0,1

$m^7GMPOCH_3$	0,034 ± 0,005	0,029 ± 0,003	0,018 ± 0,003
m^7GMP	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,23 ± 0,03
m^7Gp_3G	2,2 ± 0,4	2,0 ± 0,6	1,7 ± 0,6
m^7GDP	5,6 ± 1,0	5,8 ± 1,7	4,4 ± 1,5
m^7GpCH_2ppG	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,2
m^7GTP	31,3 ± 29,3	15,8 ± 9,3	13,0 ± 7,0
m^7Gp_5G	> 100	20,3	265
$m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**)			
Ligand	K_{AS} w 20°C (μM^{-1})	K_{AS} w 30°C (μM^{-1})	K_{AS} w 37°C (μM^{-1})
GMP	< 0,1	< 0,1	< 0,1
$m^7GMPOCH_3$	< 0,1	< 0,1	< 0,1
m^7GMP	0,46 ± 0,07	0,51 ± 0,16	0,45 ± 0,10
m^7Gp_3G	3,7 ± 0,7	4,9 ± 1,5	3,4 ± 0,8
m^7GDP	8,8 ± 1,7	12,2 ± 4,1	8,0 ± 1,8
m^7GpCH_2ppG	1,2 ± 0,5	2,5 ± 0,7	2,0 ± 0,4
m^7GTP	90,1 ± 2,1	67,2 ± 23,1	42,9 ± 10,2
m^7Gp_5G	234 ± 160	282 ± 212	128 ± 76
m^7Gp_4	620	318	230

W celu walidacji metody wykonano korelację $logIC_{50}$ wyznaczonego w eksperymencie z wybraną sondą pirenową, a wartościami literaturowymi (Rys. IV.43).[115]



Rys. IV.43. Korelacja pomiędzy obliczonym $logIC_{50}$ ośmiu wybranych ligandów eIF4E z logarytmem z literaturowego K_D (tsFQT). Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]



A) **B)** **C)**

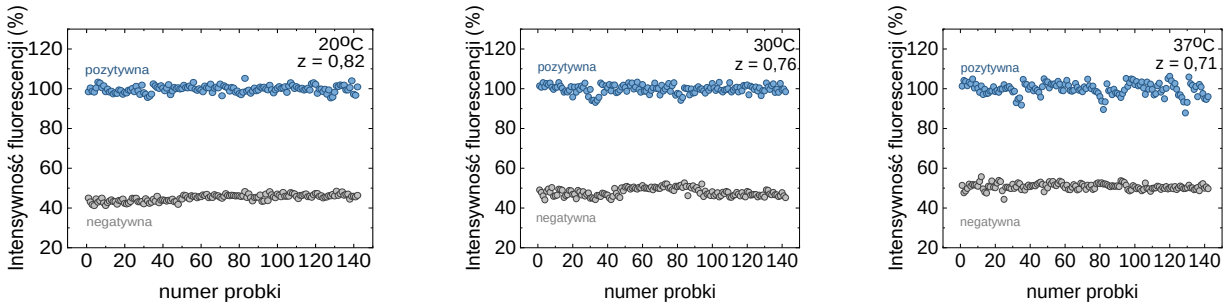
Rys. IV.44. Krzywe miareczkowania liganda m^7GTP z użyciem sondy **A)** $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**), **B)** $m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**) i **C)** $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**). Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Zaobserwowano dobrą zgodność pomiędzy danymi eksperymentalnymi, a literaturowymi, jednak liniową w całym zakresie jedynie dla sondy o najwyższym powinowactwie **A4-1** (Rys. IV.43). Wyniki uzyskane z użyciem sondy **A3-1** odbiegają od liniowości dla m^7Gp_5G i m^7GTP, a w przypadku sondy **A2-1** także dla m^7GDP (Rys. IV. 43). Zatem wartości K_D nie mogły zostać obliczone dla silnie wiążących ligandów ze względu na

ograniczenia modelu. Można także zaobserwować wzrost wartości bezwzględnej współczynnika Hilla *p* krzywych dopasowanych do danych uzyskanych dla silnie wiążących ligandów z użyciem sond o niskim powinowactwie (współczynnik Hilla wiązania kap-eIF4E powinien być równy 1 lub -1; Rys. IV.44).

IV.4.4. Walidacja metody

Ze względu na największe powinowactwo do białka eIF4E i najszerszy zakres działania, sonda $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**) została wyselekcjonowana do opracowania wysokoprzepustowej metody fluorescencyjnej HTS (ang. *High-Throughput Screening*). Walidacji metody dokonano poprzez wyznaczenie parametru *z*, wiążącego średnie wartości oraz odchylenia standardowe serii pomiarów kontroli pozytywnej i negatywnej. Pozytywna kontrola odpowiada najwyższemu, możliwemu do uzyskania sygnałowi. W przypadku metody PyFLINT-B była nią mieszanina 10 nM sondy **A4-1** i 75 nM eIF4E. Kontrola negatywna reprezentuje najniższy sygnał, zarejestrowany dla mieszaniny 10 nM sondy **A4-1**, 75 nM eIF4E oraz m^7GDP w stężeniu 100 µM. Parametr *z* wyznaczono w trzech temperaturach: 20°C, 30°C i 37°C poprzez wykonanie pomiaru intensywności fluorescencji ~140 powtórzeń kontroli pozytywnej i negatywnej (Rys. IV.45). Obliczone wartości parametru *z* wynosiły 0,82, 0,76 i 0,71 w temperaturze odpowiednio 20°C, 30°C i 37°C. Każda z wartości jest > 0,5 co oznacza, że opracowana metoda PyFLINT-B spełnia warunki wysokoprzepustowości w każdej z temperatur i może zostać zastosowana do badań przesiewowych bibliotek ligandów białka eIF4E.



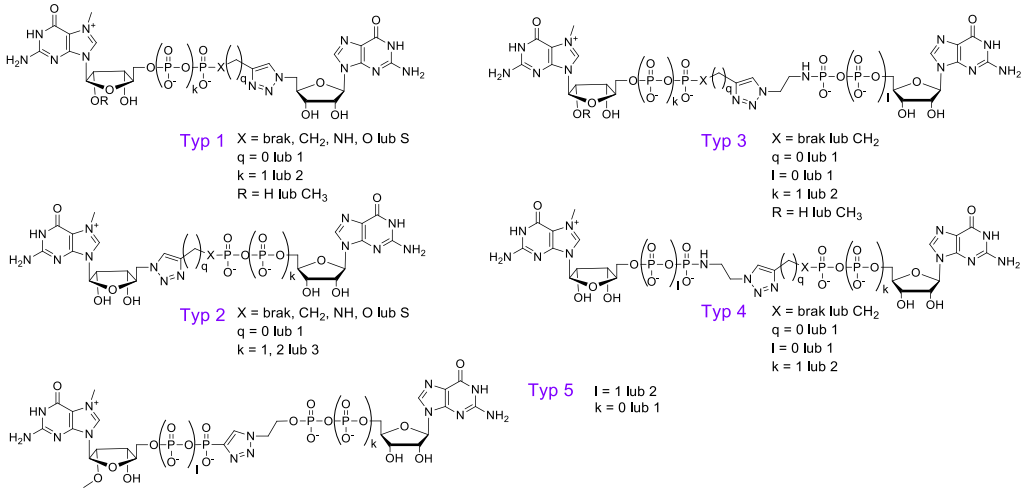
Rys. IV. 45. Wyznaczanie parametru *z* metody badania powinowactwa do białka eIF4E w trzech temperaturach 20, 30 i 37°C z użyciem sondy $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**). Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

IV.4.5. Wyznaczanie K_D biblioteki analogów kapu modyfikowanych triazolem

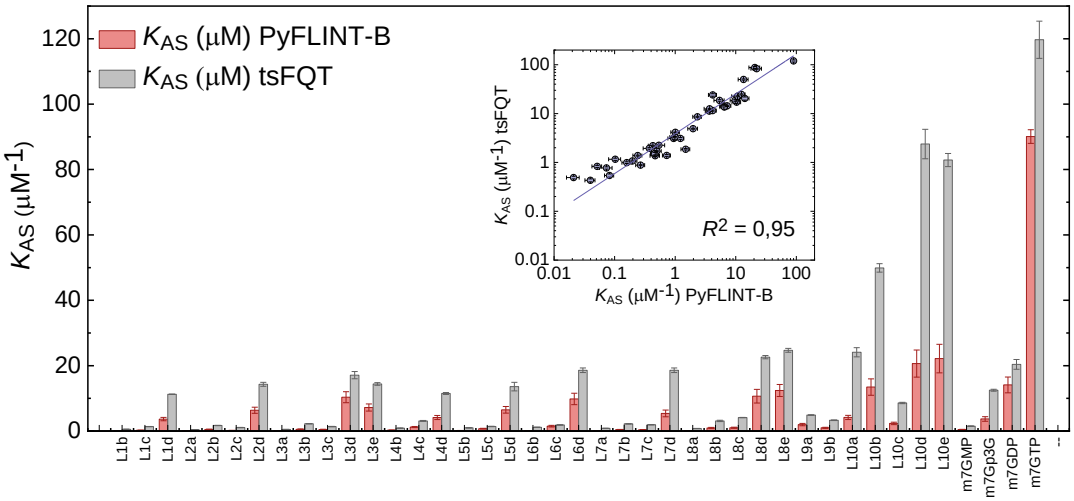
Aby zobrazować użyteczność opracowanej metody PyFLINT-B wykonano badania przesiewowe biblioteki analogów kapu modyfikowanych pierścieniem triazolowym (Rys. IV.46). Związki zostały zsyntetyzowane przez dr Sylwię Ciechanowicz (Walczak), a ich wartości K_{AS} wyznaczone metodą wygaszania fluorescencji tryptofanu tsFQT (ang. *time-synchronized fluorescence quenching titration*) i opublikowane.[172]

IC_{50} badanych analogów kapu wyznaczono w eksperymencie miareczkowania kompetycyjnego w zoptymalizowanych warunkach z sondą **A4-1**. Na podstawie uzyskanych wartości IC_{50} obliczono stałe dysocjacji K_D oraz ich odwrotności – stałe asocjacji K_{AS} (Tabela IV.4). Obliczone wartości K_{AS} były niższe niż literaturowe, co przypuszczalnie wynika z niedoszacowania K_D sondy pentafosforanowej. Jednak korelacja logarytmu wartości obliczonych i literaturowych była liniowa (R^2 = 0,95, Rys. IV.47 wstawka), potwierdzając zgodność wyników. Dla ligandów o najniższym powinowactwie do eIF4E zaobserwowano odchylenie od liniowości, powodujące zwiększenie błędu wyznaczania wartości K_D. Problem ten można

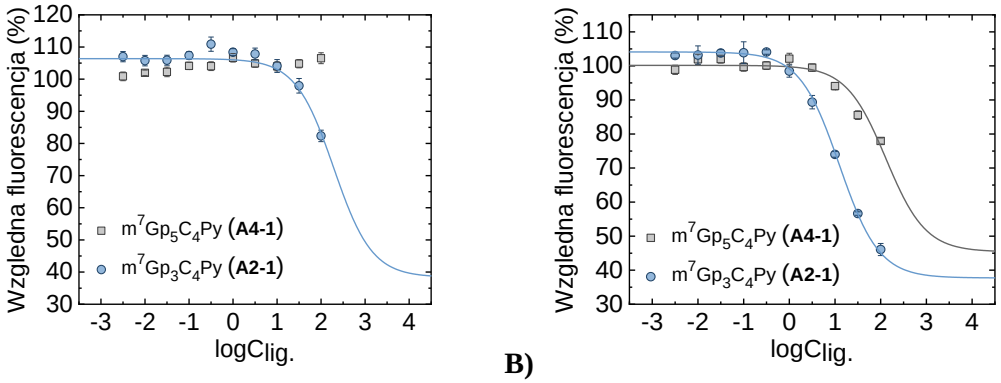
rozwiązać stosując wyższe stężenia liganda, bądź korzystając z sondy o niższym powinowactwie (Rys. IV.48).



Rys. IV. 46. Struktury dinukleotydowych analogów kapu modyfikowanych pierścieniem triazolowym w łańcuchu fosforanowym.[172, 302]



Rys. IV. 47. Porównanie stałych asocjacji K_{AS} modyfikowanych triazolem analogów kapu, wyznaczonych metodą PyFLINT-B oraz tsFQT. Wstawka przedstawia korelację logarytmu z K_{AS} przedstawionych na wykresie. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Oznaczenia ligandów zamieszczono w Tabeli IV.4. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]



Rys. IV. 48. Porównanie krzywych miareczkowania słabych ligandów **A) L1a** i **B) L1b** uzyskanych z użyciem sondy $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**) lub $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**). Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Oznaczenia ligandów zamieszczono w Tabeli IV.4. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

Tabela IV.4. Zestawienie obliczonych wartości stałych asocjacji K_{AS} triazolowych analogów kapu w temperaturach 20°C, 30°C i 37°C oraz wartości literaturowych.[115, 172]

Symbol	Związek	K_{AS} w 20°C (μM^{-1})	K_{AS} w 30°C (μM^{-1})	K_{AS} w37°C (μM^{-1})	K_{AS} w 20°C lit. (μM^{-1})
L1a	m^7G-t-C_2H_4-ppG Typ 2: X = CH_2, q = 1, k = 1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,17 ± 0,01
L1b	m^7G-t-C_2H_4-pppG Typ 2: X = CH_2, q = 1, k = 2	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,54 ± 0,04
L1c	m^7Gpp-C_2H_4-t-G Typ 1: X = CH_2, q = 1, k = 1, R = H	0,24 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,11 ± 0,02	1,38 ± 0,03
L1d	m^7Gppp-C_2H_4-t-G Typ 1: X = CH_2, q = 1, k = 2, R = H	3,66 ± 0,52	3,41 ± 0,50	2,45 ± 0,28	11,25 ± 0,03
L2a	m^7G-t-CH_2-ppG Typ 2: X = CH_2, q = 0, k = 1	0,04 ± 0,01	0,030 ± 0,006	0,018 ± 0,004	0,43 ± 0,03
L2b	m^7G-t-CH_2-pppG Typ 2: X = CH_2, q = 0, k = 2	0,50 ± 0,09	0,52 ± 0,10	0,37 ± 0,06	1,7 ± 0,04
L2c	m^7Gpp-CH_2-t-G Typ 1: X = CH_2, q = 0, k = 1, R = H	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,12 ± 0,02	1,07 ± 0,04
L2d	m^7Gppp- CH_2-t-G Typ 1: X = CH_2, q = 0, k = 1, R = H	6,37 ±0,93	5,99 ± 0,84	3,74 ± 0,51	14,3 ± 0,6
L3a	m^7G-t-ppG Typ 2: X = brak, q = 0, k = 1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,49 ± 0,03
L3b	m^7G-t-pppG Typ 2: X = brak, q = 0, k = 2	0,54 ± 0,13	0,50 ± 0,01	0,40 ± 0,07	2,24 ± 0,06
L3c	m^7Gpp-t-G Typ 1: X = brak, q = 0, k = 1, R = H	0,47 ± 0,08	0,44 ± 0,10	0,29 ± 0,06	1,37 ± 0,06
L3d	m^7Gppp-t-G Typ 1: X = brak, q = 0, k = 2, R = H	10,3 ± 1,7	8,9 ± 1,4	5,83 ± 0,76	17,1 ± 1,1
L3e	$m_2^{7.2'O}$Gppp-t-G Typ 1: X = brak, q = 0, k = 2, R = CH_3	7,2 ± 1,1	6,8 ± 1,1	4,27 ± 0,66	14,4 ± 0,4
L4a	m^7G-t-CH_2O-ppG Typ 2: X = O, q = 1, k = 1	0,03 ± 0,01	0,027 ± 0,009	0,017 ± 0,008	< 0,1
L4b	m^7G-t- CH_2O-pppG Typ 2: X = O, q = 1, k = 2	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,88 ± 0,02
L4c	m^7Gpp-OCH_2-t-G Typ 1: X = O, q = 1, k = 1, R = H	1,22 ± 0,17	1,02 ± 0,14	0,60 ± 0,13	3,1 ± 0,13
L4d	m^7Gppp-OCH_2-t-G Typ 1: X = O, q = 1, k = 2, R = H	4,15 ± 0,62	1,32 ± 0,54	3,45 ± 0,44	11,5 ± 0,3
L5a	m^7G-t-CH_2S-ppG Typ 2: X = S, q = 1, k = 1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
L5b	m^7G-t-CH_2S-pppG Typ 2: X = S, q = 1, k = 2	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,99 ± 0,04
L5c	m^7Gpp-SCH_2-t-G Typ 1: X = S, q = 1, k = 1, R = H	0,72 ± 0,11	1,34 ± 0,18	0,72 ± 0,11	1,39 ± 0,06
L5d	m^7Gppp-SCH_2-t-G Typ 1: X = S, q = 1, k = 1, R = H	6,5 ± 1,0	2,01 ± 0,54	4,7 ±0,7	13,6 ± 0,06
L6a	m^7G-t-CH_2NH-ppG Typ 2: X = NH, q = 1, k = 1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,14 ± 0,03
L6b	m^7G-t-CH_2NH-pppG Typ 2: X = NH, q = 1, k = 2	0,10 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,10 ± 0,02	1,16 ± 0,06
L6c	m^7Gpp-$NHCH_2$-t-G Typ 1: X = NH, q = 1, k = 1, R = H	1,49 ± 0,25	2,31 ± 0,38	0,89 ± 0,13	1,86 ± 0,06
L6d	m^7Gppp-$NHCH_2$-t-G Typ 1: X = NH, q = 1, k = 2, R = H	9,8 ± 1,7	9,0 ± 1,7	6,6 ± 1,0	18,6 ± 0,7
L7a	m^7Gp-NHC_2H_4-t-CH_2-ppG Typ 4: X = CH_2, q = 0, l = 0, k = 1	0,05 ± 0,01	0,048 ± 0,008	0,035 ± 0,005	0,83 ± 0,04
L7b	m^7Gp-NHC_2H_4-t-CH_2-pppG Typ 4: X = CH_2, q = 0, l = 0, k = 2	0,43 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,35 ± 0,05	2,2 ± 0,05

L7c	$m^7Gpp\text{-}CH_2\text{-}t\text{-}C_2H_4NH\text{-}pG$ Typ 3: X = CH_2, q = 0, l = 0, k = 1, R = H	0,37 ± 0,07	0,39 ± 0,07	0,30 ± 0,04	1,94 ± 0,07
L7d	$m^7Gppp\text{-}CH_2\text{-}t\text{-}C_2H_4NH\text{-}pG$ Typ 3: X = CH_2, q = 0, l = 0, k = 2, R = H	5,4 ± 1,0	5,3 ± 0,8	3,52 ± 0,6	18,6 ± 0,7
L8a	$m^7Gp\text{-}NHC_2H_4\text{-}t\text{-}ppG$ Typ 4: X = brak, q = 0, l = 0, k = 1	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,77 ± 0,04
L8b	$m^7Gp\text{-}NHC_2H_4\text{-}t\text{-}pppG$ Typ 4: X = brak, q = 0, l = 0, k = 2	0,94 ± 0,19	0,84 ± 0,16	0,87 ± 0,18	3,1 ± 0,2
L8c	$m^7Gpp\text{-}t\text{-}C_2H_4NH\text{-}pG$ Typ 3: X = brak, q = 0, l = 0, k = 1, R = H	1,01 ± 0,16	0,97 ± 0,16	0,59 ± 0,09	4,13 ± 0,06
L8d	$m^7Gppp\text{-}t\text{-}C_2H_4NH\text{-}pG$ Typ 3: X = brak, q = 0, l = 0, k = 2, R = H	10,7 ± 2,1	9,0 ± 1,7	7,2 ± 1,3	22,6 ± 0,5
L8e	$m_2^{7.2'O}Gppp\text{-}t\text{-}C_2H_4NH\text{-}pG$ Typ 3: X = brak, q = 0, l = 0, k = 2, R = CH_3	12,4 ± 1,8	12,3 ± 1,8	7,9 ± 0,9	24,7 ± 0,6
L9a	$m^7Gpp\text{-}NHC_2H_4\text{-}t\text{-}C_2H_4\text{-}ppG$ Typ 4: X = CH_2, q = 1, l = 1, k = 1	1,97 ± 0,36	2,17 ± 0,35	1,36 ± 0,16	4,9 ± 0,1
L9b	$m^7Gpp\text{-}C_2H_4\text{-}t\text{-}C_2H_4NH\text{-}ppG$ Typ 3: X = CH_2, q = 1, l = 1, k = 1, R = H	0,99 ± 0,17	1,04 ± 0,16	0,69 ± 0,10	3,3 ± 0,1
L10a	$m_2^{7.2'O}Gpp\text{-}t\text{-}C_2H_4O\text{-}ppG$ Typ 5: l = 1, k = 1	4,2 ± 0,6	4,2 ± 0,7	3,4 ± 0,4	24,1 ± 0,6
L10b	$m_2^{7.2'O}Gppp\text{-}t\text{-}C_2H_4O\text{-}pG$ Typ 5: l = 2, k = 0	13,4 ± 2,5	14,1 ± 2,6	10,6 ± 1,7	49,9 ± 1,3
L10c	$m^7G\text{-}t\text{-}ppppG$ Typ 2: X = brak, q = 0, k = 3	2,3 ± 0,4	2,5 ± 0,4	1,9 ± 0,3	8,6 ± 0,2
L10d	$m_2^{7.2'O}Gppp\text{-}t\text{-}C_2H_4O\text{-}ppG$ Typ 5: l = 2, k = 1	20,6 ± 4,1	20,4 ± 3,5	15,9 ± 3,2	87,8 ± 4,5
L10e	$m_2^{7.2'O}Gppp\text{-}t\text{-}C_2H_4NH\text{-}ppG$ Typ 3: X = brak, q = 0, l = 1, k = 2, R = CH_3	22,1 ± 4,4	23,5 ± 4,4	17,1 ± 2,6	82,9 ± 2,0
m^7GMP		0,46 ± 0,07	0,51 ± 0,16	0,45 ± 0,10	1,5 ± 0,1
m^7GDP		8,8 ± 1,7	12,2 ± 4,1	8,0 ± 1,8	20,4 ± 1,5
m^7GTP		90,1 ± 2,1	67,2 ± 23,1	42,9 ± 10,2	119,7 ± 5,7
m^7Gp_3G		3,7 ± 0,7	4,9 ± 1,5	3,4 ± 0,8	12,5 ± 0,3

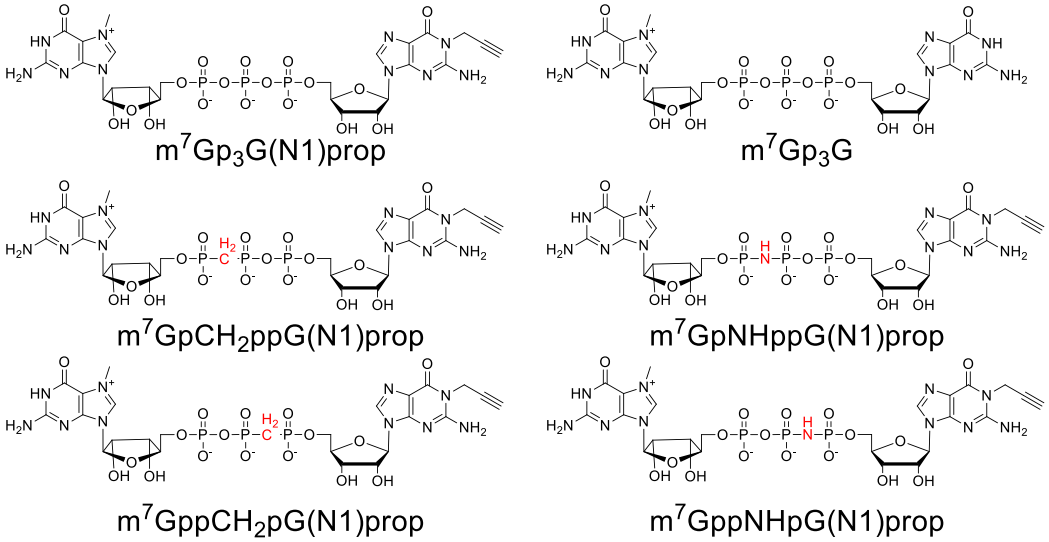
IV.4.6. Zastosowanie metody PyFLINT-B do rutynowych pomiarów powinowactwa nukleotydów do eIF4E

Opracowana metoda PyFLINT-B wyznaczania stałych wiązania kompleksu kap-eIF4E w oparciu o zmiany intensywności fluorescencji sondy $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**) została opublikowana (Kasprzyk et al. 2019)[299] i stosowana jest do charakterystyki biofizycznej bibliotek modyfikowanych nukleotydów.

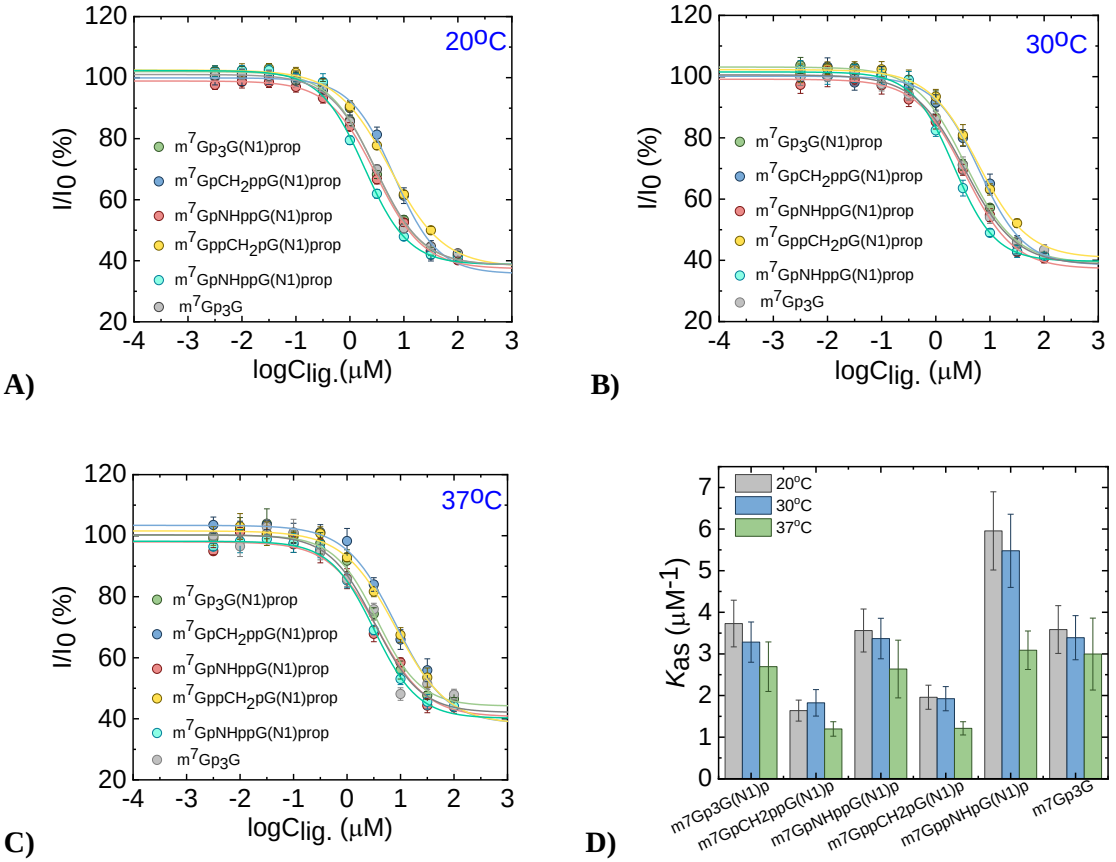
Jedną z pierwszych scharakteryzowanych serii nukleotydów były analogi kapu m^7Gp_3G modyfikowane grupą propargilową w pozycji N1 guanozyny (Rys. IV.49).[296] Związki zostały zsyntetyzowane przez mgr Michała Kopciała z Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT i Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego). Stałe asocjacji nukleotydów K_{AS} wyznaczono w zoptymalizowanych warunkach metody PyFLINT-B w trzech temperaturach: 20°C, 30°C i 37°C (Rys. IV.50, Tabela IV.5). Jako kontrolę zastosowano niemodyfikowany kap m^7GpppG.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że modyfikacja m^7Gp_3G propargiloaminą w pozycji N1 guaniny, nie zmienia powinowactwa nukleotydu do białka eIF4E (K_{AS} 3,73 ± 0,56 μM^{-1} dla m^7Gp_3G-N1-prop i 3,58 ± 0,57 μM^{-1} dla m^7Gp_3G). Obecność modyfikacji metylenobisfosfonianowej (-CH_2-) zmniejszała powinowactwo dinukleotydu, natomiast imidofosforanowej (-NH-) – nie zmieniała, lub zwiększała w przypadku analogu

m^{7}GppNHpG-N1-prop. Po wyznakowaniu związków izomerem 5 karboksyfluoresceiny zostały one wykorzystane w badaniach powinowactwa nukleotydów do białek eIF4E i DcpS z użyciem metody mikroskalowej termoforezy MST (Kopciał, et. al. 2019).[296]



Rys. IV. 49. Struktury badanych analogów m^{7}Gp$_3$G modyfikowanych propargiloaminą w pozycji N1.

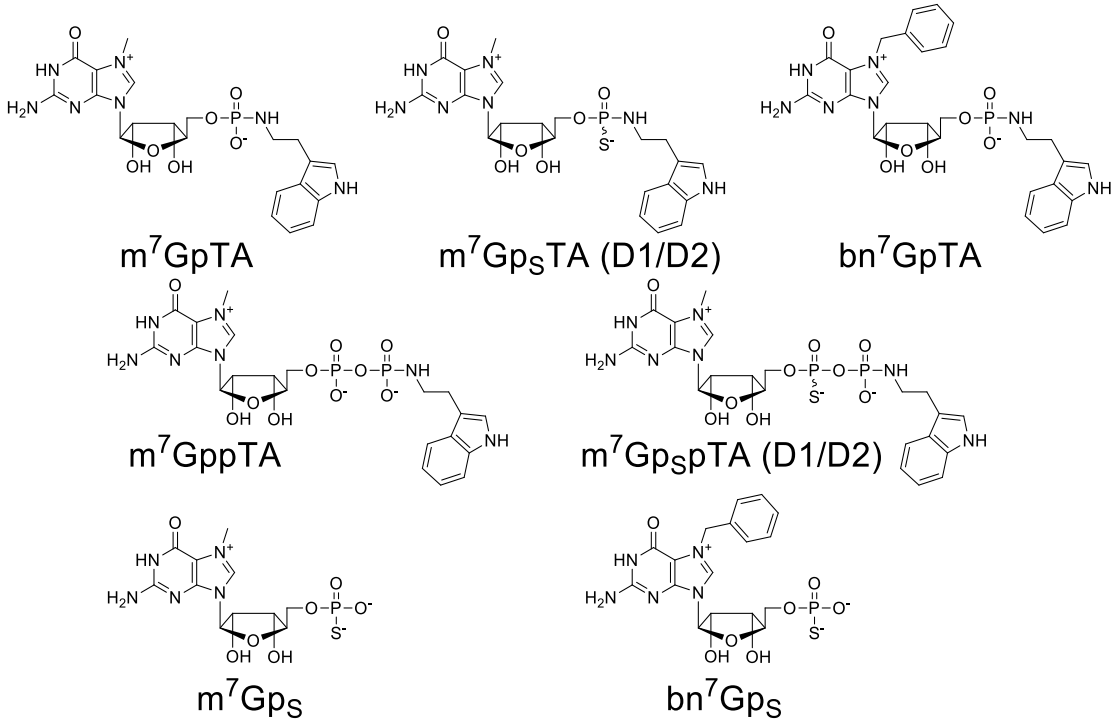


Rys. IV. 50. Krzywe miareczkowania kompetycyjnego wyznaczone dla pięciu analogów m^{7}Gp$_3$G modyfikowanych grupą propargilową w pozycji N1 guanozyny oraz m^{7}Gp$_3$G, jako kontroli, z użyciem sondy **A4-1** w trzech różnych temperaturach: **A)** 20°C, **B)** 30°C i **C)** 37°C); **D)** Porównanie wartości stałych asocjacji kompleksów N1-propargiloaminowych analogów kapu z białkiem eIF4E, wyznaczone metodą PyFLINT-B. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

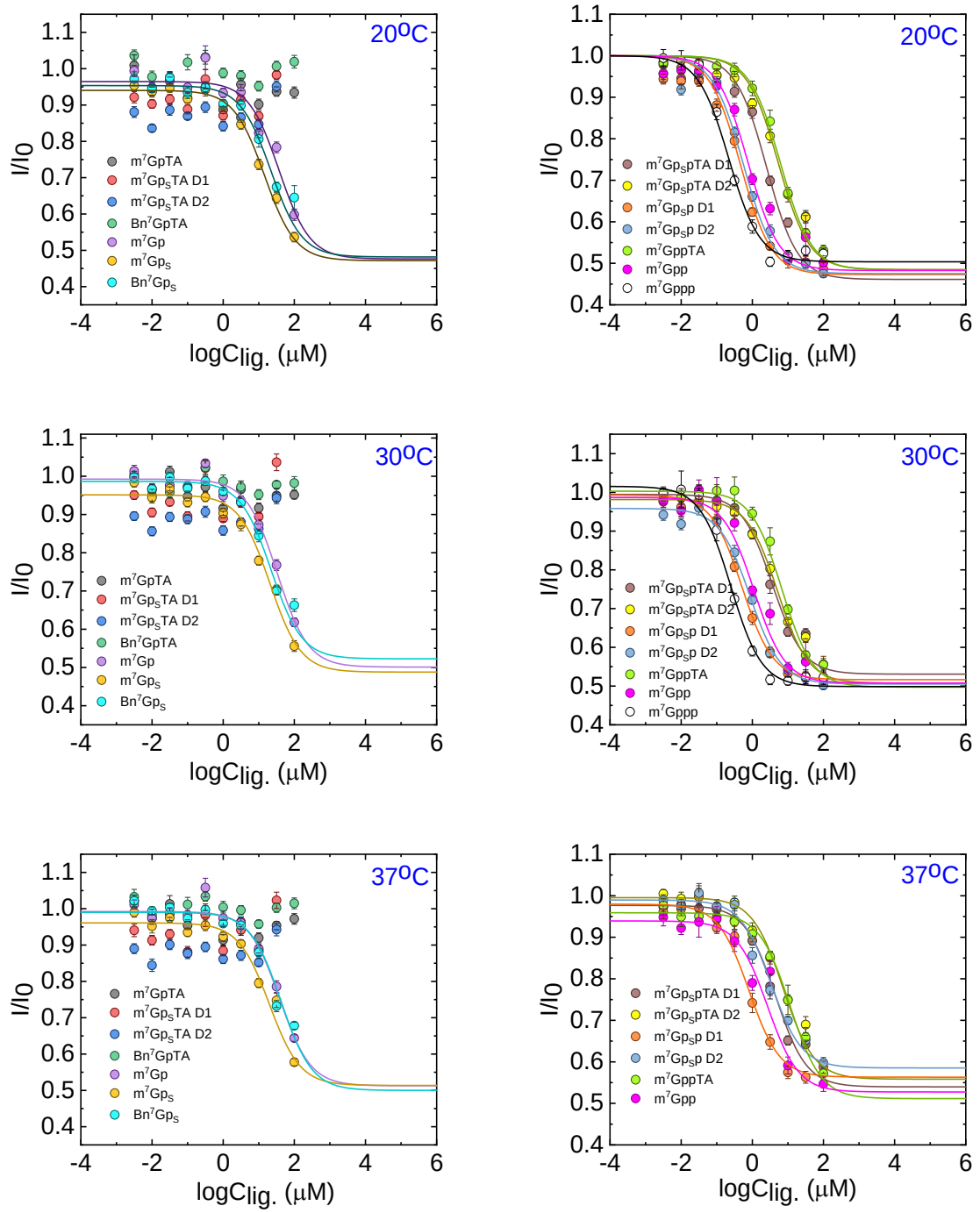
Tabela IV.5. Zestawienie obliczonych wartości stałych asocjacji K_{AS} analogów kapu podstawionych grupą propargilową w pozycji N1 guanozyny.

Związek	K_{AS} (μM^{-1})		
	20°C	30°C	37°C
m^7Gp_3G(N1)prop	3,73 ± 0,56	3,28 ± 0,48	2,69 ± 0,59
m^7GpCH_2ppG(N1)prop	1,64 ± 0,25	1,82 ± 0,32	1,20 ± 0,17
$m^7GpNHppG$(N1)prop	3,56 ± 0,52	3,37 ± 0,49	2,64 ± 0,69
m^7GppCH_2pG(N1)prop	1,96 ± 0,29	1,92 ± 0,29	1,21 ± 0,16
$m^7GppNHpG$(N1)prop	5,06 ± 0,94	5,48 ± 0,88	3,09 ± 0,46
m^7Gp_3G	3,58 ± 0,57	3,39 ± 0,53	3,00 ± 0,86

Kolejną biblioteką scharakteryzowaną przy użyciu metody PyFLINT-B była seria mononukleotydowych analogów kapu, zawierających resztę tryptaminową (TA), wprowadzoną w terminalną pozycję łańcucha fosforanowego (Rys. IV.51). Synteza i charakterystyka właściwości analogów tryptaminowych zostały opisane w pracy licencjackiej Sebastiana Gołojucha (Wydział Chemii UW, 2019), a także w pracy Gołojuch, et. al. 2020.[303] Tryptamina została wprowadzona w strukturę nukleotydu w celu umożliwienia dostarczenia go do wnętrza komórki. Ze względu na nakładanie się widm emisji tryptofanu i tryptaminy, powinowactwo nukleotydów do białka eIF4E nie jest możliwe do wyznaczenia z użyciem metody miareczkowania fluorescencyjnego, opartego o wygaszanie fluorescencji tryptofanu tsFQT. Zastosowanie w tym przypadku metody pirenowej PyFLINT-B pozwala na wyeliminowanie interferencji oraz wyznaczenie wartości stałych asocjacji kompleksu kap-eIF4E. Stałe asocjacji nukleotydów K_{AS} wyznaczono w zoptymalizowanych warunkach metody PyFLINT-B w trzech temperaturach: 20°C, 30°C i 37°C (Rys. IV.52–53, Tabela IV.6). W ramach kontroli wyznaczono K_{AS} nukleotydów niemodyfikowanych TA.



Rys. IV. 51. Struktury mononukleotydowych analogów kapu modyfikowanych tryptaminą.

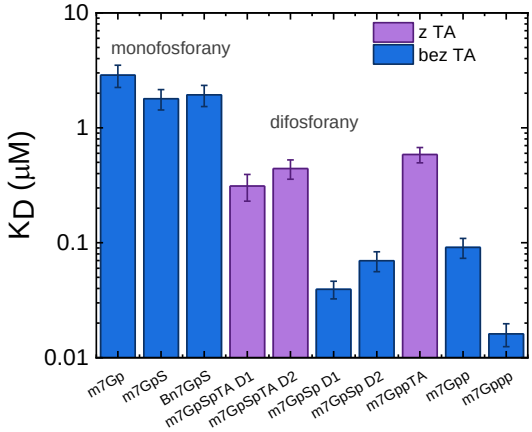


Rys. IV. 52. Krzywe miareczkowania kompetycyjnego wyznaczone dla siedmiu analogów m^7GMP i m^7GDP modyfikowanych grupą tryptaminą w terminalnym fosforanie oraz siedmiu niemodyfikowanych związków (kontrola), z użyciem sondy **A4-1** w trzech różnych temperaturach (20°C, 30°C i 37°C). Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Tabela IV.6. Zestawienie obliczonych wartości stałych asocjacji K_{AS} mononukleotydowych analogów kapu modyfikowanych tryptaminą oraz ich niemodyfikowanych odpowiedników.

Związek	K_{AS} (μM^{-1})		
	20°C	30°C	37°C
m^7GpTA	< 0,1 μM	< 0,1 μM	< 0,1 μM
m^7GpSTA D1	< 0,1 μM	< 0,1 μM	< 0,1 μM
m^7GpSTA D2	< 0,1 μM	< 0,1 μM	< 0,1 μM
bn^{7}GpTA	< 0,1 μM	< 0,1 μM	< 0,1 μM

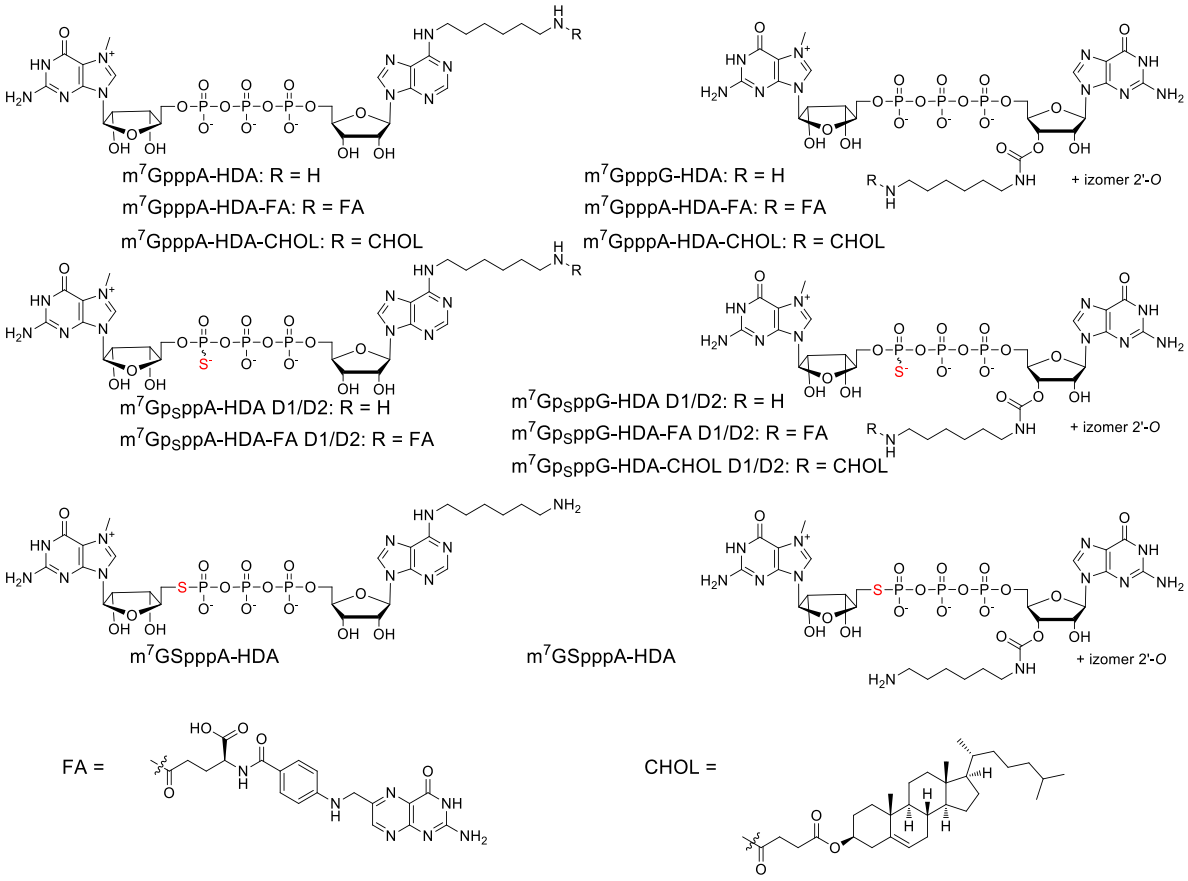
m^7Gp	0,36 ± 0,10	0,37 ± 0,08	0,26 ± 0,05
m^7Gp_S	1,3 ± 0,4	0,92 ± 0,30	0,90 ± 0,30
bn^7Gp_S	0,75 ± 0,27	0,55 ± 0,12	0,35± 0,06
m^7Gp_SpTA D1	5,1 ± 1,6	3,6 ± 0,8	2,8± 0,7
m^7Gp_SpTA D2	2,4 ± 0,6	2,7 ± 0,6	1,4 ± 0,29
m^7Gp_Sp D1	33,9 ± 7,5	28,2 ± 4,9	13,9 ± 2,8
m^7Gp_Sp D2	22,2 ± 5,2	19,5 ± 4,9	3,8 ± 0,8
m^7GppTA	1,8 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,4
m^7GDP	15,3 ± 3,6	9,7 ± 2,2	5,1 ± 2,1
m^7GTP	64,3 ± 14,0	50,1 ± 11,1	b.d.



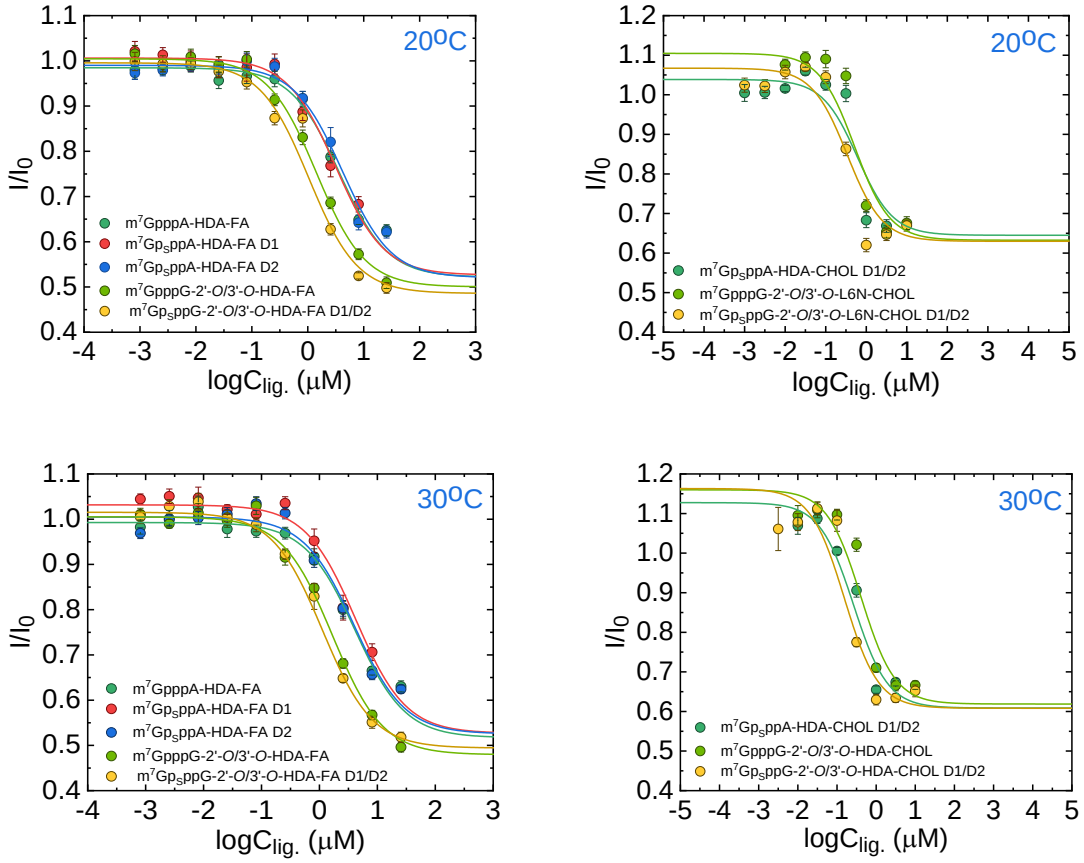
Rys. IV. 53. Porównanie wartości stałych asocjacji kompleksów analogów kapu modyfikowanych tryptaminą z białkiem eIF4E, wyznaczone metodą PyFLINT-B w temperaturze 20°C. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

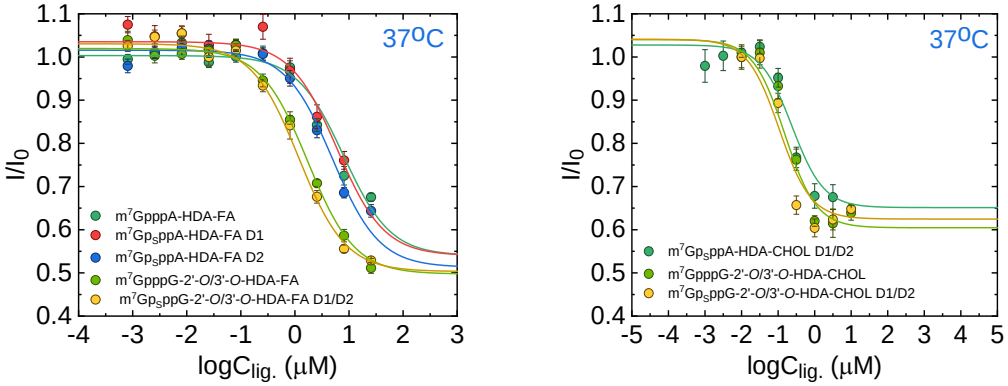
Analiza wyznaczonych wartości K_{AS} wykazała, że obecność tryptaminy powoduje zmniejszenie powinowactwa nukleotydu do eIF4E. Wprowadzenie dodatkowej grupy w obrębie reszty fosforanowej prowadzi do zamaskowania ładunku ujemnego terminalnego fosforanu, co z kolei przekłada się na mniejsze powinowactwo do białka. Jest to obserwacja zgodna z przesłankami literaturowymi.[115] Obecność atomu siarki (fosforan α dla difosforanów) skutkuje zwiększeniem stabilności kompleksu kap-eIF4E, co również zgodne jest z danymi literaturowymi.[174, 300]

Ostatnim zaprezentowanym w niniejszej pracy przykładem wykorzystania opracowanej metody PyFLINT-B jest charakterystyka analogów kapu m^7GpppA i m^7GpppG, zawierających modyfikację umożliwiającą ich przenikanie przez błonę komórkową – kwas foliowy (FA) lub cholesterol (CHOL; Rys. IV.54). Związki zostały zsyntetyzowane przez dr Natalię Kleczewską oraz mgr Zofię Warmińską w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Kwas foliowy oraz cholesterol charakteryzują się różnymi mechanizmami transportu przez błonę komórkową – dla FA jest to endocytoza z udziałem receptora, natomiast dla CHOL dyfuzja bierna. Analogi m^7GpppA znakowano w pozycji N6 adenozyny poprzez linker heksametylenodiaminowy (HDA), a m^7GpppG w pozycji 2'-*O*/3'-*O* guanozyny poprzez ten sam linker z utworzeniem wiązania amidowego. Nukleotydy dodatkowo modyfikowano siarką w pozycji γ fosforanu, bądź 5' 7-metyloguanozyny. Stałe asocjacji nukleotydów K_{AS} wyznaczono w zoptymalizowanych warunkach metody PyFLINT-B w trzech temperaturach: 20°C, 30°C i 37°C (Rys. IV.55–56, Tabela IV.7). W ramach kontroli wyznaczono K_{AS} kompleksów niemodyfikowanych dinukleotydów z białkiem eIF4E.



Rys. IV. 54. Struktury badanych analogów m^7GpppA i m^7GpppG modyfikowanych kwasem foliowym (FA) i cholesterolem (CHOL).

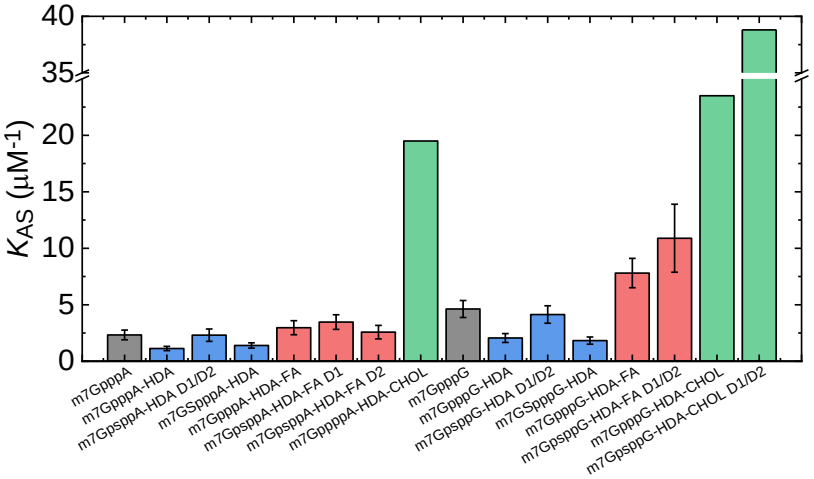




Rys. IV. 55. Krzywe miareczkowania kompetycyjnego wyznaczone dla kompleksów analogów m^{7}GpppA i m^{7}GpppG modyfikowanych kwasem foliowym i cholesterolem z białkiem eIF4E, z użyciem sondy **A4-1** w trzech różnych temperaturach (20°C, 30°C i 37°C). Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Tabela IV.7. Zestawienie obliczonych wartości stałych asocjacji K_{AS} kompleksów analogów m^{7}GpppA i m^{7}GpppG modyfikowanych kwasem foliowym (FA) i cholesterolem (CHOL) z białkiem eIF4E.

Związek		K_{AS} (μM^{-1})		
		20°C	**30°C**	**37°C**
Brak znacznika	m^{7}GpppA	2,33 ± 0,43	2,01 ± 0,38	1,50 ± 0,24
	m^{7}GpppA-HDA	1,13 ± 0,19	0,88 ± 0,17	0,61 ± 0,12
	m^{7}GpSppA-HDA D1/D2	2,31 ± 0,55	1,82 ± 0,41	1,59 ± 0,34
	m^{7}GSpppA-HDA	1,40 ± 0,23	0,94 ± 0,23	0,76 ± 0,13
	m^{7}GpppG	4,63 ± 0,75	2,95 ± 0,56	2,23 ± 0,44
	m^{7}GpppG-HDA	2,06 ± 0,39	1,43 ± 0,27	1,11 ± 0,16
	m^{7}GpSppG-2'-*O*/3'-*O*-HDA D1/D2	4,14 ± 0,77	3,52 ± 0,67	2,49 ± 0,50
	m^{7}GSpppG-HDA	1,83 ± 0,32	1,50 ± 0,30	1,25 ± 0,27
FA	m^{7}GpppA-HDA-FA	2,97 ± 0,62	2,84 ± 0,62	1,30 ± 0,31
	m^{7}GpSppA-HDA-FA D1	3,47 ± 0,65	2,77 ± 0,66	1,64 ± 0,42
	m^{7}GpSppA-HDA-FA D2	2,58 ± 0,60	2,94 ± 0,83	2,00 ± 0,38
	m^{7}GpppG-HDA-FA	7,81 ± 1,30	7,08 ± 1,22	5,87 ± 0,80
	m^{7}GpSppG-2'-*O*/3'-*O*-HDA-FA D1/D2	10,89 ± 3,01	10,81 ± 1,71	8,77 ± 1,58
CHOL	m^{7}GpppA-HDA-CHOL	19,5	56,9	55,2
	m^{7}GpppG-HDA-CHOL	23,5	33,3	88,5
	m^{7}GpSppG-2'-*O*/3'-*O*-HDA-CHOL D1/D2	38,8	127,8	281,3



Rys. IV. 56. Porównanie wartości stałych asocjacji kompleksów analogów kapu modyfikowanych FA lub CHOL z białkiem eIF4E, wyznaczone metodą PyFLINT-B w temperaturze 20°C. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Na podstawie analizy wyznaczonych wartości stałych asocjacji K_{AS} wysnuto następujące wnioski:

- Analogi m^7GpppG wiążą się z eIF4E ok. dwa razy silniej w porównaniu do analogów m^7GpppA (K_{AS} (m^7GpppA) 2,33 ± 0,43 μM^{-1} i K_{AS} (m^7GpppG) 4,63 ± 0,75 μM^{-1});
- Wprowadzenie linkera heksametylenodiaminowego (HDA) prowadzi do ok. dwukrotnego osłabienia wiązania nukleotydu z eIF4E (K_{AS} (m^7GpppA) 2,33 ± 0,43 μM^{-1} i K_{AS} (m^7GpppA-HDA) 1,13 ± 0,19 μM^{-1} oraz K_{AS} (m^7GpppG) 4,63 ± 0,75 μM^{-1} i K_{AS} (m^7GpppG-2'-*O*/3'-*O*-HDA) 2,06 ± 0,39 μM^{-1});
- Obecność grupy tiofosforanowej w pozycji γ łańcucha fosforanowego prowadzi do dwukrotnego zwiększenia powinowactwa nukleotydu do białka – stała asocjacji m^7Gp_SppA-HDA i m^7Gp_SppG-2'*O*/3'-*O*-HDA jest zbliżona do odpowiednio m^7GpppA i m^7GpppG, niemodyfikowanych linkerami;
- Wprowadzenie atomu siarki w pozycję 5' 7-metyloguanozyny prowadzi do nieznacznego zwiększenia stałej asocjacji analogu $m^7GSpppA$-HDA, bądź zmniejszenia w przypadku $m^7GSpppG$-HDA w porównaniu do odpowiednio m^7GpppA-HDA i m^7GpppG-HDA;
- Kwas foliowy (FA) stabilizuje kompleks modyfikowanego nukleotydu z białkiem eFI4E, przypuszczalnie poprzez oddziaływania elektrostatyczne – stała asocjacji zwiększa się 1,5 do 4-krotnie;
- Cholesterol zwiększa wartości stałych asocjacji modyfikowanych nukleotydów od 9 do 17 razy. Ponadto zaobserwowano znaczny wzrost powinowactwa do eIF4E związków modyfikowanych cholesterolem wraz ze wzrostem temperatury;
- Wprowadzenie FA i CHOL w strukturę dinukleotydu nie tylko zapewnia przenikalność analogu przez błonę komórkową, ale również zwiększa stabilność kompleksu z białkiem eIF4E. Związki tego typu mogą znaleźć zastosowanie w inhibicji białka eIF4E, a tym samym pełnić rolę czynników przeciwnowotworowych.

IV.4.7. Podsumowanie

Mononukleotydowe analogi kapu znakowane fluorescencyjnie poprzez terminalną resztę fosfonianową otrzymano w celu opracowania metody wysokoprzepustowej, przeznaczonej do badań powinowactwa ligandów do białka eIF4E (Seria A). Przetestowano sześć znaczników fluorescencyjnych: piren, fenyloetynylopiren, BDP-FL, 6-karboksyfluoresceinę, cyjaninę 3 oraz cyjaninę 5. Otrzymane związki scharakteryzowano spektroskopowo poprzez pomiar widm absorpcji i emisji oraz wyznaczenie wydajności kwantowych QY. Aby wyselekcjonować związki, które mogą być wykorzystane w prostych pomiarach fluorescencji (sondy FLINT) znakowane nukleotydy inkubowano z rosnącymi stężeniami białka eIF4E. Spośród badanych znaczników jedynie związki znakowane pirenem wykazywały zdolność do zmiany intensywności fluorescencji na skutek związania z białkiem. Efekt ten jest skutkiem obecności oddziaływań wygaszających pomiędzy 7-metyloguanozyną, a pirenem, które zostają zaburzone w momencie związania części nukleotydowej przez białko.

Po potwierdzeniu specyficzności oddziaływań pomiędzy sondą pirenową, a eIF4E struktura sondy została zoptymalizowana. Przetestowano analogi m^7G nukleotydów znakowanych pirenem, zawierających od dwóch do pięciu reszt fosforanowych. Stałe dysocjacji K_D wyznaczono w eksperymencie wiązania bezpośredniego. Pentafosforanowy analog kapu znakowany pirenem (związek **A4-1**) wytypowano, jako najbardziej optymalną sondę o najniższym K_D (7,4 ± 1,5 nM), umożliwiającą badanie silnie wiążących się ligandów.

Wykorzystując sondę **A4-1** opracowano metodę PyFLINT-B, możliwą do użycia w zakresie temperatur 20–37°C z wykorzystaniem czytnika płytek (Tabela IV.8). W celu walidacji metody wyznaczono parametr z, który wynosił 0,82, 0,76 i 0,71 w temperaturach odpowiednio 20, 30 i 37°C. Wartości powyżej 0,5 oznaczają, że metoda spełnia warunki wysokoprzepustowości. Sondę **A4-1** zastosowano także do scharakteryzowania modelowej biblioteki analogów kapu modyfikowanych pierścieniem triazolowym, których stałe asocjacji zostały już opublikowane w literaturze i wyznaczone metodą tsFQT. Wyznaczone metodą PyFLINT-B wartości K_{AS} korelowały liniowo z wartościami literaturowymi, co potwierdza poprawność danych uzyskiwanych metodą PyFLINT-B. Niższe niż literaturowe wartości K_{AS} wyznaczone metodą PyFLINT-B prawdopodobnie wynikają z zawyżonej wartości K_D sondy **A4-1**. Wynika to z konieczności wyznaczenia K_D kompleksu sondy z eIF4E w stężeniu sondy poniżej jej K_D, co z kolei jest ograniczone czułością metody.

Główne ograniczenie opracowanej metody pirenowej wynika z faktu, iż nukleotydy znakowane pirenem absorbują i emitują światło z zakresu bliskiego UV, co może prowadzić do interferencji z fluorescencją badanych ligandów. W niektórych przypadkach problem ten może zostać wyeliminowany poprzez odjęcie tła fluorescencyjnego pochodzącego od wolnego liganda, bądź poprzez przesunięcie długości fal wzbudzania i emisji układu.

Powszechnie stosowane metody przeznaczone do wyznaczania stałych asocjacji kompleksów analog kapu-eIF4E, jak ITC i tsFQT (wykorzystująca wygaszanie emisji tryptofanu) nie wymagają dodatkowego znakowania oddziałujących elementów, jednak posiadają także pewne ograniczenia. Metoda tsFQT może być stosowana jedynie w temperaturze 20°C ze względu na zbyt niską czułość w wyższych temperaturach, podczas gdy PyFLINT-B działa w zakresie temperatur 20–37°C. Ponadto czas potrzebny do wyznaczenia stałych powinowactwa ligandów białka eIF4E jest około 10-krotnie krótszy, a sama metoda PyFLINT-B mniej pracochłonna niż tsFQT. Dlatego też, PyFLINT-B jest odpowiednia do szybkich i wydajnych pomiarów powinowactwa bibliotek ligandów do białka eIF4E. Metody tsFQT i ITC pozwalają z kolei na badanie procesu wiązania z większą precyzją, dlatego też są preferowane w szczegółowych termodynamicznych badaniach oddziaływań kap-eIF4E.

Tabela IV.8. Optymalne warunki stosowania metody fluorescencyjnej, przeznaczonej do wyznaczania stałych powinowactwa ligandów do białka eIF4E, w oparciu o fluorescencję sondy pirenowej (PyFLINT-B).

Skład próbki	Optymalne stężenie sondy (zwykle niższe niż jej K_D)	**A1-1** – 500 nM **A2-1** – 75 nM **A3-1** – 10 nM **A4-1** – 10 nM **B4-1** – 10 nM
	Optymalne stężenie białka (wysycające sygnał fluorescencji sondy w 80%))	**A1-1** – ~1 µM eIF4E **A2-1** – 400 nM eIF4E **A3-1** – 200 nM eIF4E **A4-1** – 75nM eIF4E **B4-1** – 400 nM eIF4E
	Bufor	50 mM HEPES–KOH pH 7,2, zawierający 100 mM KCl i 0,5 mM EDTA

Warunki pomiaru	Długość fali wzbudzania/emisji sondy	345 nm/378 nm
	Punkty temperaturowe	20, 30, 37°C
	Warunki preinkubacji	15 min/300 rpm
	Czas potrzebny do stabilizacji sygnału	**A1-1** – 70 min **A2-1** – 45 min **A3-1** – 25 min **A4-1** – 15 min **B4-1** – 45 min

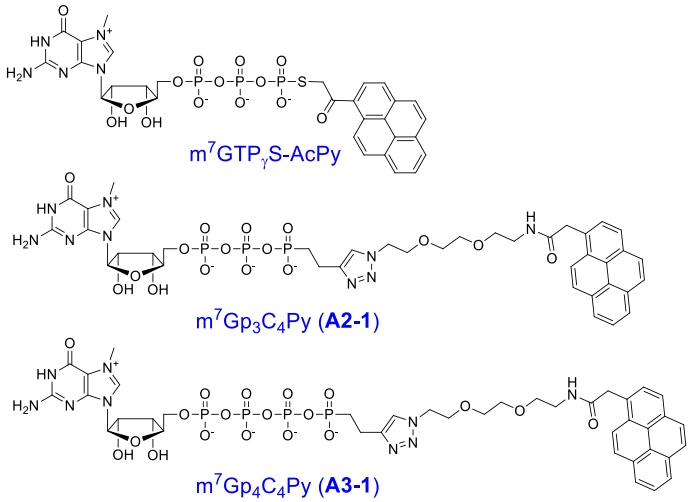
IV.5. Metoda fluorescencyjna do monitorowania degradacji kapu przez DcpS (PyFLINT-HA)

Intensywność fluorescencji mononukleotydowych analogów kapu znakowanych pirenem zmienia się znacznie bardziej w trakcie degradacji sondy przez enzym DcpS, niż wiązania z białkiem eIF4E (dla związku $m^7Gp_3C_4Py$ **A2-1** Q_c = 34,6 i Q_b = 8,1; Tabela IV.1). Otrzymany poprzednio w ramach pracy magisterskiej przez Autorkę analog kapu znakowany acetylopirenem ($m^7GTP_\gamma S$-AcyPy)[177] posiada wartość Q_c = 0,5, co wystarczyło do monitorowania degradacji kapu katalizowanej przez enzym DcpS, jednak czułość sygnału była dużo mniejsza (ok. 17 razy) w porównaniu do $m^7Gp_3C_4Py$. Z tego względu w ramach pracy doktorskiej opracowano metodę fluorescencyjną przeznaczoną do badania aktywności enzymu DcpS, opartą o fluorescencyjne analogi kapu o zwiększonej czułości (PyFLINT-HA – *pyrene-based fluorescence intensity hydrolytic activity assay*).

W celu wyselekcjonowania sondy pirenowej o najbardziej optymalnej strukturze związki **A2-1** i **A3-1** inkubowano w obecności enzymu DcpS o stałym stężeniu. Na podstawie wartości współczynnika Q_c wybrano związek, dla którego przyrost fluorescencji jest największy w trakcie jego degradacji. Warunki metody zoptymalizowano poprzez wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej. Walidacji metody dokonano poprzez wyznaczenie IC_{50} oraz stałych inhibicji K_I dziewięciu znanych inhibitorów DcpS. Ponadto wyznaczono wartość parametru *z* celem zweryfikowania czy zaprojektowana metoda spełnia warunki wysokoprzepustowości. Działanie metody PyFLINT-HA przetestowano także w bardziej skomplikowanych mieszaninach biologicznych, jakimi są cytoplazmatyczne ekstrakty komórkowe HeLa i HEK 293.

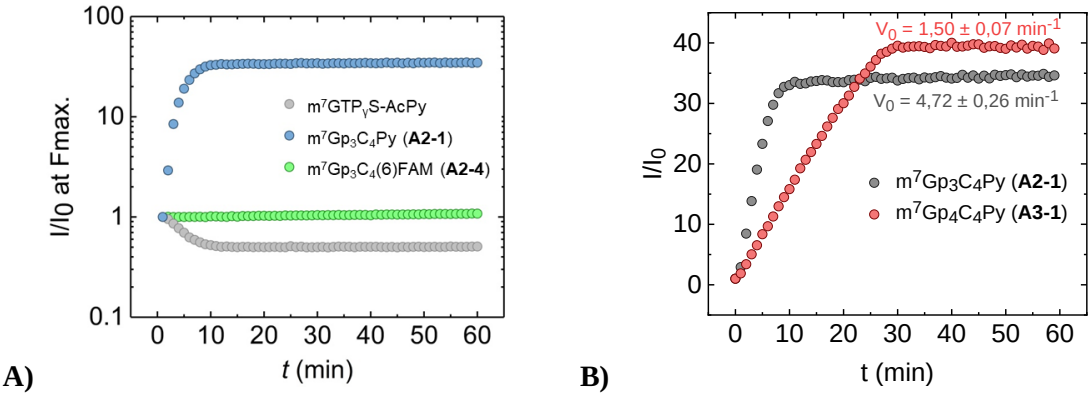
IV.5.1. Optymalizacja struktury sondy w oparciu o czułość sygnału

W poprzednim rozdziale (Rozdział IV.4, Tabela IV.1) fluorescencyjne analogi kapu, zawierające różne znaczniki, scharakteryzowano spektroskopowo oraz przetestowano, czy intensywność fluorescencji ulega zmianie w trakcie inkubacji z enzymem DcpS (sondy FLINT) na skutek degradacji enzymatycznej. Podobnie, jak w przypadku tworzenia kompleksu znakowany kap-eIF4E, jedynie nukleotydy znakowane pirenem (Rys. IV. 57) zmieniały fluorescencję w efekcie degradacji katalizowanej przez DcpS, co wynika z obecności oddziaływań wygaszających pomiędzy zasadą azotową, a pirenem (Rys. IV. 58A).



Rys. IV. 57. Struktury analogów m^{7}G-nukleotydów znakowanych pirenem testowanych, jako potencjalne sondy fluorescencyjne do monitorowania aktywności enzymu DcpS.

Przetestowano także wpływ długości łańcucha fosforanowego na przebieg reakcji enzymatycznej poprzez inkubację związków m^{7}Gp$_3$C$_4$Py (**A2-1**) i m^{7}Gp$_4$C$_4$Py (**A3-1**) w stężeniu 2,5 µM z 10 nM dimeru DcpS (Rys. IV. 58B). Degradacja sondy tetrafosforanowej prowadziła do większej zmiany intensywności fluorescencji w porównaniu do trifosforanowej (Q_c odpowiednio 39,1 i 34,6). Jednak na podstawie wartości prędkości początkowej V_0 stwierdzono, że sonda trifosforanowa **A2-1** jest lepszym substratem dla enzymu DcpS, dlatego też została wyselekcjonowana, jako najbardziej optymalna do opracowania fluorescencyjnej metody PyFLINT-HA. Właściwości spektroskopowe badanych związków scharakteryzowano poprzez pomiar widm absorpcji, emisji oraz wzbudzania fluorescencji, a także obliczenie wydajności kwantowych QY w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,0 w temperaturze 25°C (Tabela IV.9).



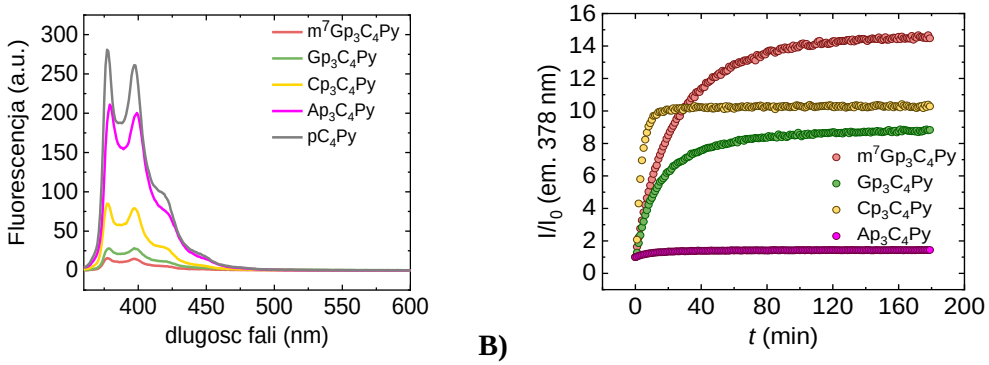
Rys. IV. 58 Porównanie zmian intensywności fluorescencji sond w maksimum emisji (490 nm dla m^{7}GTPγS-AcPy, 378 nm dla m^{7}Gp$_3$C$_4$Py i 523 nm dla m^{7}Gp$_3$C$_4$(6)FAM) w trakcie inkubacji z enzymem DcpS, zawierających różne **A)** znaczniki fluorescencyjne (Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]) lub **B)** długości łańcucha fosforanowego.

Następnie zbadano, czy zmiany intensywności fluorescencji znakowanego pirenem nukleotydu na skutek degradacji są charakterystyczne jedynie dla nukleotydów 7-metyloguanozynowych. W tym celu porównano właściwości fluorescencyjne trifosforanów 7-metyloguanozyny (**A2-1**), guanozyny (Gp$_3$C$_4$Py), cytydyny (Cp$_3$C$_4$Py) oraz adenozyny (Ap$_3$C$_4$Py), a także *C*-fosfonianu butynylowego (pC$_4$Py) znakowanych pirenem (Rys. IV.7). Widma absorpcji i emisji 2,5 µM roztworów wymienionych związków zostały zarejestrowane w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,0 w temperaturze 25°C (Rys. IV.59A). Porównanie wykazało, że 7-metyloguanozyna i guanozyna (sonda **A2-1** i Gp$_3$C$_4$Py) są najsilniejszymi wygaszaczami fluorescencji pirenu. Cytydyna (sonda Cp$_3$C$_4$Py) również wykazywała właściwości wygaszające, choć słabsze niż m^{7}G, podczas gdy adenozyna (sonda Ap$_3$C$_4$Py) tylko nieznacznie wygasza fluorescencję pirenu. Aby dodatkowo potwierdzić tę obserwację w kolejnym eksperymencie

1 µM roztwory trifosforanów inkubowano w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,0 z 5 mM $MgCl_2$ i 0,1 µg/ml fosfodiesterazy z jadu węża (PDE-I) w temperaturze 30°C wraz z rejestracją zmian intensywności fluorescencji w odstępach czasowych co 1 min (Rys. 59B). Z uzyskanych przebiegów zmian fluorescencji w czasie obliczono współczynniki Q_c (Tabela IV.9). Na podstawie wyników można stwierdzić, że wszystkie badane nukleotydy znakowane pirenem, z wyjątkiem nukleotydu adenozynowego, wykazują zdolność do wygaszania fluorescencji pirenu, przez co mogą posłużyć do badań wielu białek specyficznych dla nukleotydów.

Tabela IV.9. Właściwości spektroskopowe analogów nukleotydów znakowanych pirenem. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	Absorpcja λ_{max} (nm)	Emisja λ_{max} (nm)	QY (%)	$Q_{c,\ DcpS}$	$Q_{c,\ PDE\text{-}I}$
$m^7GTP_\gamma S$-AcPy	282, 369	388, 410, 475	b.d.	0,5	b.d.
$m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**)	330, 345	378, 398	2,00 ± 0,07 (QS)	34,6	14,5
$m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**)	330, 345	378, 398	2,68 ± 0,09 (QS)	39,1	b.d.
Gp_3C_4Py	330, 345	378, 398	4,92 ± 0,17 (QS)	b.d.	8,8
Cp_3C_4Py	330, 345	378, 398	4,16 ± 0,14 (QS)	b.d.	10,3
Ap_3C_4Py	330, 345	380, 399	37,6 ± 1,3 (QS)	b.d.	1,4

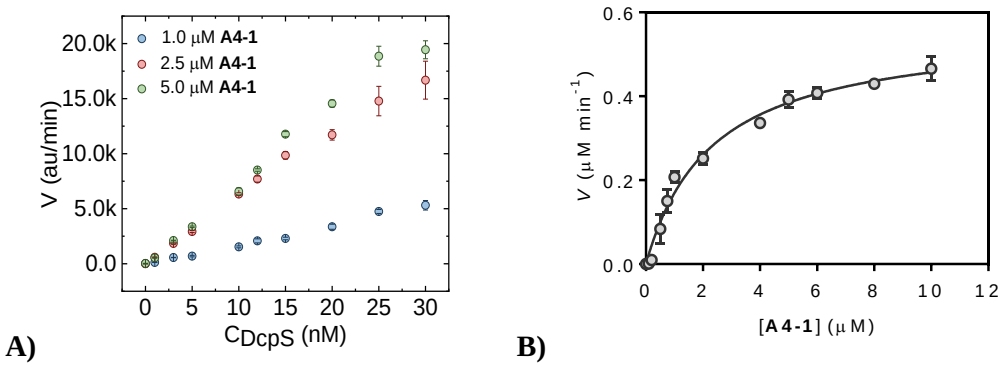


Rys. IV. 59. Charakterystyka analogów nukleotydów znakowanych pirenem, zawierających różne zasady azotowe: **A)** Widma emisji fluorescencji 2,5 µM roztworów nukleotydów w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,0; **B)** zmiany intensywności fluorescencji nukleotydów w 378 w obecności 0,1 µg/ml fosfodiesterazy PDE-I w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,0, zawierającym 5 mM $MgCl_2$. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

IV.5.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji degradacji sondy przez DcpS

Trifosforan 7-metyloguanozyny znakowany pirenem (**A2-1**) został wyselekcjonowany do opracowania metody fluorescencyjnej, przeznaczonej do monitorowania aktywności enzymu degradacji kapu DcpS (PyFLINT-HA). W celu zoptymalizowania warunków reakcji wykonano dwa eksperymenty. W pierwszym z nich przeprowadzono reakcję hydrolizy sondy **A2-1** w stężeniu 1, 2,5 i 5 µM w obecności różnych stężeń DcpS (0–30 nM; Rys. IV. 60A). Następnie wyznaczono parametry kinetyczne reakcji degradacji sondy **A2-1** w temperaturze 30°C, takie jak: stała Michaelisa-Menten K_M, prędkość maksymalna V_{max}, stała katalityczna k_{cat} oraz wydajność katalityczna reakcji zdefiniowana, jako k_{cat}/K_M (Rys. IV. 60B; Tabela IV.10). W tym celu zmierzono prędkości początkowe V reakcji degradacji różnych stężeń sondy **A2-1** (0,1, 0,2, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 5, 6 i 10 µM) przez 10 nM DcpS (dimer) w temperaturze 30°C. Wszystkie eksperymenty z udziałem DcpS przeprowadzono w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 7,6, zawierającym 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA wraz z punktową detekcją intensywności

fluorescencji (λ_{exc} = 345 nm, λ_{em} = 378 nm), co 1 minutę z użyciem czytnika płytek. Postęp reakcji był zgodny ze standardową kinetyką Michaelisa-Menten. W oparciu o uzykane wyniki optymalne warunki dla metody PyFLINT-HA ustalono na 5 µM sondy **A2-1** (wartość zbliżona do K_M, wynoszącego 2,32 ± 0,32 µM) oraz 10 nM dimeru DcpS.



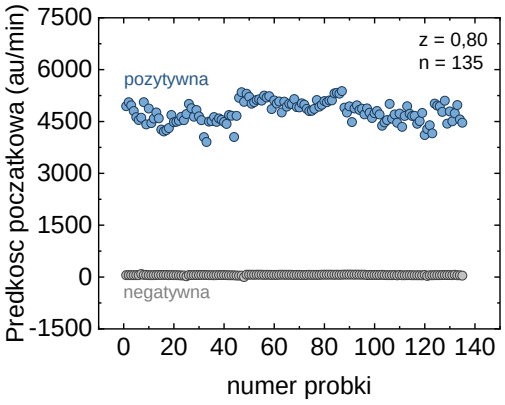
Rys. IV. 60. A) Zależność prędkości początkowej reakcji od stężenia dimeru DcpS w trakcie hydrolizy sondy **A2-1** (1, 2,5 lub 5 µM); **B)** zależność prędkości początkowej reacji degradacji od stężenia sondy **A2-1**. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

Tabela IV.10. Zestawienie obliczonych parametrów kinetycznych reakcji degradacji sondy **A2-1** przez DcpS w temperaturze 30°C.

K_M (µM)	2,32 ± 0,23
V_{max} (µM min^{-1}) **(µmol min^{-1} mg^{-1})**	0,563 ± 0,019 1,318 ± 0,044
k_{cat} (s^{-1})	0,469 ± 0,016
k_{cat}/K_M (s^{-1} µM^{-1})	0,202 ± 0,021

IV.5.3. Walidacja metody

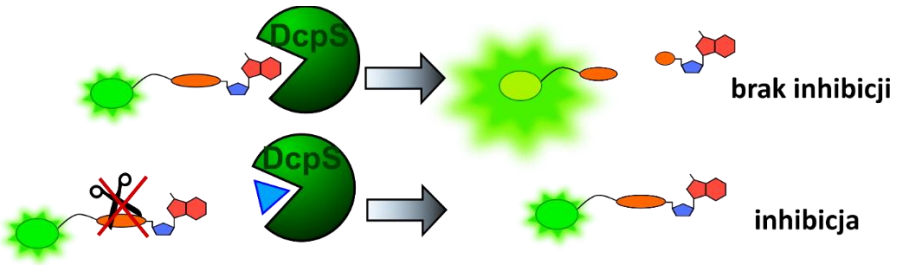
W celu walidacji metody PyFLINT-HA i weryfikacji jej użyteczność w eksperymentach HTS przeprowadzono eksperyment mający na celu wyznaczenie parametru *z*. W tym celu wykonano 135 powtórzeń kontroli pozytywnej oraz negatywnej, dla których zarejestrowano zmiany fluorescencji w czasie inkubacji sondy **A2-1** i DcpS w zoptymalizowanych warunkach, odpowiednio przy braku lub w obecności inhibitora DcpS (m^7GDP, 200 µM) w temperaturze 30°C. Obliczona wartość parametru *z* wynosiła 0,8, co oznacza, że metodę można z powodzeniem stosować w wysokoprzepustowych testach przesiewowych.



Rys. IV. 61. Wyznaczanie parametru *z* metody PyFLINT-HA w temperaturze 30°C z użyciem sondy $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**). Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

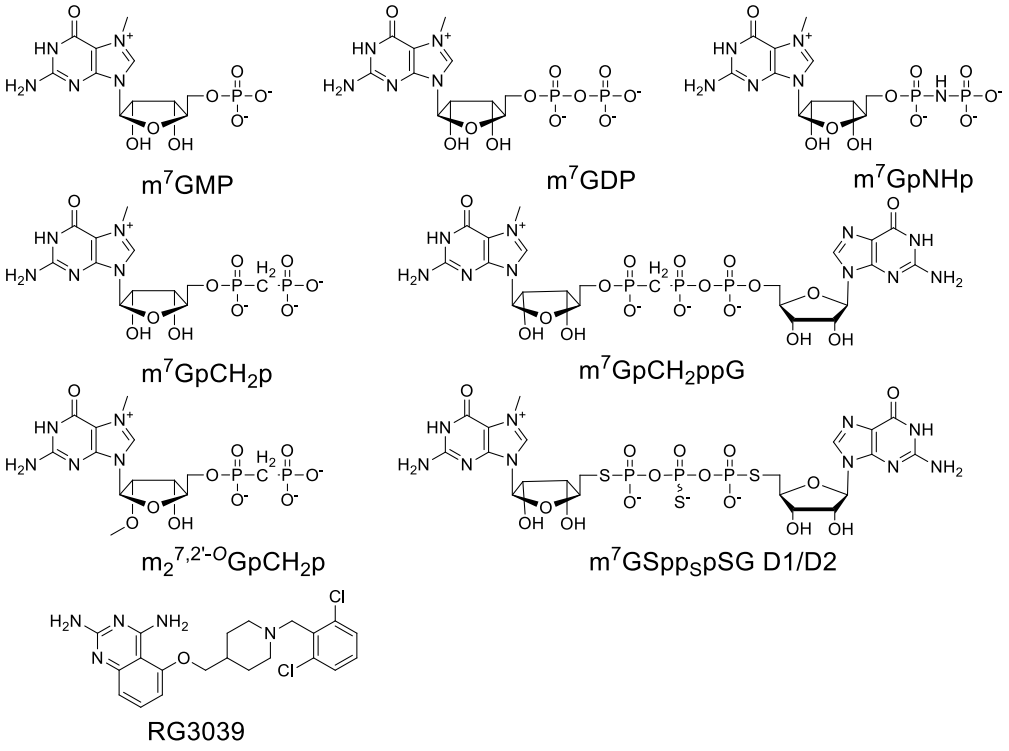
IV.5.4. Wyznaczanie IC_{50} i K_I serii inhibitorów DcpS

Metodę PyFLINT-HA (Rys. IV. 62) zastosowano następnie do scharakteryzowania znanych inhibitorów enzymu DcpS o strukturach nukleotydowych, takich jak: m^7GMP, m^7GDP, m^7GpNHp, m^7GpCH_2p, $m_2^{7,2'\text{-}O}GpCH_2p$, m^7GpCH_2ppG, m^7GSpp_SpSG D1 i m^7GSpp_SpSG D2 oraz nienukleotydowego RG3039 (Rys. IV. 63).

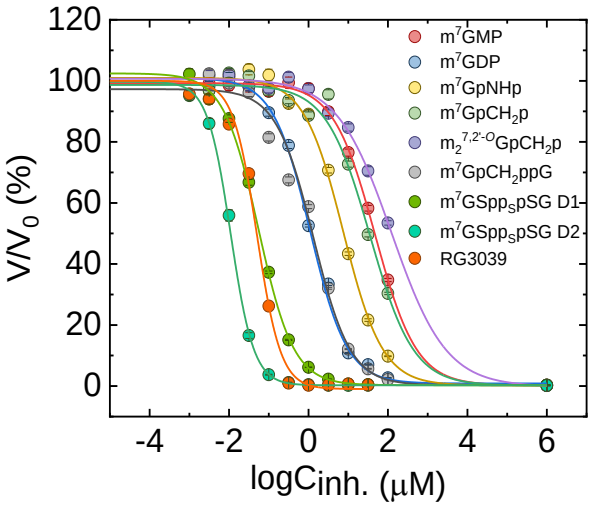


Rys. IV. 62. Schemat działania metody PyFLINT-HA dla białka DcpS.

Prędkości początkowe dla reakcji degradacji katalizowanej przez DcpS odłożono w funkcji logarytmu ze stężenia inhibitora, do której dopasowano czteroparametrowe równianie (21) (przyjmując zmienny współczynnik Hilla *p*, Rys. IV. 64). Wyznaczone wartości IC_{50} wszystkich badanych inhibitorów wynosiły od 11 nM do 47µM (Tabela IV.11), a współczynnika Hilla *p* od -1,5 do -0,8. Korzystając z równania Cheng-Prusoff obliczono także stałe inhibicji K_I na podstawie IC_{50}. Wszystkie otrzymane wartości IC_{50} były zgodne z danymi literaturowymi[121, 177, 304] (z wyjątkiem $m_2^{7,2'\text{-}O}GpCH_2p$, który nie był wcześniej charakteryzowany).



Rys. IV. 63. Struktury badanych inhibitorów enzymu DcpS.



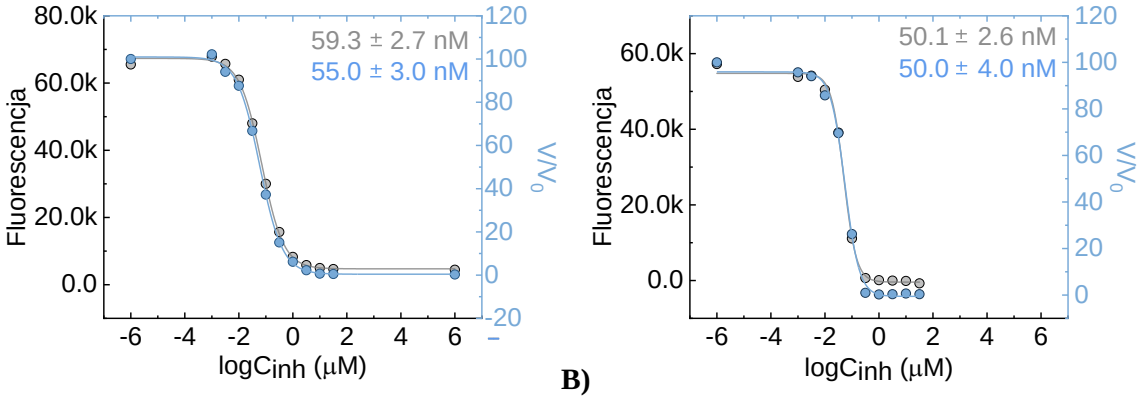
Rys. IV. 64. Krzywe inhibicji badanych 9 inhibitorów enzymu DcpS, otrzymane z użyciem metody PyFLINT-HA z sondą **A2-1** w temperaturze 30°C. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

Tabela IV.11. Zestawienie wartości IC_{50} oraz K_I serii wybranych inhibitorów enzymu DcpS, wyznaczonych metodą PyFLINT-HA wraz z danymi literaturowymi. Wartości w nawiasie zostały wyznaczone w ekstraktach komórkowych (kolejny rozdział IV.5.5).

Inhibitor	IC_{50} (μM)	K_I (μM)	*p*	IC_{50} lit. (μM)
m^7GMP	47,0 ± 1,3	14,90 ± 0,03	-0,83 ± 0,02	97 ± 21[a], [304] 64 ± 10[b], [177]
m^7GDP	1,10 ± 0,21 (1,56 ± 0,07)	0,35 ± 0,04	-0,93 ± 0,08	5,2 ± 1,2[a], [304] 2,5 ± 0,4[b], [177]
m^7GpNHp	7,50 ± 0,45	2,38 ± 0,04	-0,88 ± 0,02	18,0 ± 4,0[b], [177]
m^7GpCH_2p	35,0 ± 3,5	11,11 ± 0,09	-0,79 ± 0,07	24,3 ± 4,9[b], [177]
$m_2^{7,2'-O}GpCH_2p$	122,5 ± 8,0	38,8 ± 0,06	-0,63 ± 0,04	b.d.
m^7GpCH_2ppG	1,32 ± 0,18	0,42 ± 0,04	-0,93 ± 0,06	4,0 ± 1,1[a], [304]
$m^7GSppSpSG$ D1	0,055 ± 0,003	0,018 ± 0,003	-0,98 ± 0,02	0,21 ± 0,04[a], [121]
$m^7GSppSpSG$ D2	0,011 ± 0,001 (0,0026 ± 0,0002)	0,0035 ± 0,0007	-1,48 ± 0,04	0,0430 ± 0,0080[a], [121]
RG3039	0,050 ± 0,004	0,017 ± 0,003	-1,44 ± 0,15	0,048 ± 0,010[a], [121]

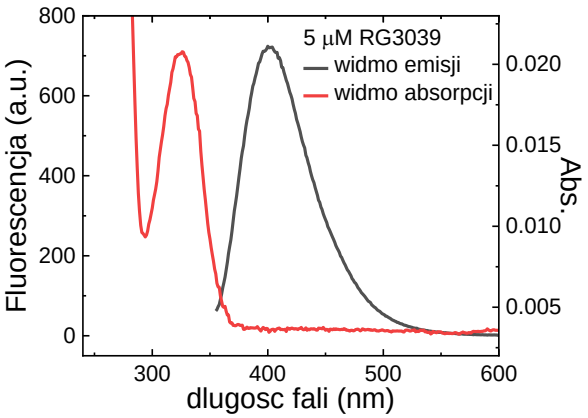
[a] wartość wyznaczona metodą wykorzystującą uwalnianie jonów fluorkowych[121, 304]
[b] wartość wyznaczona metodą wykorzystującą analog kapu znakowany acetylopienem $m^7GTP_\gamma S$-AcPy[177]

Metodę PyFLINT-HA można stosować także do wyznaczania IC_{50} poprzez pomiar intensywności fluorescencji układu w jednym, wybranym punkcie czasowym. Najbardziej optymalny czas odczytu wynosi 10 min od czasu rozpoczęcia reakcji. Obliczone w ten sposób IC_{50} były zbliżone do tych, wyznaczonych w podejściu pomiaru prędkości początkowych (Rys. IV. 65).



Rys. IV. 65. Porównanie krzywych inhibicji oraz wartości IC_{50} wyznaczonych korzystając z zarejestrowanych prędkości początkowych (niebieski), bądź pojedynczej intensywności fluorescencji w wybranym punkcie czasowym 10 min (szary) dla wybranych inhibitorów enzymu DcpS: **A)** m^7GSpp_SpSG D1 i **B)** RG3039. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

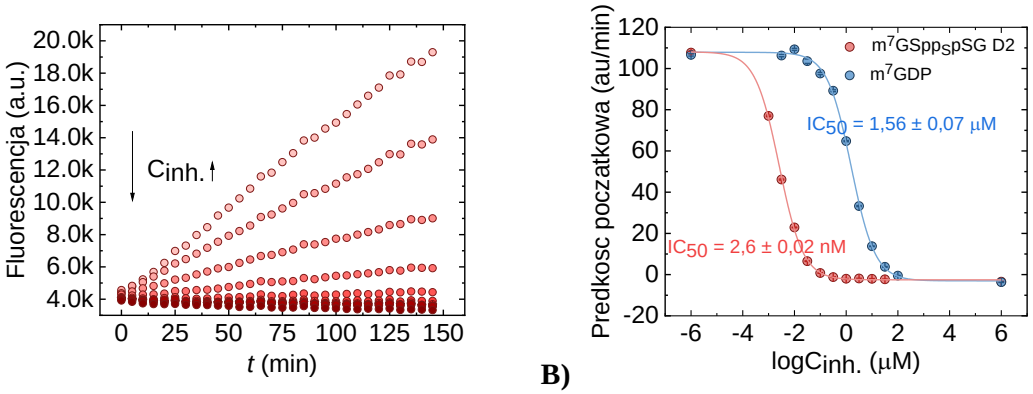
Do tej pory zaprezentowane zostały badania inhibitorów o strukturze nukleotydowej, które nie absorbują ani nie emitują przy długościach fali charakterystycznych dla pirenu (300–350 nm). Jednak sama metoda PyFLINT-HA powinna być także możliwa do zastosowania w badaniach cząsteczek organicznych o właściwościach podobnych do leków. Emisja pirenu znajduje się w zakresie bliskiego UV, z tego względu należy upewnić się, czy badane inhibitory nie posiadają własnej emisji, interferującej z fluorescencją sondy pirenowej. Aby zweryfikować czy fluorescencja inhibitora uniemożliwia jego analizę metodą PyFLINT-HA wyznaczono wartość IC_{50} silnego inhibitora DcpS – RG3039,[116, 117, 119] którego absorpcja i emisja znajduje się w zakresie UV (Rys. IV.66). Pomimo interferencji fluorescencji sondy pirenowej z emisją RG3039, nadal możliwe jest wyznaczenie wartości IC_{50} korzystając z metody prędkości początkowych. Emisja RG3039 zwiększa tło fluorescencji jednak nie wpływa na przyrost emisji pirenu. Obliczona wartość IC_{50} RG3039 jest zgodna z literaturą (Tabela IV.11; 0,050 nM versus 0,048 nM).[121] Analiza intensywności fluorescencji w danym punkcie czasowym także może zostać zastosowana po odjęcia tła fluorescencji, pochodzącego od RG3039 (Rys. IV. 65B).



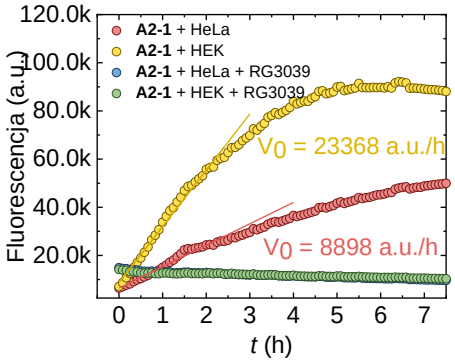
Rys. IV. 66. Widma absorpcji i emisji fluorescencji 5 μM roztworu inhibitora DcpS – RG3039 w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 7,6, zawierającym 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA w temperaturze 30°C. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

IV.5.5. Monitorowanie degradacji sondy w ekstraktach komórkowych

W ostatnim etapie badań nad metodą PyFLINT-HA sprawdzono, czy możliwe jest jej stosowanie także w bardziej skomplikowanych mieszaninach biologicznych, jakimi są ekstrakty komórkowe. W tym celu zbadano degradację sondy **A2-1** w stężeniu 5 µM w cytoplazmatycznym ekstrakcie białkowym z komórek HeLa przy braku oraz w obecności inhibitora m^7GDP lub m^7GSpp$_S$pSG D2 w różnych stężeniach (Rys. IV. 67). Zmiany intensywności fluorescencji w trakcie eksperymentu mierzono w odstępach czasowych 5 minut. W przypadku braku inhibitora intensywność fluorescencji rosła w czasie na skutek degradacji sondy przez enzymy obecne w lizacie. Otrzymane wartości IC_{50} (1,56 ± 0,07 µM dla m^7GDP i 2,6 ± 0,2 nM dla m^7GSpp$_S$pSG D2) są zgodne z tymi, uzyskanymi dla rekombinowanego DcpS (odpowiednio 1,10 ± 0,21 µM oraz 11,0 ± 1,0 nM), co sugeruje, że za degradację sondy w ekstraktach odpowiada endogenny DcpS. Zaobserwowano także, że IC_{50} m^7GSpp$_S$pSG D2 jest niższe w lizacie niż z rekombinowanym DcpS. Przypuszczalnie jest to efektem niższego stężenia DcpS w lizacie komórkowym, niż w metodzie z białkiem rekombinowanym. Potwierdzono także, że inhibicja enzymów degradujących kap możliwa jest również do monitorowania w ekstraktach z innych linii komórkowych HEK 293 (ang. *human embryonic kidney 293 cells*). Dzieląc rejestrowany sygnał fluorescencji przez całkowite stężenie białek możliwe jest porównanie aktywności enzymów degradujących kap w różnych ekstraktach komórkowych przy pomocy opracowanej metody PyFLINT-HA (Rys. IV. 68).



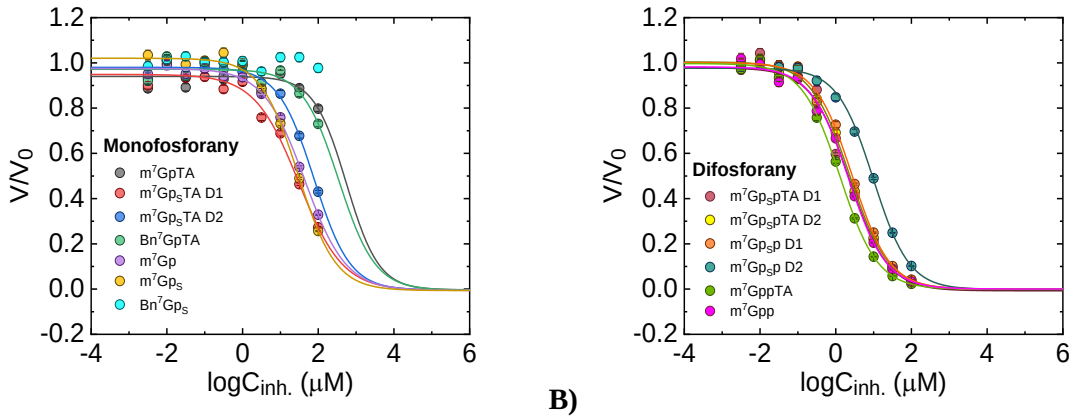
Rys. IV. 67. A) Zmiany intensywności fluorescencji sondy **A2-1** zarejestrowane w obecności rosnących stężeń inhibitora m^7GSpp$_S$pSG D2 w lizacie cytoplazmatycznym z komórek HeLa; **B)** Krzywe inhibicji m^7GSpp$_S$pSG D2 i m^7GDP wyznaczone dla 5 µM sondy **A2-1** w obecności 10 µl lizatu cytoplazmatycznego z komórek HeLa. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]



Rys. IV. 68. Porównanie hydrolizy sondy **A2-1** w ekstraktach cytoplazmatycznych z komórek HeLa i HEK przy braku inhibitora oraz w obecności inhibitora DcpS – RG3039. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

IV.5.6. Zastosowanie metody do rutynowych pomiarów inhibicji DcpS

Podobnie jak w przypadku metody przeznaczonej do wyznaczania stałych asocjacji kompleksów kap-eIF4E (PyFLINT-B), metoda PyFLINT-HA, ze względu na wysoką czułość i wysokoprzepustowość, jest stosowana w Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT UW) do rutynowych pomiarów inhibicji aktywności enzymu DcpS. Przykładem tego typu charakterystyki jest opisana w podrozdziale IV.4.6 biblioteka mononukleotydowych analogów kapu modyfikowanych tryptaminą poprzez terminalną resztę fosforanową. Stosując optymalne warunki metody PyFLINT-HA (5 µM sondy **A2-1**, 10 nM DcpS, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, temperatura 30°C) wyznaczono wartości IC_{50} oraz stałych inhibicji K_I wspomnianych analogów (Rys. IV.69, Tabela IV.12).



Rys. IV. 69. Krzywe inhibicji mononukleotydowych analogów kapu: **A)** mono- i **B)** difosforanów, modyfikowanych tryptaminą oraz wybranych kontroli, otrzymane metodą PyFLINT-HA.

Tabela IV.12. Zestawienie wartości IC_{50} oraz K_I serii mononukleotydowych analogów kapu modyfikowanych tryptaminą oraz ich niemodyfikowanych odpowiedników, wyznaczonych metodą PyFLINT-HA.

Związek	IC_{50}(µM)	K_I (µM)	*p*
m^7GpTA	> 100 µM	> 100 µM	b.d.
m^7GpSTA D1	30,6 ± 6,0	9,7 ± 3,4	0,72 ± 0,09
m^7GpSTA D2	78,2 ± 11,7	24,8 ± 6,8	0,89 ± 0,12
bn^7GpTA	> 100 µM	> 100 µM	b.d.
m^7Gp	43,8 ± 3,5	13,9 ± 2,4	0,81 ± 0,05
m^7GpS	29,2 ± 2,6	9,2 ± 1,7	0,90 ± 0,06
bn^7GpS	> 100 µM	> 100 µM	b.d.
$m^7GpSpTA$ D1	2,0 ± 0,3	0,64 ± 0,16	0,85 ± 0,08
$m^7GpSpTA$ D2	2,4 ± 0,1	0,75 ± 0,11	0,86 ± 0,04
m^7GpSp D1	2,7 ± 0,2	0,86 ± 0,15	0,86 ± 0,05
m^7GpSp D2	9,1 ± 0,4	2,9 ± 0,4	0,83 ± 0,03
m^7GppTA	1,3 ± 0,1	0,41 ± 0,07	0,88 ± 0,05
m^7GDP	2,1 ± 0,2	0,66 ± 0,14	0,80 ± 0,06

Zgodnie z oczekiwaniami analogi difosforanów są silniejszymi inhibitorami w porównaniu do monofosforanów, a nukleotydy zawierające atom siarki inhibują silniej niż ich niemodyfikowane odpowiedniki.[174]

IV.5.7. Podsumowanie

W oparciu o zaobserwowane zmiany intensywności fluorescencji analogów kapu znakowanych pirenem, wynikających z obecności oddziaływań wygaszających piren – 7-

metyloguanozyna, opracowano metodę fluorescencyjną, przeznaczoną do badania inhibicji aktywności enzymu degradacji kapu DcpS w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych (parametr $z = 0,8$). Zaprezentowany układ umożliwia przeprowadzenie badań nad inhibicją DcpS także w ekstraktach komórkowych, monitorując przebieg reakcji w czasie rzeczywistym. Sondę **A2-1** porównano z opisanym wcześniej analogiem $m^7GTP_\gamma S$-AcPy[299] i stwierdzono, że metoda jest około 20 razy bardziej czuła. Ponadto wysokie stężenie sondy pirenowej $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**; 5 μM) w dużym stopniu pozwala na wyznaczanie parametrów inhibicji w obecności interferencji fluorescencji liganda.

W literaturze znane są metody FLINT do badań aktywności DcpS oparte o sondy nukleotydowe generujące sygnał analityczny. Przykładem jest metoda HTS wykorzystująca monfluorofosforan 7-metyloguanozyny, jako substrat reakcji degradacji oraz chemicznie modyfikowaną fluoresceinę.[167] Jednakże metoda ta nie pozwala na monitorowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym, a jej parametr z jest stosunkowo niski (0,63).

Tabela IV.13. Optymalne warunki stosowania metody fluorescencyjnej, przeznaczonej do wyznaczania stałych inhibicji inhibitorów enzymu DcpS, w oparciu o zmiany fluorescencji sondy pirenowej **A2-1** w czasie (PyFLINT-HA).

Skład próbki	Optymalne stężenie sondy	**A2-1** – 5 μM
	Optymalne stężenie białka	10 nM DcpS (dimer)
	Bufor	50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający, 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA
Warunki pomiaru	Długość fali wzbudzania/emisji sondy	345 nm/378 nm
	Temperatura pomiaru	30°C
	Warunki preinkubacji	15 min/300 rpm

IV.6. Metoda fluorescencyjna do badań tworzenia kompleksu nukleotyd-DcpS (PyFLINT-B)

Wprowadzenie odpowiedniej modyfikacji chemicznej w obrębie łańcucha oligofosforanowego analogu kapu prowadzi do uodpornienia go na hydrolizę katalizowaną przez enzym DcpS.[168, 169, 174] Tego typu nukleotydy dodatkowo znakowane fluorescencyjnie mogą posłużyć do opracowania metody przeznaczonej do badania miejsca wiążącego enzymu DcpS poprzez wyznaczanie stałych asocjacji. W tym celu zaprojektowano pięć analogów kapu, zawierających modyfkacje α,β-metylenobisfosfonianową, α,β-imidofosforanową oraz α-tiofosforanową. W oparciu o wyniki uzyskane dla białka eIF4E nukleotydy zostały wyznakowane pirenem. Analog o najwyższym powinowactwie do DcpS został zastosowany do opracowania kolejnej metody PyFLINT-B dedykowanej do badania tworzenia kompleksu DcpS–ligand. Działanie metody potwierdzono poprzez wyznaczenie stałych asocjacji ośmiu znanych inhibitorów DcpS, a jej wysokoprzepustowość obliczając parametr z.

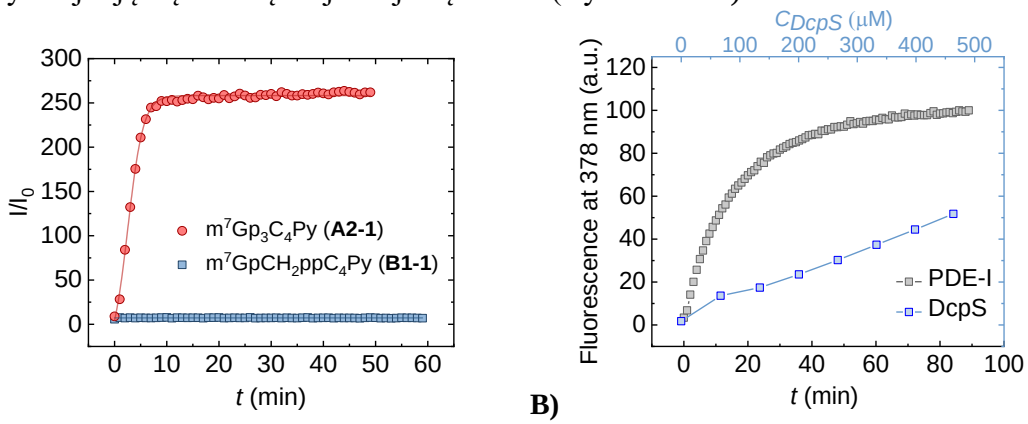
IV.6.1. Charakterystyka spektroskopowa – Seria B

Mononukleotydowe analogi kapu zawierające modyfikacje łańcucha oligofosforanowego oraz znakowane pirenem otrzymane zostały w ramach Serii B (Rozdział IV.3.2). Właściwości spektroskopowe zsyntetyzowanych sond scharakteryzowano poprzez pomiar widm absorpcji, emisji oraz wzbudzania fluorescencji i nie różniły się one od widm pozostałych znakowanych pirenem nukleotydów (Tabela IV. 14). Korzystając ze zmierzonych widm obliczono także wydajności kwantowe QY stosując metodę pośrednią[298] z siarczanem chininy QS, jako wzorcem (Tabela IV. 14). Niskie wartości QY świadczyły o obecności oddziaływań wygaszających pomiędzy 7-metyloguanozyną, a pirenem.

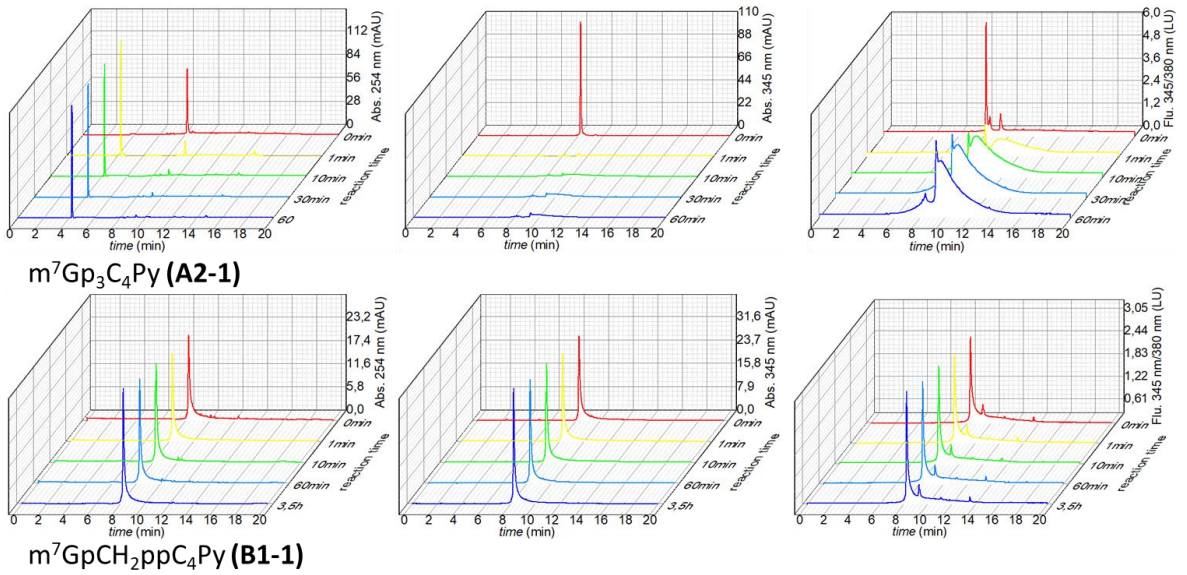
Tabela IV.14. Właściwości spektroskopowe analogów m^7G-nukleotydów znakowanych pirenem. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	Absorpcja λ_{max} (nm)	Emisja λ_{max} (nm)	QY (%)
$m^7GpCH_2ppC_4Py$ (**B1-1**)	330, 345	378, 398	1,07 ± 0,04
$m^7GpCH_2ppOC_3Py$ (**B2-1**)	330, 345	378, 398	1,41 ± 0,05
$m^7GpNHppOC_3Py$ (**B3-1**)	330, 345	378, 398	0,71 ± 0,02
$m^7Gp_SppOC_3Py$ D1 (**B4-1**)	330, 345	378, 398	0,59 ± 0,02
$m^7Gp_SppOC_3Py$ D2 (**B5-1**)	330, 345	378, 398	0,52 ± 0,02

We wstępnych eksperymentach sondę $m^7GpCH_2ppC_4Py$ (**B1-1**) inkubowano z 10 nM enzymu DcpS (dimer). Brak zmian fluorescencji w czasie w porównaniu do sondy $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) świadczą o odporności **B1-1** na hydrolizę przez DcpS (Rys. IV. 70A), co zostało potwierdzone także poprzez wykonanie profili RP HPLC (Rys. IV. 71). Jednak po dodaniu do mieszaniny kolejnych porcji DcpS zaobserwowano wzrost intensywności fluorescencji na skutek tworzenia kompleksu sonda–DcpS (Rys. IV. 70B). Oznacza to, że sonda $m^7GpCH_2ppC_4Py$ (**B1-1**) może zostać wykorzystana do badań wiązania ligandów z DcpS. Inkubacja sondy z fosfodiesterazą PDE-I powoduje wzrost fluorescencji, korelujący z jej hydrolizą – obserwacja ta ponownie potwierdza, że 7-metyloguanozyna wygasza fluorescencję pirenu, jeżeli obydwa elementy znajdują się w obrębie jednej cząsteczki (Rys. IV. 70B).



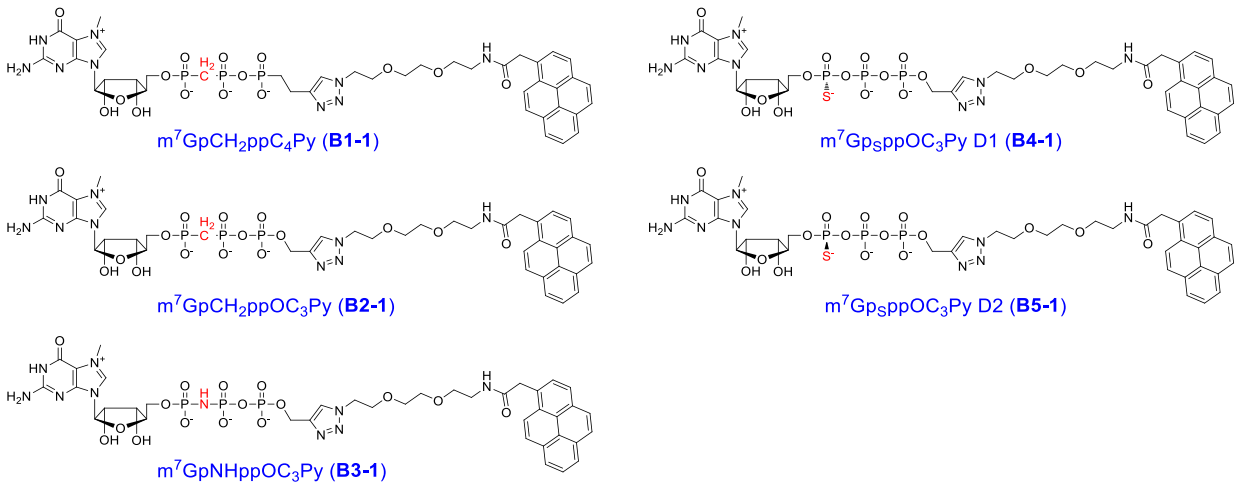
Rys. IV. 70. Porównanie zmian intensywności fluorescencji: **A)** 2,5 μM roztworów sond $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) i $m^7GpCH_2ppC_4py$ (**B1-1**) w trakcie inkubacji z 10 nM DcpS (dimer) oraz **B)** 2,5 μM roztworu sondy **B1-1** w trakcie inkubacji z 5 μg/ml fosfodiesterazy PDE-I lub z rosnącymi stężeniami enzymu DcpS (0–400 nM). Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]



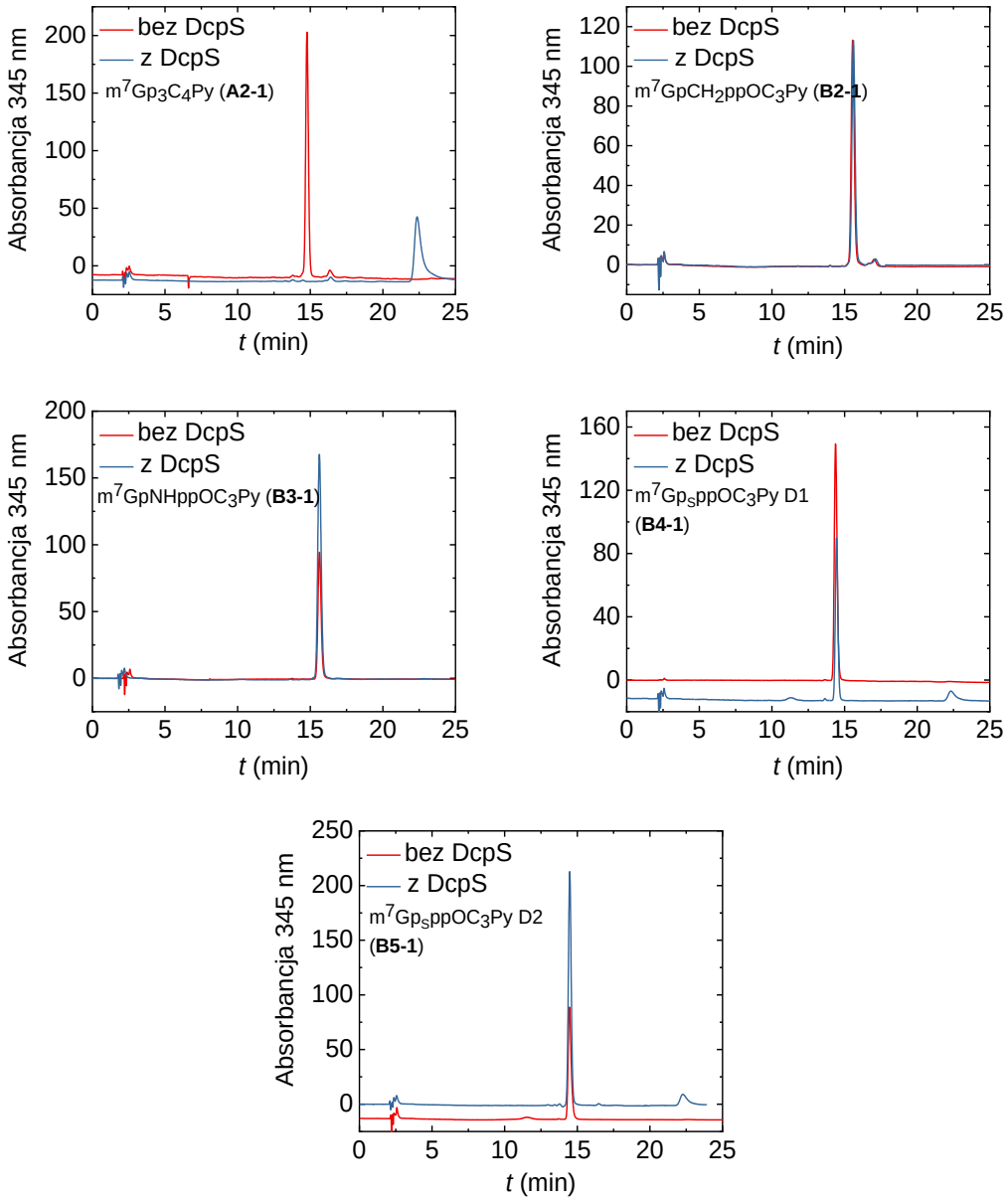
Rys. IV. 71. Porównanie chromatogramów HPLC 10 µM roztworów sond $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) i $m^7GpCH_2ppC_4Py$ (**B1-1**) przed (0 min) oraz po inkubacji (1, 10, 30, 60 min i 3,5 h) z 1 µM DcpS w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 7,6, zawierającym 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA w temperaturze 30°C. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

IV.6.2. Optymalizacja struktury sondy – wyznaczanie K_D kompleksu nukleotyd-DcpS

Celem optymalizacji struktury sondy fluorescencyjnej zsyntetyzowano cztery kolejne m^7G-nukleotydy znakowane pirenem w pozycji terminalnej grupy fosforanowej (związek **B1-1** zawiera resztę *C*-fosfonianową), zawierające dodatkowo modyfikację fosforanów: α,β-metylenobisfosfonianową ($m^7GpCH_2ppOC_3Py$; **B2-1**), α,β-imidofosforanową ($m^7GpNHppOC_3Py$; **B3-1**), bądź α-tiofosforanową (dwa diastereoizomery $m^7Gp_SppOC_3Py$ D1 – **B4-1** i D2 – **B5-1**; Rys. IV. 72). Każda z sond została przetestowana pod kątem podatności na hydrolizę przez DcpS. Porównano chromatogramy RP HPLC związków **B2-1**–**B5-1** oraz $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**) jako kontroli w stężeniu 20 µM, przed oraz po godzinie inkubacji z dużym stężeniem DcpS (150 nM; Rys. IV. 73). Na tej podstawie stwierdzono, że wszystkie otrzymane sondy w Serii B są odporne na degradację przez DcpS.

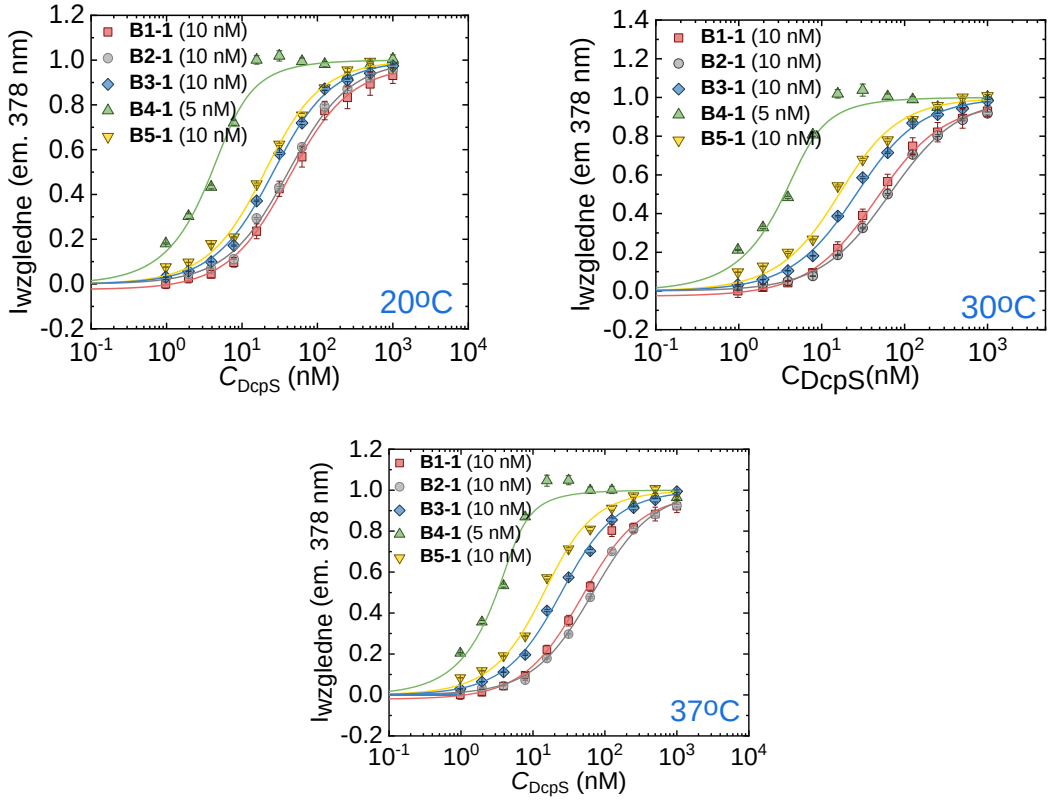


Rys. IV. 72. Struktury sond stosowanych do badań wiązania ligandów z białkiem DcpS.



Rys. IV. 73. Badanie podatności sond **A2-1** oraz **B2-1–B5-1** na degradację katalizowaną przez enzym DcpS za pomocą techniki RP HPLC. Warunki: 20 µM sondy, 150 nM DcpS, bufor 50 mM Tris–HCl o pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, temperatura 30°C. Profile wykonano po 1 h inkubacji. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

W kolejnym eksperymencie sondy **B1-1**–**B5-1** w stałym stężeniu 10 nM lub 5 nM dla **B4-1** ze względu na przypuszczalnie wysokie powinowactwo (stężenie związku powinno być niższe od K_D), były inkubowane z różnymi stężeniami białka DcpS aż do wysycenia sygnału fluorescencji, w temperaturach 20, 30 i 37°C (Rys. IV. 74). Dla wszystkich badanych związków intensywność fluorescencji rosła wraz ze wzrostem stężenia białka tworząc krzywą wiązania, na podstawie, której zostały wyznaczone stałe dysocjacji K_D (Tabela IV. 15). Najniższą wartość K_D (1,47 ± 0,31 nM w 20°C), a zatem największe powinowactwa do białka DcpS otrzymano dla analogu kapu zawierającego modyfikację α-tiofosforanową – $m^7GpSppOC_3Py$ D1 (**B4-1**).

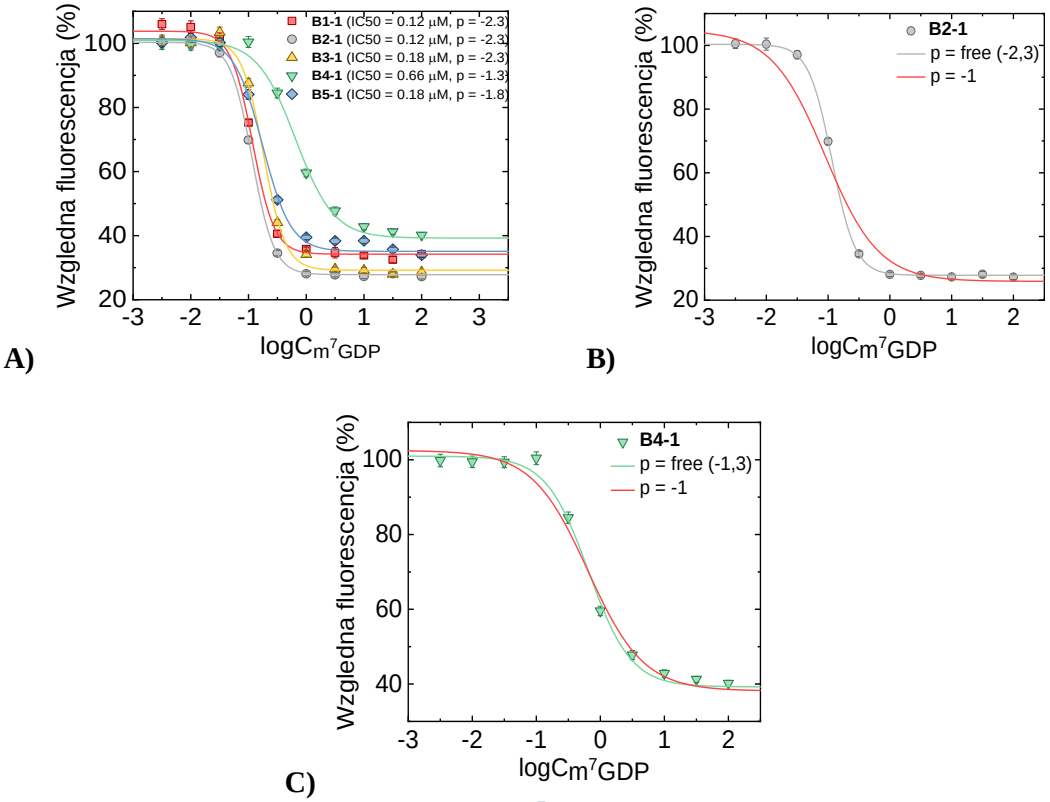


Rys. IV. 74. Krzywe wiązania analogów kapu znakowanych pirenem **B1-1**, **B2-1**, **B3-1**, **B4-1** i **B5-1** do białka DcpS. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD. Obliczone wartości K_D w trzech temperaturach 20, 30 i 37°C zaprezentowano w tabeli IV.15. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

Tabela IV.15. Wyznaczone wartości K_D sond **B1-1**, **B2-1**, **B3-1**, **B4-1** i **B5-1** do białka DcpS. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	K_D w T (nM)		
	20°C	30°C	37°C
$m^7GpCH_2ppC_4Py$ (**B1-1**)	36,9 ± 3,5	40,2 ± 2,7	42,9 ± 5,0
$m^7GpCH_2ppOC_3Py$ (**B2-1**)	36,0 ± 3,5	60,8 ± 6,2	63,2 ± 4,4
$m^7GpNHppOC_3Py$ (**B3-1**)	20,9 ± 2,0	21,0 ± 2,0	19,8 ± 1,6
$m^7GpsppOC_3Py$ D1 (**B4-1**)	1,47 ± 0,31	1,06 ± 0,29	0,67 ± 0,18
$m^7GpsppOC_3Py$ D2 (**B5-1**)	15,0 ± 2,8	11,2 ± 2,1	9,2 ± 2,0

Następnie wszystkie z sond zostały przetestowane w eksperymencie kompetycyjnego wiązania m^7GDP z DcpS w temperaturze 20°C. W celu analizy danych eksperymentalnych wykorzystano czteroparametrowe równanie (4) (przyjmując zmienny współczynnik Hilla *p*; Rys. 75). Wyznaczone wartości IC_{50} zawierały się w przedziale 0,12–0,18 µM dla sond **B1-1–B3-1** oraz 0,66 µM dla **B4-1**. Współczynnik Hilla *p* był najbardziej zbliżony do -1 dla sondy **B4-1** (-1,3), co oznacza, że jej powinowactwo do DcpS jest wystarczające do badań liganów o właściwościach inhibitorowych podobnych do m^7GDP. Współczynnik Hilla jest parametrem informującym o tym czy ligand może być charakteryzowany przez daną sondę. Wysoka wartość *p* może oznaczać, że powinowactwo sondy do białka jest zbyt niskie w porównaniu do powinowactwa liganda,[305] bądź stosunek stężenia białka do K_D liganda jest zbyt wysoki.[306] Oznacza to, że użyteczność sondy może być weryfikowana zarówno poprzez wyznaczenie stałej asocjacji jej kompleksu z DcpS, jak i wyznaczenie współczynnka Hilla badanych ligandów (docelowo zbliżony do -1).

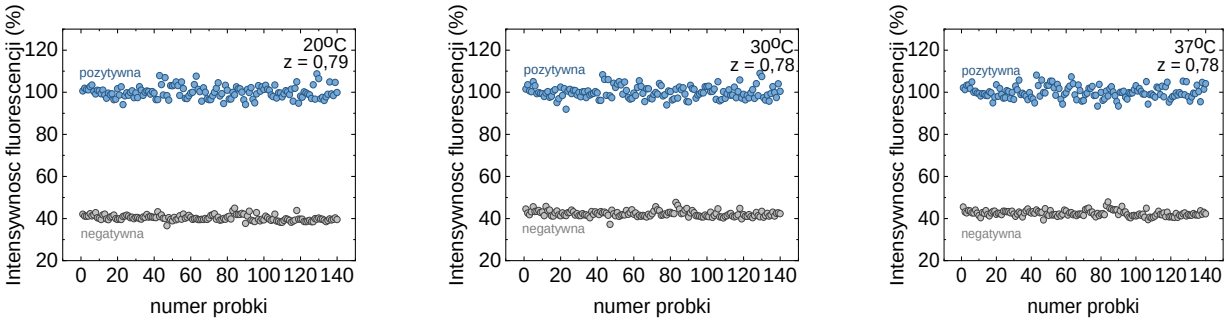


Rys. IV. 75. A) Porównanie krzywych inhibicji m^7GDP do białka DcpS, wyznaczonych z użyciem sond **B1-1**–**B5-1**; Do danych dopasowano równanie (4) z uwolnionym (free) bądź stałym współczynnikiem Hilla *p* za pomocą sondy **B)** $m^7GpCH_2ppOC_3Py$ (**B3-1**) i **C)** $m^7Gp_SppOC_3Py$ D1 (**B4-1**). Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

Ostatecznie stosując sondę pirenową **B4-1** opracowano metodę typu FLINT do wyznaczania stałych powinowactwa ligandów do białka DcpS (PyFLINT-B). Optymalne warunki ustalono na 10 nM sondy **B4-1** – wartość powyżej obliczonego K_D, jednak konieczna do uzyskania wystarczającego sygnału fluorescencji. Ustalone stężenie białka wynosi 75 nM, które wystarcza do uzyskania 80% wysycenia sygnału fluorecencji dla 10 nM sondy.

IV.6.3. Walidacja metody

Analogicznie do metody PyFLINT-B dla białka eIF4E przeprowadzono walidację metody wyznaczania stałych powinowactwa kompleksu kap–DcpS poprzez obliczenie parametru *z* w zoptymalizowanych warunkach.

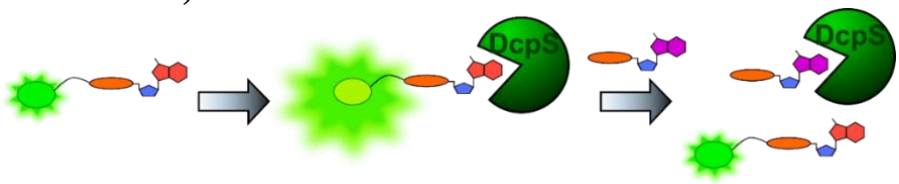


Rys. IV. 76. Wyznaczanie parametru *z* metody badania powinowactwa ligandów do białka DcpS w trzech temperaturach 20, 30 i 37°C z użyciem sondy $m^7Gp_SppOC_3Py$ D1 (**B4-1**). Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

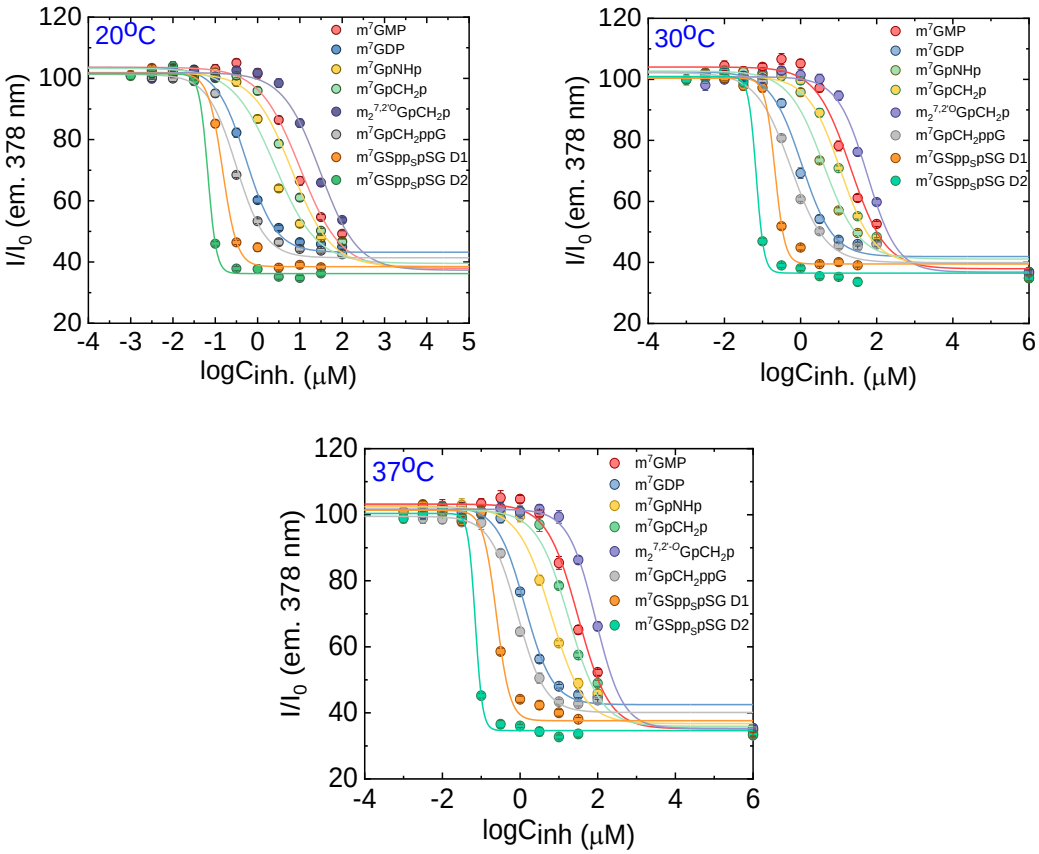
Wykonano 140 pomiarów fluorescencji kontroli pozytywnej (10 nM sondy **B4-1**, 75 nM DcpS) i negatywnej (10 nM sondy **B4-1**, 75 nM DcpS, 100 µM m^7GDP) w temperaturach 20, 30 i 37°C (Rys. IV. 76). Obliczone wartości parametru z wyniosły: 0,79 w 20°C oraz 0,78 w 30°C i 37°C. Zatem opracowaną metodę PyFLINT-B dla białka DcpS można stosować do przeprowadzania eksperymentów HTS.

IV.6.4. Wyznaczanie K_D serii niefluoryzujących nukleotydów

Sonda pirenowa **B4-1** została wyselekcjonowana, jako najbardziej optymalna do przeprowadzenia eksperymentów wiązania kompetycyjnego ośmiu niefluoryzujących inhibitorów DcpS (Rys. IV.77), które scharakteryzowano także metodą PyFLINT-HA – m^7GMP, m^7GDP, m^7GpNHp, m^7GpCH_2p, $m_2^{7,2'-O}GpCH_2p$, m^7GpCH_2ppG, m^7GSpp_SpSG D1 i m^7GSpp_SpSG D2 (Rys. IV. 63). Przy pomocy opracowanej metody PyFLINT-B dla białka DcpS wyznaczono wartości IC_{50} oraz obliczono K_D inhibitorów w trzech temperaturach: 20, 30 i 37°C (Rys. IV. 78, Tabela IV. 16).



Rys. IV. 77. Schemat działania metody PyFLINT-B dla białka DcpS.



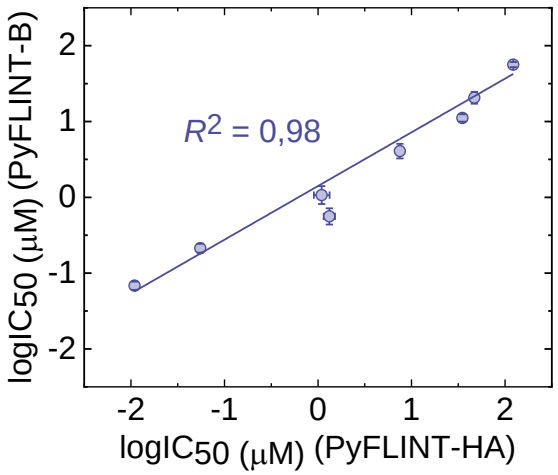
Rys. IV. 78. Krzywe inhibicji badanych 8 inhibitorów enzymu DcpS, otrzymane z użyciem metody PyFLINT-B z sondą **B4-1** w temperaturach 20, 30 i 37°C. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk, et al. 2019.[299]

Tabela IV.16. Porównanie wyznaczonych metodą PyFLINT-B wartości IC_{50} oraz współczynników Hilla *p* ośmiu wybranych inhibitorów enzymu DcpS w temperaturach 20, 30 i 37°C.

Ligand	20°C		30°C		37°C	
	IC_{50} (μM)	*p*	IC_{50} (μM)	*p*	IC_{50} (μM)	*p*
m^7GMP	10,1 ± 1,8	-0,90 ± 0,12	20,6 ± 3,7	-0,95 ± 0,13	31,0 ± 4,1	-1,08 ± 0,13
m^7GDP	0,54 ± 0,12	-1,23 ± 0,28	1,07 ± 0,29	-1,06 ± 0,23	1,32 ± 0,21	-1,20 ± 0,21
m^7GpNHp	2,57 ± 0,60	-0,87 ± 0,15	4,07 ± 0,90	-0,94 ±0,18	6,37 ± 0,83	-1,02 ± 0,15
m^7GpCH_2p	6,37 ± 0,95	-0,93 ± 0,10	11,1 ± 1,2	-1,00 ± 0,11	17,9 ± 2,0	-1,05 ± 0,12
$m_2^{7,2'\text{-}O}GpCH_2p$	30,0 ± 3,2	-0,98 ± 0,09	56,2 ± 4,3	-1,10 ± 0,10	88,0 ± 4,6	-1,23 ± 0,09
m^7GpCH_2ppG	0,31 ± 0,06	-1,26 ± 0,26	0,56 ± 0,14	-0,96 ± 0,22	0,86 ± 0,19	-1,23 ± 0,29
$m^7GSppspSG$ D1	0,15 ± 0,01	-2,5 ± 0,25	0,21 ± 0,03	-3,3 ± 1,0	0,25 ± 0,03	-2,5 ± 0,9
$m^7GSppspSG$ D2	0,067 ± 0,005	-4,3 ± 0,77	0,058 ± 0,009	-4,3 ± 1,3	0,070 ± 0,009	-4,7 ± 1,6

Powinowactwo badanych związków do DcpS jest zgodne z kolejnością, w jakiej inhibują enzym DcpS według danych literaturowych (analog $m_2^{7,\ 2'\text{-}O}GpCH_2p$ nie był dotychczas charakteryzowany).[121, 167, 177] Dla ligandów o nawyższych IC_{50} ($m^7GSppspSG$ D1 i D2) współczynniki Hilla przyjmowały wysokie wartości (odpowiednio -2,5 i -4,3), co oznacza, że ligandy te wiążą się silnie z białkiem w warunkach metody i niezbędne jest użycie sondy o wyższym powinowactwie. Podjęto także próbę wyznaczenia IC_{50} nienukleotydowego liganda RG3039 z użyciem metody PyFLINT-B. W tym przypadku interferencja pochodząca z naturalnej fluorescencji liganda była zbyt wysoka by wyznaczyć wartość IC_{50}. Wynika to z faktu, iż w metodzie badania wiązania stężenie sondy fluorescencyjnej powinno być niższe niż wartość K_D jej kompleksu z białkiem (10 nM). W metodzie PyFLINT-HA stężenie sondy jest 500 razy większe, a zatem jej sygnał fluorescencyjny jest wystarczająco silny aby zniwelować interferencję RG3039.

Wyznaczone metodą PyFLINT-B wartości IC_{50} porównano do IC_{50} otrzymanych metodą badania aktywności DcpS PyFLINT-HA (Tabela IV. 17). Korelacja pomiędzy logarytmami z IC_{50} była liniowa (R^2 = 0,98; Rys. IV. 79), co jest kolejnym potwierdzeniem, że metody zostały zaprojektowane prawidłowo.



Rys. IV. 79. Korelacja logarytmu z wyznaczonych wartości IC_{50} metodą PyFLINT-B (badanie wiązania) z logarytmem z IC_{50} wyznaczonych metodą PyFLINT-HA (badanie inhibicji reakcji enzymatycznej).

Tabela IV.17. Porównanie wartości IC_{50}, K_I oraz K_D serii wybranych inhibitorów enzymu DcpS, wyznaczonych metodą PyFLINT-HA i PyFLINT-B wraz z danymi literaturowymi. Wartości w nawiasie zostały wyznaczone w ekstraktach komórkowych.

Inhibitor	IC_{50} PyFLINT-HA (μM)	K_I Py FLINT-HA (μM)	IC_{50} PyFLINT-B (μM)	K_D Py FLINT-B (μM)	IC_{50} lit. (μM)
m^7GMP	47,0 ± 1,3	14,90 ± 0,03	20,6 ± 3,7	0,30	97 ± 21[b], [304] 64 ± 10[c], [177]
m^7GDP	1,10 ± 0,21 (1,56 ± 0,07)	0,35 ± 0,04	1,07 ± 0,29	0,015	5,2 ± 1,2[b], [304] 2,5 ± 0,4[c], [177]
m^7GpNHp	7,50 ± 0,45	2,38 ± 0,04	4,07 ± 0,90	0,060	18,0 ± 4,0[c], [177]
m^7GpCH_2p	35,0 ± 3,5	11,11 ± 0,09	11,1 ± 1,2	0,16	24,3 ± 4,9[c], [177]
$m_2^{7,2'\text{-}O}GpCH_2p$	122,5 ± 8,0	38,8 ± 0,06	56,2 ± 4,3	0,84	b.d.
m^7GpCH_2ppG	1,32 ± 0,18	0,42 ± 0,04	0,56 ± 0,14	0,0073	4,0 ± 1,1[b], [304]
m^7GSpp_SpSG D1	0,055 ± 0,003	0,018 ± 0,003	0,213 ± 0,028	0,0021	0,21 ± 0,04[b], [121]
m^7GSpp_SpSG D2	0,011 ± 0,001 (0,0026 ± 0,0002)	0,0035 ± 0,0007	0,068 ± 0,009	b.d.[a]	0,0430 ± 0,0080[b], [121]
RG3039	0,050 ± 0,004	0,017 ± 0,003	b.d.	b.d.	0,048 ± 0,010[b], [121]

[a] wartość nie może być wyznaczona, ze względu na ograniczenie metody
[b] wartość wyznaczona metodą wykorzystującą uwalnianie jonów fluorkowych[121, 304]
[c] wartość wyznaczona metodą wykorzystującą analog kapu znakowany acetylopirenem $m^7GTP_\gamma S$-AcPy[177]

IV.6.5. Podsumowanie

W oparciu o zjawisko wygaszania fluorescencji pirenu przez 7-metyloguanozynę opracowano metodę PyLINT-B, przeznaczoną do monitorowania procesu wiązania ligandów z białkiem DcpS. Ze względu na to, że DcpS jest enzymem o aktywności hydrolitycznej sondy fluorescencyjne muszą być odporne na degradację. Spośród testowanych nukleotydów znakowanych pirenem o różnych modyfikacjach chemicznych łańcucha fosforanowego, analog α-tiofosforanowy (izomer S_P) oparty o strukturę m^7GTP (**B4-1**) posiadał najniższą wartość stałej dysocjacji K_D (1,47 ± 0,31 nM w 20°C), przez co był najbardziej odpowiedni do badań wiązania ligandów z DcpS.

Wyznaczone wartości IC_{50} ośmiu wybranych inhibitorów DcpS były zgodne z literaturą.[121, 167, 299] Sonda **B4-1** jest odpowiednia do charakterystyki inhibitorów o powinowactwie zbliżonym do m^7GDP, jednak ze względu na jej zbyt wysokie K_D nie pozwala na zróżnicowanie bardzo silnych inhibitorów DcpS, takich jak 5'-tiofosforanowe analogi kapu (m^7GSpp_SpSG). Silna inhibicja jest widoczna w metodzie PyFLINT-B, jednak wartości IC_{50} mogą być zaburzone. Z powodu interferencji fluorescencji niemożliwe było także wyznaczenie IC_{50} związku RG3039. Strukturę sondy **B4-1** można dalej dopracować w celu zwiększenia powinowactwa do DcpS oraz batochromowego przesunięcia pasma emisji.

W chwili obecnej charakterystyka inhibitorów DcpS jest bardziej efektywna przy użyciu metody PyFLINT-HA, gdyż stosowane stężenie sondy fluorescencyjnej jest 500-razy wyższe niż w PyFLINT-B oraz wyznaczane są prędkości początkowe odpowiadające przyrostowi fluorescencji w czasie, przez co jest ona mniej podatna na interferencje.

Tabela IV.18. Optymalne warunki stosowania metody fluorescencyjnej, przeznaczonej do wyznaczania stałych powinowactwa ligandów do białka DcpS, w oparciu o fluorescencję sondy pirenowej (PyFLINT-B).

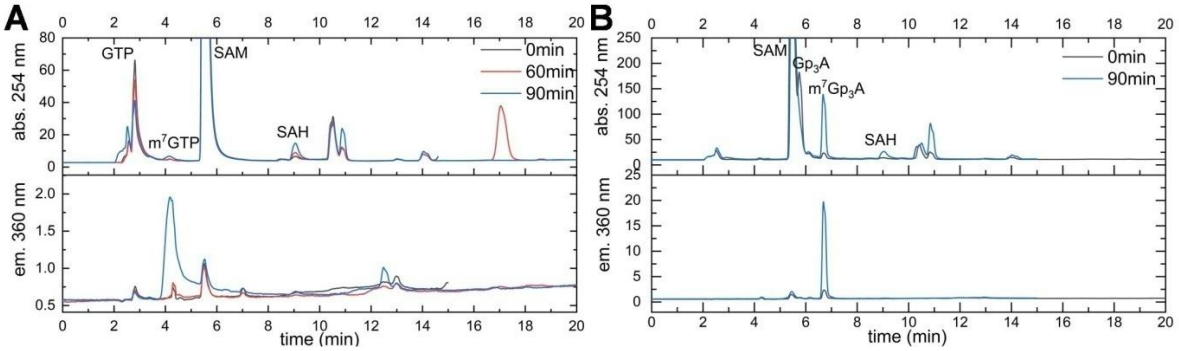
Skład próbki	Optymalne stężenie sondy (zwykle niższe niż jej K_D)	**B1-1** – 10 nM **B2-1** – 10 nM **B3-1** – 10 nM **B4-1** – 10 nM **B5-1** – 10 nM
	Optymalne stężenie białka (wysycające sygnał fluorescencji sondy w 80%)	**B1-1** – 200 nM DcpS (dimer) **B2-1** – 150 nM DcpS (dimer) **B3-1** – 150 nM DcpS (dimer) **B4-1** – 75 nM DcpS (dimer) **B5-1** – 150 nM DcpS (dimer)
	Bufor	50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA
Warunki pomiaru	Długość fali wzbudzania/emisji sondy	345 nm/378 nm
	Punkty temperaturowe	20, 30, 37°C
	Warunki preinkubacji	15 min/300 rpm
	Czas potrzebny do stabilizacji sygnału	**B1-1** – 50 min **B2-1** – 50 min **B3-1** – 50 min **B4-1** – 50 min **B5-1** – 50 min

IV.7. Metoda fluorescencyjna do monitorowania aktywności N7–MTazy (PyFLINT-M)

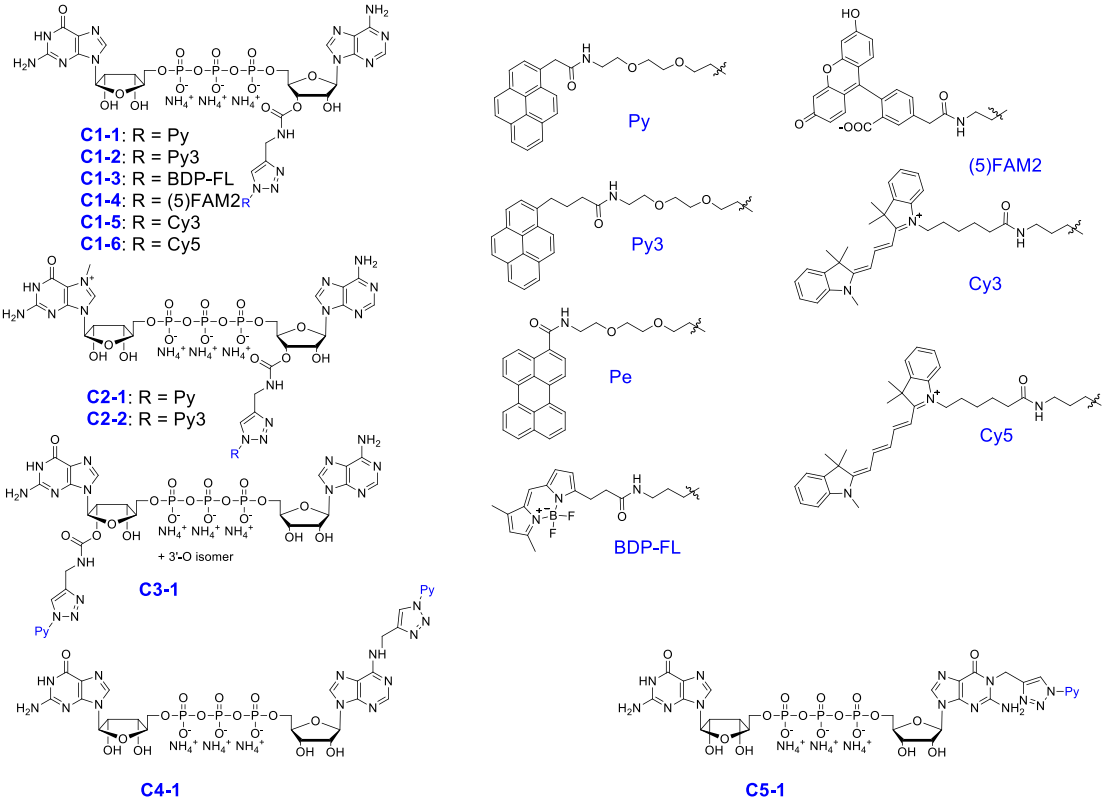
Jednym z etapów biosyntezy kapu jest specyficzna metylacja w pozycji N7 guanozyny, katalizowana przez enzym mRNA kap N7–guanino metylotransferazę (N7–MTaza). Proces ten polega na transferze grupy metylowej (-CH_3) z molekuły *S*-adenozylo-L-metioniny (SAM) na Gppp–kapowane RNA z równoczesnym uwolnieniem *S*-adenozylo-L-homocysteiny. N7–metylotransferazy kodowane są także przez niektóre wirusy, a ich zadaniem jest ułatwienie jego replikacji poprzez kapowanie wirusowego RNA. Inhibitory N7–metylotransferaz mają potencjał terapeutyczny (terapie przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe), jednak ich poszukiwania są utrudnione, gdyż substratami są długie RNA. W literaturze istnieją metody identyfikacji inhibitorów jednak często wykorzystują one pomiary pośrednie oraz skomplikowane układy pomiarowe. Wedle najlepszej wiedzy Autorki w literaturze nie istnieją bezpośrednie metody umożliwiające monitorowanie aktywności N7–metylotransferazy w czasie rzeczywistym z użyciem małocząsteczkowych sond molekularnych.

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki projektu, mającego na celu opracowanie metody fluorescencyjnej do bezpośredniego monitorowania aktywności N7–MTazy, wykorzystującej proste strukturalnie substraty, która umożliwia wysokoprzepustowe

poszukiwania inhibitorów. W projekcie badano trzy modelowe N7–metylotransferazy: ludzkie białko RNMT w kompleksie z podjednostką aktywującą RAM (RNMT-RAM), enzym Ecm1 z pasożyta *Encephalitozoon cuniculi* oraz wirusowy *Vaccinia Capping Enzyme* (VCE). W pierwszej kolejności metodologię rozwinięto dla Ecm1, gdyż jest to białko dobrze opisane w literaturze. Następnie warunki zoptymalizowano dla enzymów RNMT-RAM i VCE. Badania wstępne wykazały, że dinukleotyd jest minimalnym substratem wymaganym do zajścia N7–metylacji (Rys. IV. 80). Dlatego też skupiono się na zaprojektowaniu sond fluorescencyjnych opartych o strukturę Gp_3A oraz Gp_3G, jako potencjalnych substratów będących kompromisem pomiędzy złożonością struktury i akceptowalnością przez enzym. Mononukleotydowe sondy guanozynowe zostały natomiast zastosowane w badaniach białka transglutaminazy II (Rozdział IV.8).



Rys. IV. 80. Porównanie profili RP HPLC z reakcji N7–metylacji **A)** GTP i **B)** Gp_3A, katalizowanej przez Ecm1. Warunki reakcji: 10 µM GTP lub Gp_3A, 1,2 µM Ecm1, 100 µM SAM, 5 mM DTT w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5. Reakcje inkubowano w 37°C i zatrzymywano poprzez 2 min inkubacji w 98°C. Warunki analizy RP HPLC: eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: 50% eluentu A/50% MeOH; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]



Rys. IV. 81. Struktury sond testowanych pod kątem monitorowania reakcji N7–metylacji.

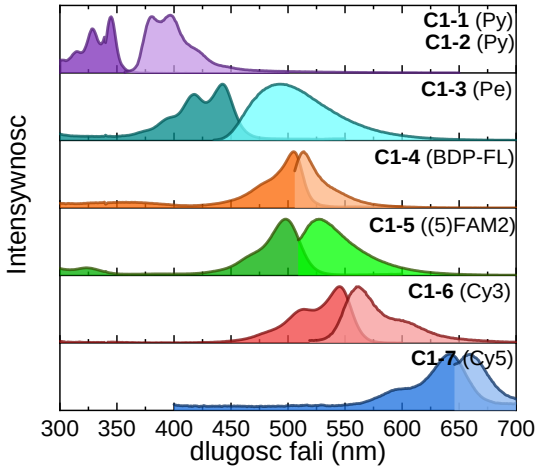
Otrzymano szereg dinukleotydów, różniących się znacznikiem fluorescencyjnym, miejscem podstawienia oraz długością linkera łączącego nukleotyd ze znacznikiem (Rys. IV. 81). Optymalna sonda fluorescencyjna miała wykazywać zmiany intensywności fluorescencji na skutek N7–metylacji. W ramach projektu wyselekcjonowano optymalną sondę fluorescencyjną, którą zastosowano do opracowania metody fluorescencyjnej.

Metylotransferazę Ecm1 stosowaną w badaniach otrzymał i oczyścił dr Mirosław Śmietański w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW. Enzym RNMT-RAM otrzymano od prof. Victorii Cowling z Uniwersytetu w Dundee, natomiast VCE został zakupiony w New England BioLabs.

IV.7.1. Charakterystyka spektroskopowa (Seria C) i optymalizacja struktury sondy w oparciu o czułość sygnału

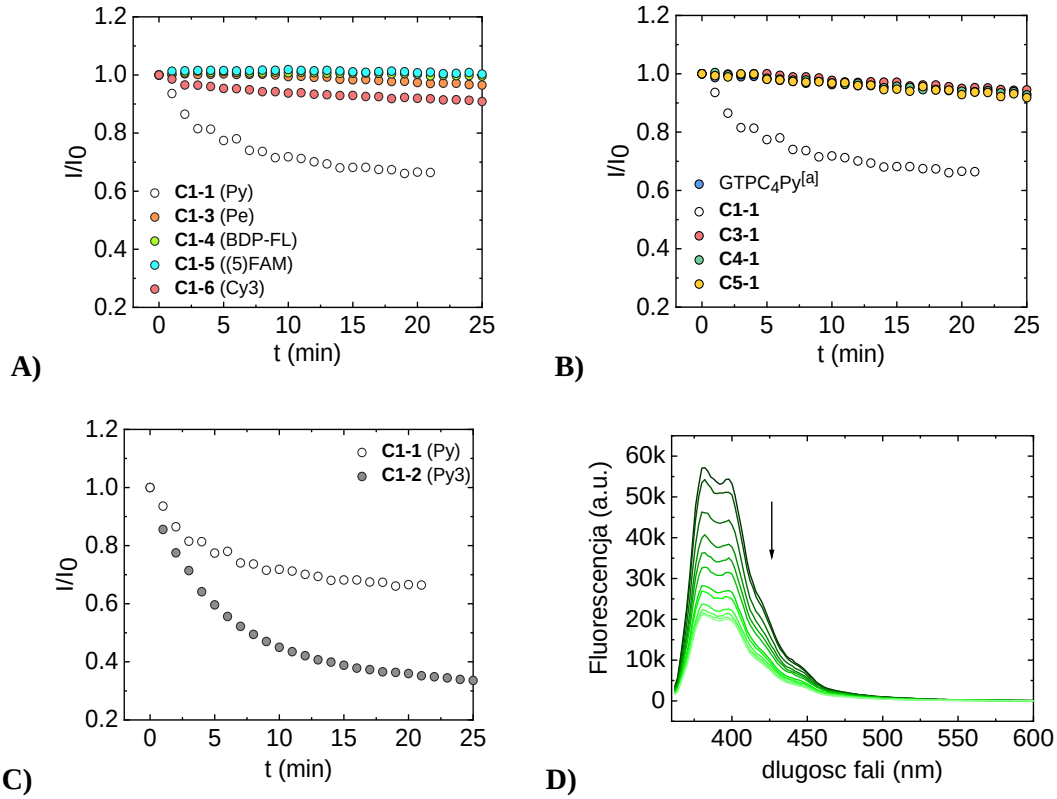
Analogi fluorescencyjne Gp_3A zostały scharakteryzowane spektroskopowo poprzez pomiar widm absorpcji i emisji. Wyznaczono także wydajności kwantowe związków QY w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5 w temperaturze 25°C. Dla wszystkich badanych związków kształt widma oraz położenie maksimum absorpcji i emisji były analogiczne do izolowanych znaczników fluorescencyjnych (Rys. IV. 82; Tabela IV. 19). Związki modyfikowane pirenem wykazywały jedynie emisję monomerową w badanych stężeniach (< 10 μM).

Następnie w celu zidentyfikowania sond FLINT związki **C1-1** i **C1-3**–**C1-7** (analogi Gp_3A różniące się znacznikiem fluorescencyjnym) poddano reakcji N7–metylacji katalizowanej przez Ecm1 będący modelowym enzymem. Każdy związek inkubowano z enzymem Ecm1 (10 nM) w obecności nadmiaru SAM wraz z pomiarem zmian intensywności fluorescencji w maksimum emisji znacznika w czasie (Rys. IV. 83A). Aby ilościowo opisać zmiany fluorescencji dla każdej z sond zdefiniowano współczynnik wygaszania *Q*, obliczony, jako stosunek intensywności fluorescencji przed N7–metylacją oraz po całkowitej metylacji. Jeśli $Q < 1$ związek jest sondą FLINT typu „turn-on", gdy $Q > 1$ sondą FLINT typu „turn-off", a gdy $Q = 1$ związek nie jest sondą FLINT. Ostatni przypadek w opisanym eksperymencie może odpowiadać sytuacji, gdy intensywność fluorescencji nie ulega zmianie lub reakcja enzymatyczna nie zachodzi. Spośród badanych związków jedynie analog znakowany pirenem (**C1-1**) wykazuje współczynnik *Q* różny od 1, wynoszący 1,5 (Tabela IV. 19). Wynika to z faktu, iż fluorescencja pirenu wygaszana jest bardziej efektywnie przez N7–metylowaną guanozynę (produkt), niż niemetylowaną guanozynę (substrat). Piren został wyselekcjonowany, jako najbardziej odpowiedni znacznik i w kolejnych etapach badań skupiono się na zmaksymalizowaniu zmian fluorescencji zachodzących w trakcie N7–metylacji sondy. W celu optymalizacji struktury przetestowano serię dinukleotydów modyfikowanych w obrębie rybozy lub zasady azotowej,



Rys. IV. 82. Widma absorpcji i emisji fluorescencji analogów Gp_3A znakowanych różnymi fluorofortami w pozycji 3'-*O* adenozyny. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

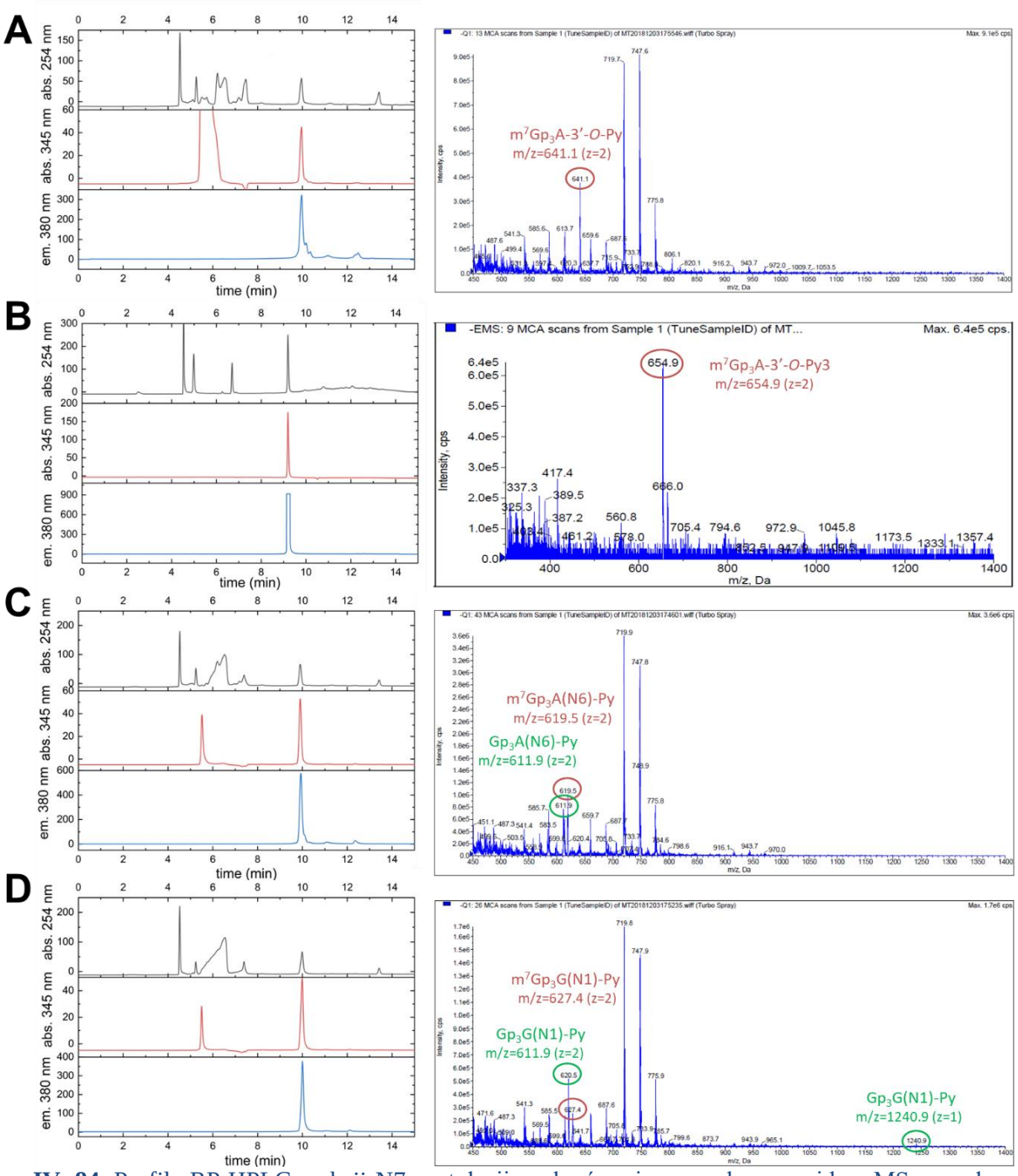
takie jak znakowany pirenem Gp_3N w pozycji: 2'-*O*/3'-*O* guanozyny (**C3-1**), N6 adeniny (**C4-1**) i N1 drugiej guaniny w Gp_3G (**C5-1**). Dla każdej z sond wyznaczono współczynnik wygaszania *Q* w ten sam sposób, jak opisano powyżej dla związków **C1-1** i **C1-3**–**C1-7**. Zaobserwowano, że jedynie sonda **C1-1**, znakowana w pozycji 3'-*O* adenozyny, zmienia intensywność fluorescencji w trakcie inkubacji z kosubstratem SAM i enzymem Ecm1 (Rys. IV. 83B). Sondy **C3-1**, **C4-1** i **C5-1** nie wykazywały zmian fluorescencji (Rys. IV. 83B), jednak wszystkie ulegają N7–metylacji, co niezależnie potwierdzono z wykorzystaniem HPLC-MS (Rys. IV. 84). Przetestowano także wpływ długości linkera łączącego piren z pierścieniem triazolowym na fluorescencję analogów Gp_3A znakowanych przez 3'-*O* pozycję adenozyny (związki **C1-1** i **C1-2**). Zaobserwowano, że zastosowanie dłuższego linkera (Py3, **C1-2**) prowadzi do ponad dwukrotnie większej odpowiedzi fluorescencyjnej sondy na skutek N7–metylacji (Rys. IV. 83C). Na Rys. IV. 83D tę samą reakcję N7–metylacji sondy **C1-2** zaprezentowano także rejestrując całe widma emisji fluorescencji w czasie reakcji.



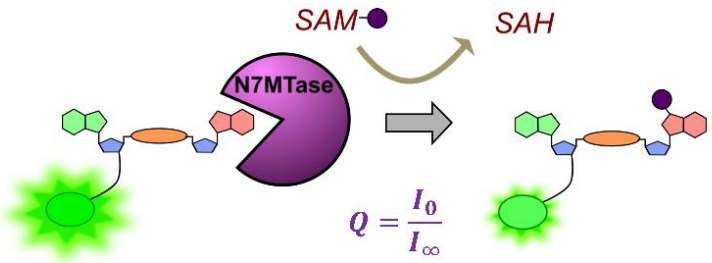
Rys. IV. 83. Optymalizacja struktury sondy fluorescencyjnej do badań N7–MTaz.
Zmiany intensywności fluorescencji w maksimum emisji zaobserwowane w trakcie inkubacji różnych sond z SAM i Ecm1: **A)** analogów Gp_3A zawierających różne znaczniki fluorescencyjne w rybozie adenozyny; **B)** analogów Gp_3A i Gp_3G znakowanych w różnych pozycjach rybozy i zasady azotowej; **C)** Gp_3A znakowanego pirenem przyłączonym linkerem o różnej długości do rybozy adenozyny. **D)** Widma emisji analogu **C1-2** zarejestrowane w trakcie inkubacji z SAM i Ecm1 w odstępach czasowych 1 min. Wszystkie eksperymenty wykonano w stężeniu sondy 2 µM, 50 µM SAM i 10 nM Ecm1. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

W celu dodatkowego potwierdzenia wniosku, że intensywność fluorescencji sond **C1-2** i **C1-2** maleje w czasie na skutek enzymatycznej N7–metylacji, otrzymano dwie N7–metylowane sondy fluorescencyjne (**C2-1** i **C2-2**) i wyznaczono ich wydajności kwantowe QY. QY kontroli N7–metylowanych Gp_3A były dwa do siedmiu razy niższe w porównaniu do ich niemetylowanych opowiedników (Tabela IV. 19). Wynik ten jest kolejnym potwierdzieniem, że

największa zmiana intensywności fluorescencji pomiędzy substratem i produktem enzymatycznej N7–metylacji powinna być obserowowana dla sondy **C1-2** (QY 29,8% dla **C1-2** versus 4,0% dla **C2-2**). Ostatecznie sonda **C1-2** została wyselekcjonowana, jako najbardziej odpowiednia do opracowania metody FLINT przeznaczonej do monitorowania enzymatycznej reakcji N7–metylacji (Rys. IV. 85). W kolejnych etapach badań zoptymalizowano warunki reakcji oraz przeprowadzono walidację metody.



Rys. IV. 84. Profile RP HPLC reakcji N7–metylacji analogów pirenowych oraz widma MS sygnału o czasie retencji t_R 9-10 min. Warunki reakcji: 100 µM **A) C1-1**, **B) C1-2**, **C) C4-1** lub **D) C5-1**, 1 µM Ecm1, 500 µM SAM, 5 mM DTT w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5. Reakcje inkubowano w 37°C przez 3h i zatrzymano poprzez 2 min inkubacji w 98°C. Warunki analizy RP HPLC: eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]



Rys. IV. 85. Schemat przedstawiający zmiany intensywności sondy pirenowej pod wpływem N7–metylacji. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

Tabela IV.19. Właściwości spektroskopowe fluorescencyjnie znakowanych Gp_3A i Gp_3G. Zaprezentowane dane to wartości średnie z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	Absorpcja λ_{max} (nm)	Emisja λ_{max} (nm)	QY (%)	*Q* (Ecm1)
Gp_3A-3'-*O*- Py (**C1-1**)	330, 345	378, 398	12,3 ± 0,3	1,5
Gp_3A-3'-*O*- Py3 (**C1-2**)	330, 345	378, 398	29,8 ± 0,5	3,4
Gp_3A-3'-*O*- Pe (**C1-3**)	418, 443	493	99,8 ± 0,9	1,0
Gp_3A-3'-*O*- BDP-FL (**C1-4**)	505	513	54,8 ± 0,1	1,0
Gp_3A-3'-*O*- (5)FAM (**D1-5**)	498	528	44,7 ± 0,3	1,0
Gp_3A-3'-*O*- Cy3 (**C1-6**)	545	563	50,4 ± 0,1	1,1
Gp_3A-3'-*O*- Cy5 (**C1-7**)	642	660	b.d.	b.d.
2'-*O*/3'-*O*-Py-Gp_3A (**C3-1**)	330, 345	378, 398	11,4 ± 0,3	1,1
Gp_3A(N6)-Py (**C4-1**)	330, 345	378, 398	14,9 ± 0,4	1,1
Gp_3G(N1)-Py (**C5-1**)	330, 345	378, 398	3,9 ± 0,1	1,1
m^7Gp_3A-3'-*O*-Py (**C2-1**)	330, 345	378, 398	6,57 ± 0,03	Produkt*
m^7Gp_3A-3'-*O*-Py3 (**C2-2**)	330, 345	378, 398	4,01 ± 0,02	Produkt*

* związek otrzymany na drodze syntezy chemicznej

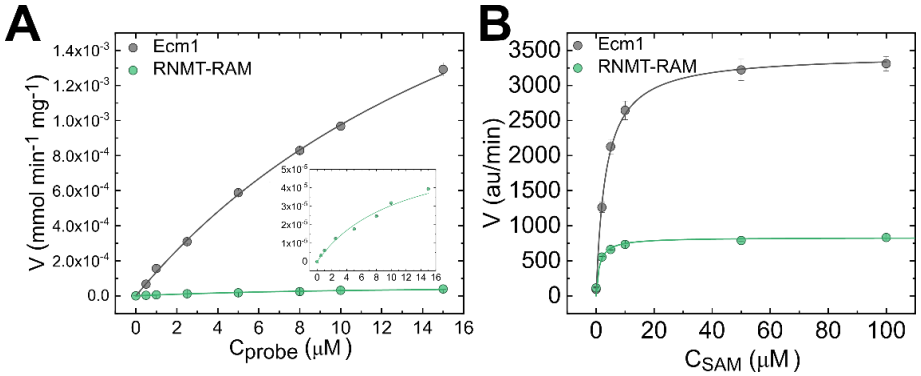
IV.7.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji N7–metylacji sondy przez białka Ecm1 i RNMT-RAM

W celu zoptymalizowania metody badania N7–metylotransferaz wyznaczono parametry kinetyczne reakcji metylacji sondy **C1-2** przez dwa różne enzymy: Ecm1 z pasożyta *E. cuniculi* i ludzki enzym RNMT-RAM. Sondę **C1-2** w stężeniach 0-15 µM inkubowano z kosubstratem SAM (50 µM dla Ecm1 i 20 µM dla RNMT-RAM) oraz enzymem (10 nM Ecm1, 20 nM RNMT-RAM) w 30°C z równoczesną rejestracją intensywności fluorescencji w czasie. Do obliczonych wartości prędkości początkowej w funkcji stężenia sondy **C1-2**, dopasowano równanie Michaelisa-Menten i wyznaczono parametry kinetyczne (K_M, V_{max} i k_{cat}; Rys. IV. 86A). Obliczone wartości K_M zawierały się w zakresie mikromolarnym dla obydwu enzymów (Tabela IV. 20) – 22,0 ± 2,4 µM dla Ecm1 i 11,4 ± 2,8 µM dla RNMT-RAM. W oparciu o wyniki wybrano stężenie sondy równe 2 µM, poniżej wartości K_M. Wydajność katalityczna enzymów

(k_{cat}/K_M)[308] wynosi 0,075 s^{-1} μM^{-1} dla Ecm1 i 0,014 s^{-1} μM^{-1} dla RNMT-RAM, co oznacza, że sonda **C1-2** jest lepszym substratem dla enzymu Ecm1 niż RNMT-RAM.

W kolejnym etapie celem ustalenia optymalnego stężenia SAM sondę **C1-2** w stałym stężeniu 2 µM inkubowano z SAM w stężeniu 0-100 µM i 10 nM Ecm1 lub 20 nM RNMT-RAM (Rys. 86B). Optymalne stężenie SAM zostało wybrane z górnego plateau krzywej tak, aby prędkość reakcji zależała jedynie od zmian stężenia sondy pirenowej **C1-2**.

Ostatecznie ustalone optymalne warunki reakcji N7–metylacji to: 2 µM sondy **C1-2**, 50 µM SAM i 10 nM Ecm1 oraz 2 µM sondy **C1-2**, 20 µM SAM i 20 nM RNMT-RAM.



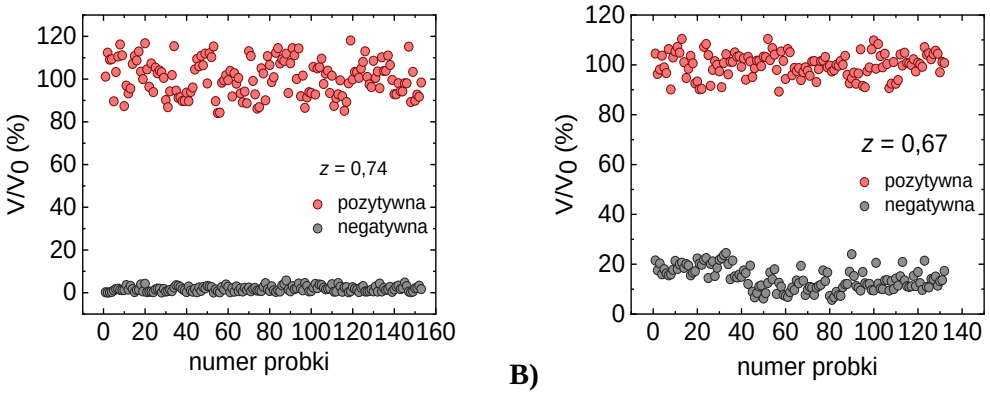
Rys. IV. 86. Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji N7–metylacji sondy **C1-2** przez Ecm1 (szary) lub RNMT-RAM (zielony). **A)** Prędkość początkowa reakcji w funkcji stężenia sondy **C1-2** w obecności kosubstratu SAM i N7–metylotransferazy: 10 nM Ecm1/50 µM SAM lub 20 nM RNMT-RAM/20 µM SAM; **B)** Prędkość początkowa reakcji w funkcji stężenia SAM w obecności 2 µM sondy **C1-2** i 10 nM Ecm1 lub 20 nM RNMT-RAM. Zaprezentowane dane to wartości średnie ± SD. Postęp reakcji odpowiada standardowej kinetyce Michealisa-Menten. Obliczone parametry kinetyczne przedstawiono w Tabeli IV.20. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

Tabela IV.20. Zestawienie parametrów kinetycznych wyznaczonych dla reakcji N7–metylacji sondy **C1-2** przez Ecm1 lub RNMT-RAM.

Enzym	K_M (µM)	V_{max} (mmol min^{-1} mg^{-1})	k_{cat}(s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1}\mu M^{-1}$)
Ecm1	22,0 ± 2,4	(3,13 ± 0,24)*10^{-3}	1,64 ± 0,13	0,074 ± 0,010
RNMT-RAM	11,4 ± 2,8	(0,065 ± 0,001)*10^{-3}	0,160 ± 0,025	0,014 ± 0,004

IV.7.3. Walidacja metody

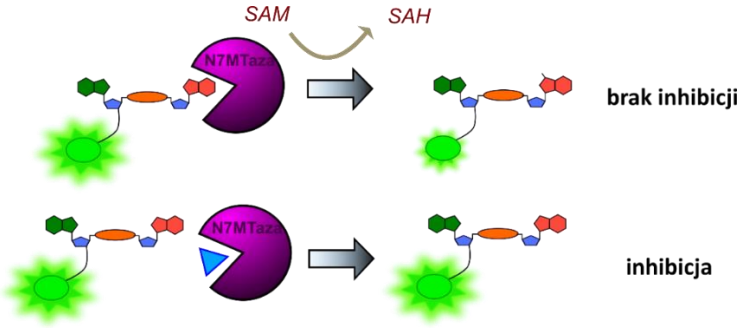
W zoptymalizowanych warunkach przeprowadzono eksperyment wyznaczania parametru *z*, celem walidacji metody badania aktywności enzymów Ecm1 i RNMT-RAM i weryfikacji jej przydatności w pomiarach HTS. Wartości intensywności fluorescencji zostały zmierzone w odstępach minutowych dla 153 (Ecm1) lub 132 (RNMT-RAM) pozytywnych i negatywnych prób kontrolnych. Kontrola pozytywna (brak inhibicji) zawierała roztwór sondy **C1-2** w obecności SAM i odpowiedniego enzymu. Kontrola negatywna dodatkowo zawierała uniwersalny inhibitor metylotransferaz – sinefunginę (25 µM dla Ecm1 i 30 µM dla RNMT-RAM). Obliczone parametry *z* dla obydwu enzymów spełniały warunki zakwalifikowania metody do metod HTS (tzn. $z > 0,5$; 0,74 dla Ecm1 i 0,67 dla RNMT-RAM; Rys. IV. 87) i można stosować ją do wysokoprzepustowych badań przesiewowych bibliotek związków.



Rys. IV. 87. Wyznaczanie parametru *z* metody monitorowania N7–metylacji katalizowanej przez **A)** Ecm1 i **B)** RNMT-RAM w temperaturze 30°C z użyciem sondy Gp_3A-3'-*O*-Py3 (**C1-2**). Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

IV.7.4. Wyznaczanie IC_{50} serii analogów Gp_3A

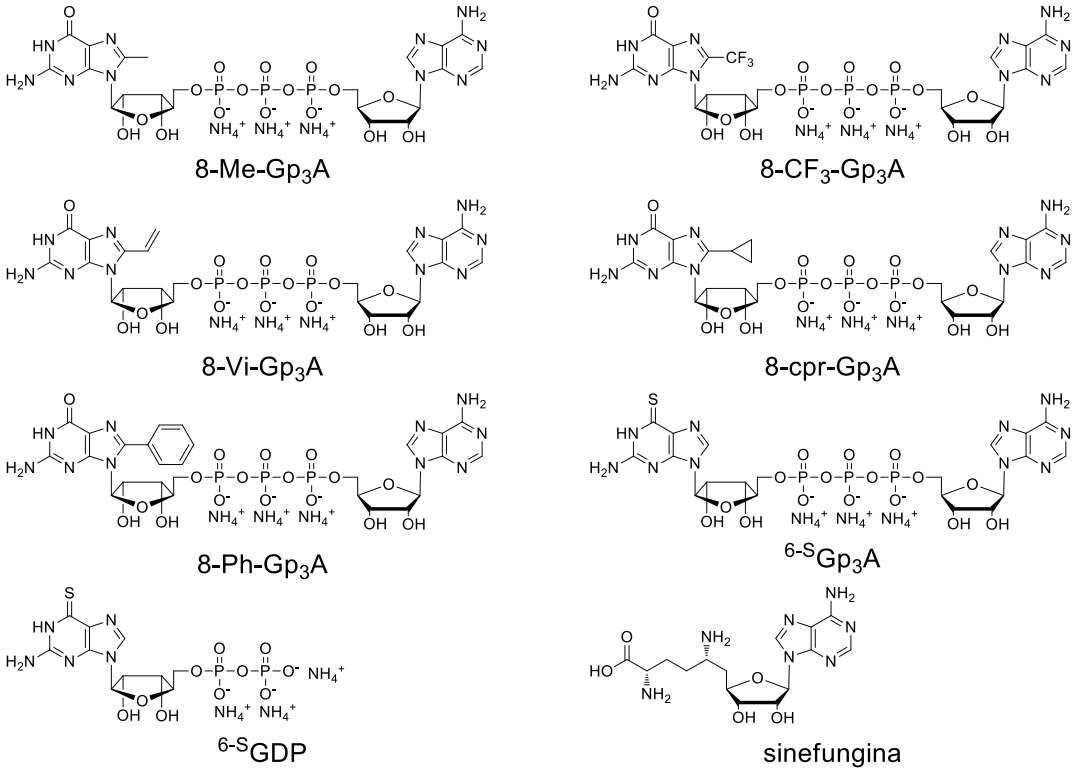
Pierwszy test inhibitorów N7–metylotransferaz Ecm1 i RNMT-RAM przeprowadzono na przygotowanej w tym celu bibliotece pochodnych substratu nukleotydowego reakcji N7–metylacji (Rys. IV. 88). Biblioteka zawierała serię analogów GpppA podstawionych w pozycji C8- lub C6- guanozyny (Rys. IV. 89). Przetestowano modyfikacje: C8-metylową (Me), -trifluorometylową (CF_3), -winylową (Vi), -cyklopropylową (cpr) i –fenylową (Ph), a także podstawienie 6-S. Aby zweryfikować wpływ drugiej zasady na właściwości inhibujące zbadano także mononkleotyd $^{6\text{-S}}$GDP. Analog 8-CF_3-Gp_3A zsyntetyzował dr Mikołaj Chromiński w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW.[309] Pozostałe związki otrzymała i scharakteryzowała Autorka pracy wraz ze studentem Zastosowań fizyki w biologii i medycynie, spec. Biofizyka molekularna na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego Mateuszem Fido.



Rys. IV. 88. Schemat działania metody fluorescencyjnej przeznaczonej do monitorowania enzymatycznej N7–metylacji.

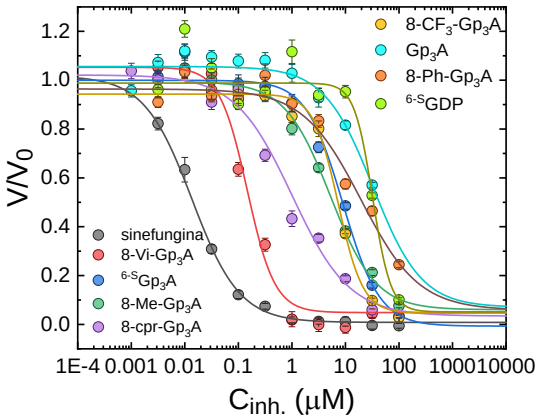
W pierwszej kolejności badania inhibicji przeprowadzono dla N7–metylotransferazy Ecm1. Sondę **C1-2** (2 µM), enzym Ecm1 (10 nM) i SAM (50 µM) inkubowano z rozcieńczeniami inhibitora half-log (co logarytm dziesiętny z 0,5; stężenia od 0,003 nM do 100 µM) wraz z odczytem fluorescencji przy 378 nm (wzbudzanie 345 nm) co minutę. Wyznaczone wartości prędkości początkowych w zależności od stężenia inhibitora przedstawiono na wykresie, a do zależności dopasowano czteroparametrowe równanie Hilla (22) (Rys. IV. 90). Obliczone IC_{50} dla Ecm1 zawierały się w zakresie od 15 nM do 83 µM, a współczynniki Hilla *p* od 3,6 do 0,8 (Tabela IV. 21). Zaobserwowano, że Gp_3A modyfikowane C8-winylem jest najsilniejszym testowanym nukleotydowym inhibitorem N7–metylotransferazy (IC_{50} 0,146 ±

0,26 µM). Zauważono także, że $^{6\text{-S}}Gp_3A$ jest silniejszym inhibitorem Ecm1 niż $^{6\text{-S}}GDP$ (IC_{50} 8,93 ± 0,82 µM versus 32,1 ± 2,1 µM), co oznacza, że obecność drugiego nukleotydu jest istotna dla właściwości inhibujących. Analizując wartości IC_{50} badane modyfikacje można uszeregować w kolejności od najsilniejszego inhibitora: 8-Vi > 8-cpr > 8-Me > 8-CF_3 > 6-S > 8-Ph > niemodyfikowany. Gp_3A był najsłabszym z testowanych inhibitorów, z czego można wywnioskować, że pozycja C8- i substytucja 6-S są obiecującymi celami do dalszych modyfikacji chemicznych w celu zaprojektowania wydajnych inhibitorów N7–MTaz.

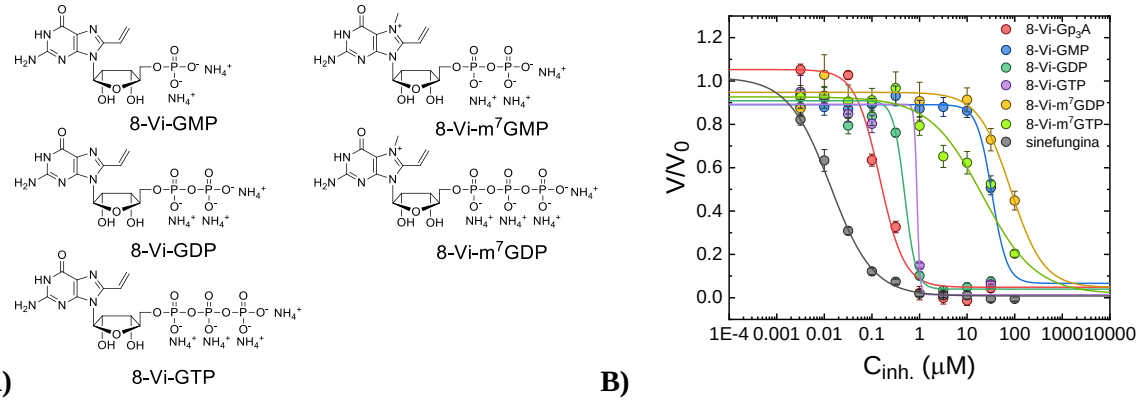


Rys. IV. 89. Struktura analogów nukleotydów modyfikowanych w pozycji C8- lub C6-, testowanych, jako inhibitory procesu enzymatycznej N7–metylacji.

W oparciu o uzyskany wynik dowodzący, że modyfikacja C8-winylowa jest najbardziej korzystna dla właściwości inhibujących związku względem enzymu Ecm1, w kolejnym etapie przetestowano serię C8-winylowych mononukleotydów różniących się liczbą grup fosforanowych oraz zasadą azotową (guanina lub 7-metyloguanina; Rys. IV.91A). Związki zsyntetyzował i scharakteryzował mgr Adam Mamot w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW. Wartości IC_{50} wyznaczono w analogiczny sposób, jak opisano powyżej. Otrzymane krzywe inhibicji zostały zaprezentowane na Rys. IV. 91B, a obliczone wartości IC_{50} w Tabeli IV. 21.



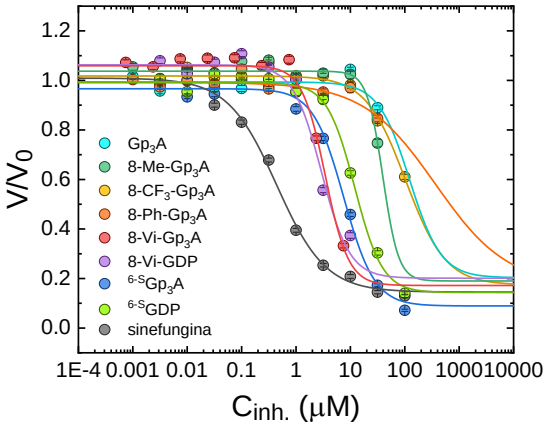
Rys. IV. 90. Krzywe inhibicji inhibitorów enzymu Ecm1, otrzymanych przy pomocy opracowanej metody fluorescencyjnej PyFLINT-M z użyciem sondy **C1-2** w temperaturze 30°C. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.



Rys. IV. 91. A) Struktura analogów nukleotydów modyfikowanych grupą winylową w pozycji C8 guanozyny lub 7-metyloguanozyny, testowanych, jako inhibitory procesu enzymatycznej N7–metylacji; **B)** Krzywe inhibicji C8-winylo modyfikowanych nukleotydów – potencjalnych inhibitorów enzymu Ecm1, otrzymanych przy pomocy opracowanej metody fluorescencyjnej PyFLINT-M z użyciem sondy **C1-2** w temperaturze 30°C. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Analiza wyznaczonych IC_{50} analogów C8-winylowych wykazała, że:

- związki zawierające 7-metyloguanozynę, jako analogi produktu N7–metylacji, są słabszymi inhibitorami w porównaniu do nukleotydów guanozynowych (analogi substratu);
- monofosforan 8-winyloguanozyny jest słabym inhibitorem Ecm1. Wydłużenie łańcucha fosforanowego do di- i trifosforanu poprawia właściwości inhibujące i prowadzi do obniżenia IC_{50} o dwa rzędy wielkości;
- najsilniejszym inhibitorem C8-winylowym nadal pozostaje 8-Vi-Gp_3A, co ponownie potwierdza pozytywny wpływ drugiej zasady azotowej na inhibicję Ecm1;
- współczynniki Hilla *p* analogów winylowych są większe od jedności – od 1,7 dla Gp_3A aż do ~15 dla 8Vi-GTP, co może sugerować inny mechanizm inhibicji niż pozostałe testowane związki. Możliwe, że analogi C8-winylowe ulegają reakcji addycji Michaela w miejscu wiążącym białka z tiolowymi, lub aminowymi grupami funkcyjnymi łańcuchów bocznych aminokwasów.

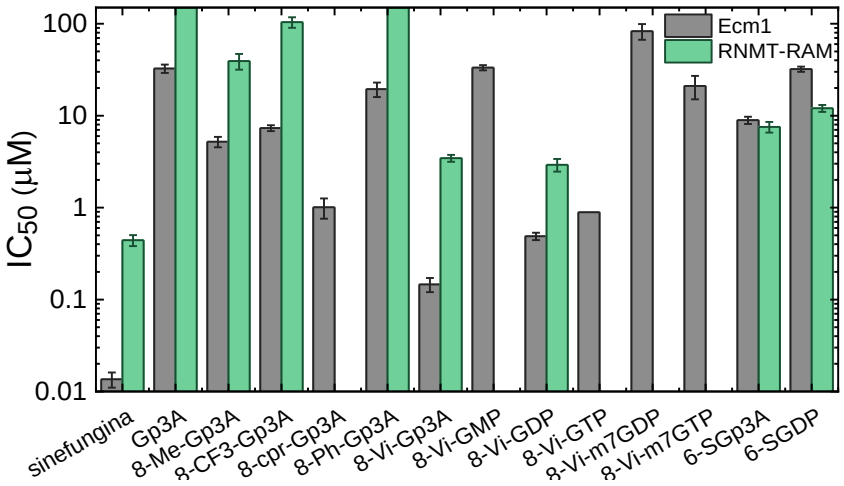


Rys. IV. 92. Krzywe inhibicji wybranych modyfikowanych nukleotydów uzyskane w reakcji N7-metylacji, katalizowanej przez enzym RNMT-RAM, otrzymanych przy pomocy opracowanej metody fluorescencyjnej PyFLINT-M z użyciem sondy **C1-2** w temperaturze 30°C. Zaprezentowane dane są wartościami średnimi ± SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Spośród badanych 14 nukleotydów dziewięć przetestowano także w eksperymencie inhibicji N7–metylacji przez enzym RNMT-RAM, stosując opracowaną metodę PyFLINT-M. Eksperyment przeprowadzono w warunkach zoptymalizowanych: 2 µM sondy **C1-2**, 20 µM SAM, 20 nM RNMT-RAM, 0–100 µM inhibitora (rozcieńczenia half-log), bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, temperatura 30°C. Uzyskane krzywe inhibicji wraz z dopasowanym czteroparametrowym równaniem Hilla (5) zaprezentowano na Rys. IV. 92, a obliczone IC_{50} w Tabeli IV. 21.

Tabela IV.21. Zestawienie wartości IC_{50} i współczynników Hilla *p* potencjalnych inhibitorów N7–metylotransferaz Ecm1 i RNMT-RAM wyznaczonych opracowaną metodą fluorescencyjną PyFLINT-M. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	Ecm1		RNMT-RAM	
	IC_{50} (µM)	*p*	IC_{50} (µM)	*p*
sinefungina	0,014 ± 0,002	0,97 ± 0,09	0,442 ± 0,060	0,97 ± 0,11
Gp_3A	32,6 ± 3,4	0,96 ± 0,17	> 100	b.d.
8-Me-Gp_3A	5,21 ± 0,58	1,02 ± 0,10	39,3 ± 7,6	3,0 ± 2,5
8-CF_3-Gp_3A	7,33 ± 0,54	1,87 ± 0,23	104 ± 14	1,18 ± 0,22
8-cpr-Gp_3A	1,01 ± 0,25	0,81 ± 0,12	b.d.	b.d.
8-Ph-Gp_3A	19,4 ± 3,5	0,80 ± 0,10	> 100	b.d.
8-Vi-Gp_3A	0,146 ± 0,026	1,68 ± 0,39	3,45 ± 0,30	2,03 ± 0,28
8-Vi-GMP	33,3 ± 2,2	2,76 ± 1,07	b.d.	b.d.
8-Vi-GDP	0,488 ± 0,045	3,65 ± 0,63	2,92 ± 0,46	1,67 ± 0,43
8-Vi-GTP	0,89	14,8	b.d.	b.d.
8-Vi-m^7GDP	83,0 ± 16,2	1,26 ± 0,40	b.d.	b.d.
8-Vi-m^7GTP	21,1 ± 5,9	0,78 ± 0,14	b.d.	b.d.
$^{6\text{-S}}Gp_3A$	8,93 ± 0,82	1,26 ± 0,14	7,6 ± 1,0	1,53 ± 0,28
$^{6\text{-S}}$GDP	32,1 ± 2,1	2,56 ± 0,62	12,0 ± 1,0	1,70 ± 0,26



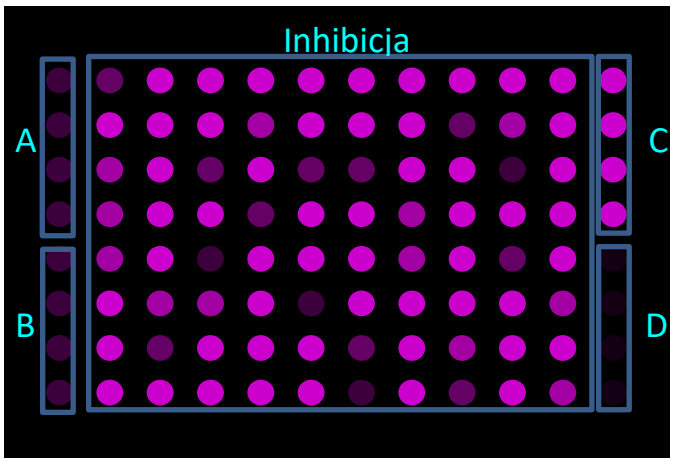
Rys. IV. 93. Porównanie obliczonych wartości IC_{50} testowanych nukleotydów modyfikowanych w pozycji C8 i C6.

Także w przypadku enzymu ludzkiego modyfikacja w pozycji C8- prowadzi do wzrostu właściwości inhibitorowych. Uzyskane wartości IC_{50} dla ludzkiego enzymu RNMT-RAM były od 5 do 30 razy wyższe w porównaniu do Ecm1. Wyjątkiem są analogi 6-S: $^{6\text{-S}}G_3A$ i $^{6\text{-S}}$GDP, których IC_{50} jest niższe niż wartości uzyskane dla enzymu Ecm1. Jednak $^{6\text{-S}}$GDP jest słabszym inhibitorem RNMT-RAM w porównaniu do $^{6\text{-S}}Gp_3A$, co ponownie potwiedza korzystny wpływ drugiego nukleotydu na właściwości inhibujące związku względem N7–metylotransferaz.

Najsilniejszym inhibitorem obydwu enzymów okazała się być sinefungina – znany inhibitor metylotransferaz. IC_{50} sinefunginy jest o rząd wielkości mniejsze w porównaniu do najlepszego zidentyfikowanego nukleotydowego inhibitora 8-Vi-Gp_3A. Jednakże sinefungina, jako analog kosubstratu SAM, nie jest selektywnym inhibiotrem i może wpływać na wiele różnych metylotransferaz. Odpowiednio zaprojektowane związki nukleotydowe o właściwościach zbliżonych do substratu, mają większą szansę na selektywną inhibicję jedynie N7–metylotransferazy. Dlatego poszukiwania modyfikacji nukleotydowych (między innymi zaproponowanych w niniejszej pracy C8- i 6-S) są korzystne w projektowaniu leków nakierowanych na wybraną N7–metylotransferazę (np. wirusową).

IV.7.5. Screening biblioteki farmakologicznie czynnych związków LOPAC®1280

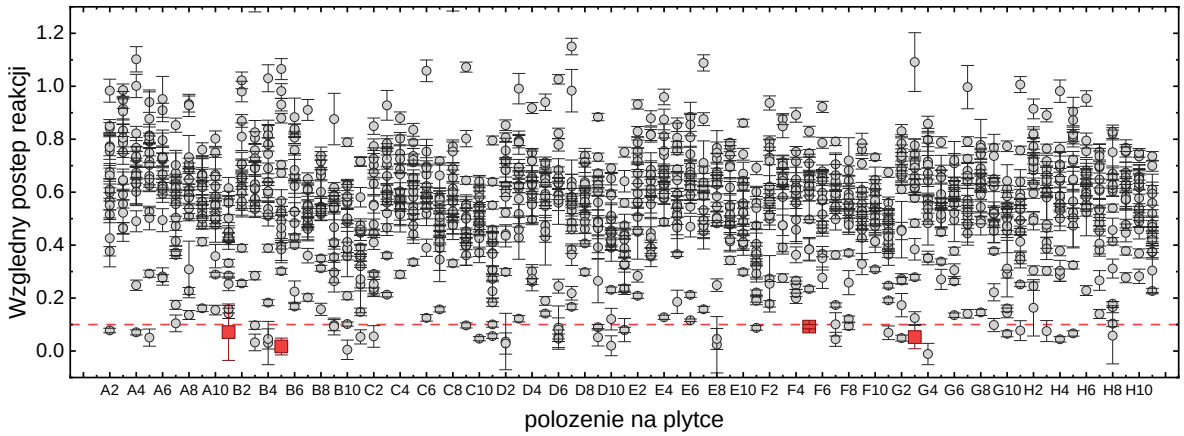
W kolejnym etapie badań inhibicji N7–metylotransferaz opracowaną metodę PyFLINT-M zastosowano do wykonania wysokoprzepustowych eksperymentów przesiewowych (HTS) komercyjnie dostępnej biblioteki związków czynnych farmakologicznie LOPAC®1280. Eksperymenty przeprowadzono w zoptymalizowanych warunkach dla enzymu Ecm1 – 2 µM sondy **C1-2**, 50 µM SAM, 10 nM Ecm1, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5 z dodatkiem 2% DMSO (związki w bibliotece LOPAC®1280 są rozpuszczone w czystym DMSO), temperatura 30°C. Testy wykonano dla jednego, relatywnie wysokiego stężenia (10 µM) związku, aby możliwe było wyselekcjonowanie także słabszych inhibitorów procesu N7–metylacji. Eksperymenty wykonano z użyciem 96-dołkowej płytki z odczytem intensywności fluorescencji w odstępach minutowych (λ_{exc} = 345 nm, λ_{em} = 378 nm). Każda z płytek zawierała 80-dołków z badanymi związkami (jeden dołek na jeden związek) oraz 16 dołków kontrolnych (Rys. IV. 94A–D). Na podstawie uzyskanych wartości prędkości początkowych obliczone zostały wartości względnego postępu reakcji poprzez znormalizowanie prędkości początkowych do prędkości początkowej reakcji bez inhibitora w obecności 2% DMSO (Rys. IV. 95).



Rys. IV. 94. Schemat płytki 96-dołkowej przedstawiający przebieg pojedynczego eksperymentu.

Czternaście spośród testowanych związków zbadano na oddzielnej płytce, gdyż wykazywały interferencję fluorescencji z sondą pirenową. Obecność interferencji fluorescencji z emisją sondy **C1-2** zmniejsza czułość metody, ze względu na pojawiające się tło fluorescencji. Jednak dla każdego z czternastu związków nadal możliwe było obserwowanie zmian fluorescencji pochodzących z N7–metylacji sondy. Punkt odcięcia został ustalony na 10% względnego postępu reakcji. W ten sposób spośród 1280 testowanych związków

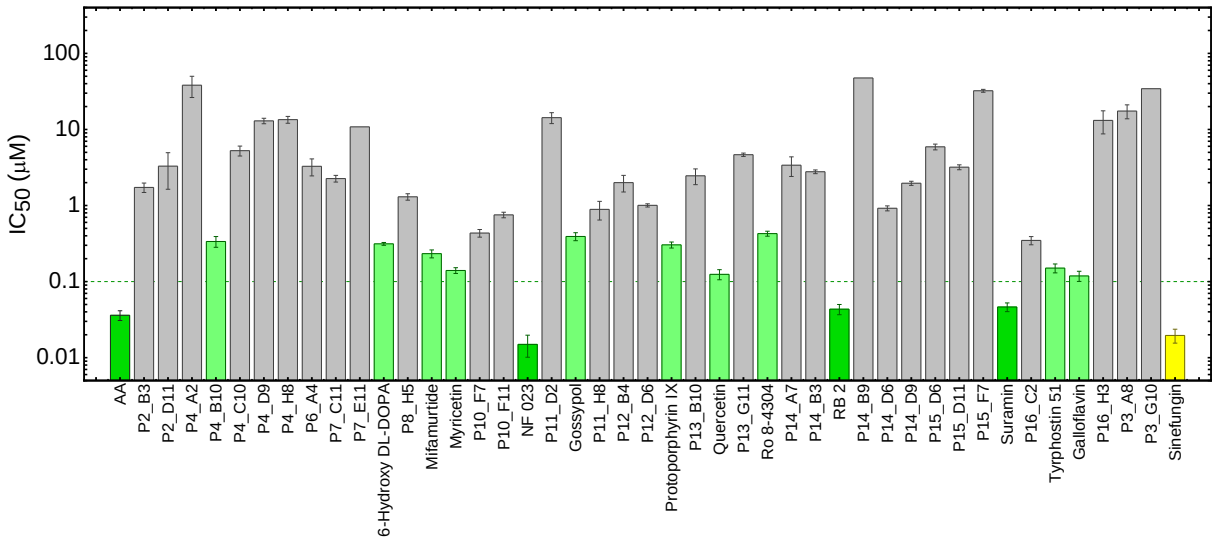
wyselekcjonowano 56, które następnie zbadano bardziej szczegółowo w badaniach inhibicji wraz z wyznaczeniem wartości IC_{50}.



Rys. IV. 95. Względny postęp reakcji N7–metylacji sondy **C1-2** przez enzym Ecm1 w obecności jednego z 1280 związków zaczerpniętych z biblioteki LOPAC®1280. Kolorem czerwonym zaznaczono 4 najsilniejsze inhibitory, opisane w kolejnym podrozdziale. Zaprezentowane dane to wartości średnie ± SD z dwóch niezależnych eksperymentów. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

IV.7.6. Wyznaczanie IC_{50} inhibitorów wyselekcjonowanych z biblioteki LOPAC®1280

Wyselekcjonowane z badań przesiewowych 56 związków przetestowano w eksperymencie wyznaczania IC_{50}, stosując metodę PyFLINT-M w zoptymalizowanych warunkach dla enzymu Ecm1 (2 µM sondy **C1-2**, 50 µM SAM, 10 nM Ecm1, 0–31,6 µM inhibitora w rozcieńczeniach half-log, 50 mM Tris–HCl pH 7,5, temperatura 30°C; Rys. IV. 96, Tabela IV. 22).



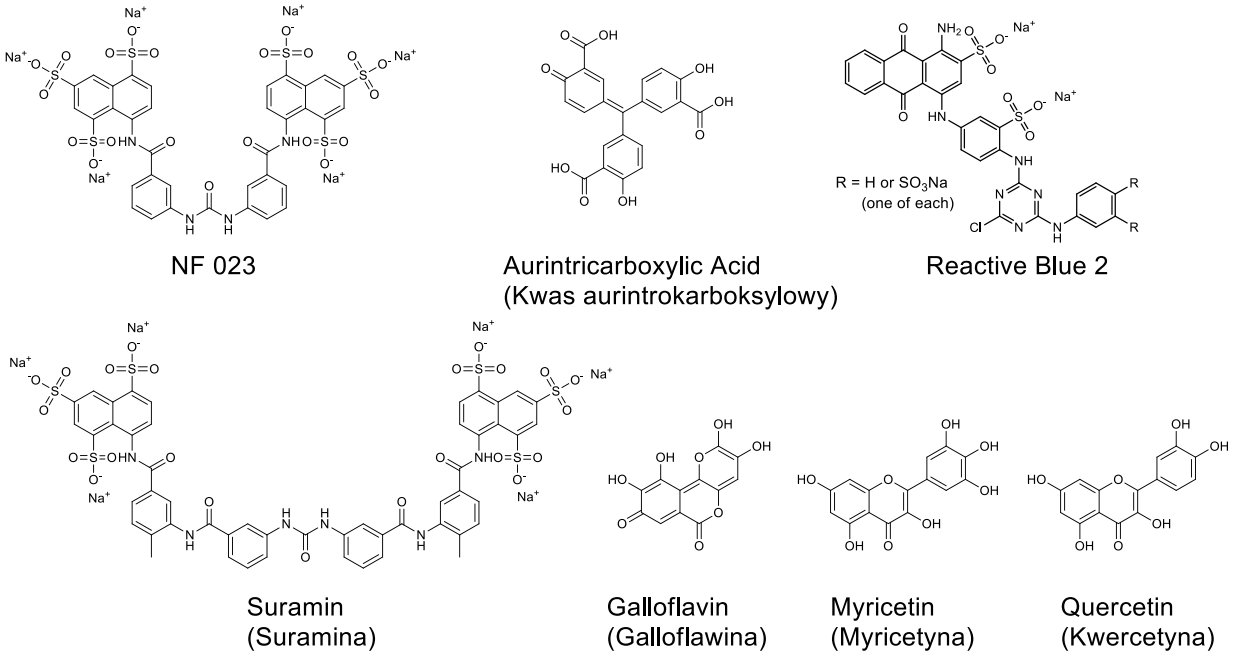
Rys. IV. 96. Wyznaczone IC_{50} inhibitorów N7–metylotransferazy Ecm1, wyselekcjonowanych z biblioteki LOPAC®1280 (względny postęp reakcji ≤ 10%) oraz sinefunginy (kontrola). Kolorem ciemnozielonym oznaczono związki z IC_{50} < 0,05 µM, jasnozielonym z IC_{50} pomiędzy 0,05 µM i 0,5 µM, szarym o IC_{50} > 0,5 µM, a żółtym kontrolę (sinefungina). Przedstawione dane to wartości średnie z 2 lub 3 niezależnych eksperymentów ± SD. Wartości IC_{50} wszystkich 56 związków zawarto w Tabeli IV. 27. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

Tabela IV.22. Zestawienie wartości IC_{50} i współczynników Hilla *p* wyznaczonych opracowaną metodą fluorescencyjną PyFLINT-M, wyselekcjonowanych 56 związków z biblioteki LOPAC®1280. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Nr	Położenie w bibliotece	Związek	IC_{50} (uM)	*p*
1.	P1_F5	Aurintricarboxylic acid	0,036 ± 0,005	-2,79 ± 0,76
2.	P1_F8	Sandoz 58-035	> 100	-
3.	P2_B3	2-(methylthio)adenosine 5'diphosphate trisodium salt hydrate	1,73 ± 0,24	-3,43 ± 0,79
4.	P2_D11	p-Benzoquinone	3,3 ± 1,6	-0,60 ± 0,17
5.	P2_G10	ARL 67156 trisodium salt	> 100	-
6.		Sinefungin	0,020 ± 0,004	-1,30 ± 0,17
7.	P4_A2	Icaritin	38,1 ± 11,8	-3,33 ± 5,46
8.	P4_B10	Cefsulodin sodium salthydrate	0,34 ± 0,05	-2,11 ± 0,40
9.	P4_C10	Caffeic acid phenethynyl ester	5,26 ± 0,78	-1,60 ± 0,27
10.	P4_C11	Lumefantrine	> 100	-
11.	P4_D6	(-)-Cotinine	> 100	-
12.	P4_D9	Cefotaxime sodium salt	13,0 ± 1,1	-2,80 ± 0,51
13.	P4_H8	Calcimycin	13,4 ± 1,4	-2,80 ± 0,69
14.	P6_A4	Bisdemethoxycurcumin	3,28 ± 0,82	-0,71 ± 0,11
15.	P7_C11	GW5074	2,26 ± 0,23	-1,87 ± 0,30
16.	P7_E11	GW7647	10,8	-18,5
17.	P8_H4	6-Hydroxy-DL-DOPA	0,31 ± 0,01	-3,49 ± 0,92
18.	P8_H5	Hispidin	1,30 ± 0,13	-1,49 ± 0,24
19.	P9_G2	Mifamurtide	0,23 ± 0,03	-2,09 ± 0,49
20.	P10_B11	Myricetin	0,14 ± 0,01	-2,71 ± 0,49
21.	P10_F7	Morin	0,43 ± 0,05	-1,75 ± 0,27
22.	P10_F11	MRS2159	0,75 ± 0,06	-1,97 ± 0,30
23.	P11_A11	NF 023	0,015	-0,84 ± 0,14
24.	P11_D2	JNJ-40418677	14,3 ± 2,3	-1,06 ± 0,19
25.	P11_E8	Gossypol from cotton seeds	0,39 ± 0,05	-1,79 ± 0,25
26.	P11_H8	Nordihydroguaiaretic acid from Larreadivaricata (creosote bush)	0,89 ± 0,24	-1,25 ± 0,37
27.	P12_B4	Oleic Acid	2,00 ± 0,49	-1,14 ± 0,30
28.	P12_D6	Piceatannol	1,00 ± 0,05	-3,00 ± 0,54
29.	P13_B4	Protoporphyrin IX	0,30 ± 0,03	-1,88 ± 0,52
30.	P13_B10	Pyridostatintrifluoroacetate salt	2,45 ± 0,58	-1,92 ± 0,40
31.	P13_D10	Quercetin dihydrate	0,12 ± 0,02	-1,34 ± 0,25
32.	P13_G11	Candesartan cilexetil	4,66 ± 0,23	-2,71 ± 0,20
33.	P14_A5	Ro 8-4304	0,43 ± 0,03	-1,58 ± 0,13
34.	P14_A7	Auranofin	3,38 ± 0,98	-1,43 ± 0,42
35.	P14_B3	Rottlerin	2,78 ± 0,16	-3,47 ± 1,12
36.	P14_B5	Reactive Blue 2	0,043 ± 0,007	-1,33 ± 0,21
37.	P14_B9	N-Oleoyldopamine	47,4	-6,71
38.	P14_D6	7,8-Dihydroxyflavone hydrobromide	0,92 ± 0,07	-1,56 ± 0,14

39.	P14_D9	SCH-202676 hydrobromide	1,96 ± 0,12	-3,19 ± 0,39
40.	P15_D6	Tetradecylthioacetic acid	5,90 ± 0,52	-2,61 ± 0,39
41.	P15_D11	Tyrphostin 23	3,19 ± 0,24	-1,86 ± 0,20
42.	P15_F7	TTNPB	32,2 ± 1,4	-5,00
43.	P15_G3	Suraminhexasodium	0,046 ± 0,006	-1,38 ± 0,19
44.	P16_C2	Tyrphostin 47	0,35 ± 0,04	-2,58 ± 0,46
45.	P16_D2	Tyrphostin 51	0,15 ± 0,02	-1,28 ± 0,18
46.	P16_E8	Galloflavin	0,12 ± 0,02	-2,13 ± 0,63
47.	P16_G4	XCT790	> 100	--
48.	P16_H3	IPA-3	13,2 ± 4,4	-0,38 ± 0,06
49.	P3_A7	Bupropion hydrochloride	> 100	-
50.	P3_A8	Arvanil	17,4 ± 3,6	-0,98 ± 0,18
51.	P3_A10	CGP-7930	> 100	-
52.	P3_B9	PF 3845 hydrate	> 100	-
53.	P3_G7	BTCP hydrochloride	> 100	-
54.	P3_G8	Rhodblock 6	> 100	-
55.	P3_G9	Caffeine	> 100	-
56.	P3_G10	Chlorpropamide	34,3	-13,44
57.	P3_G5	Alfuzosin hydrochloride	> 100	-

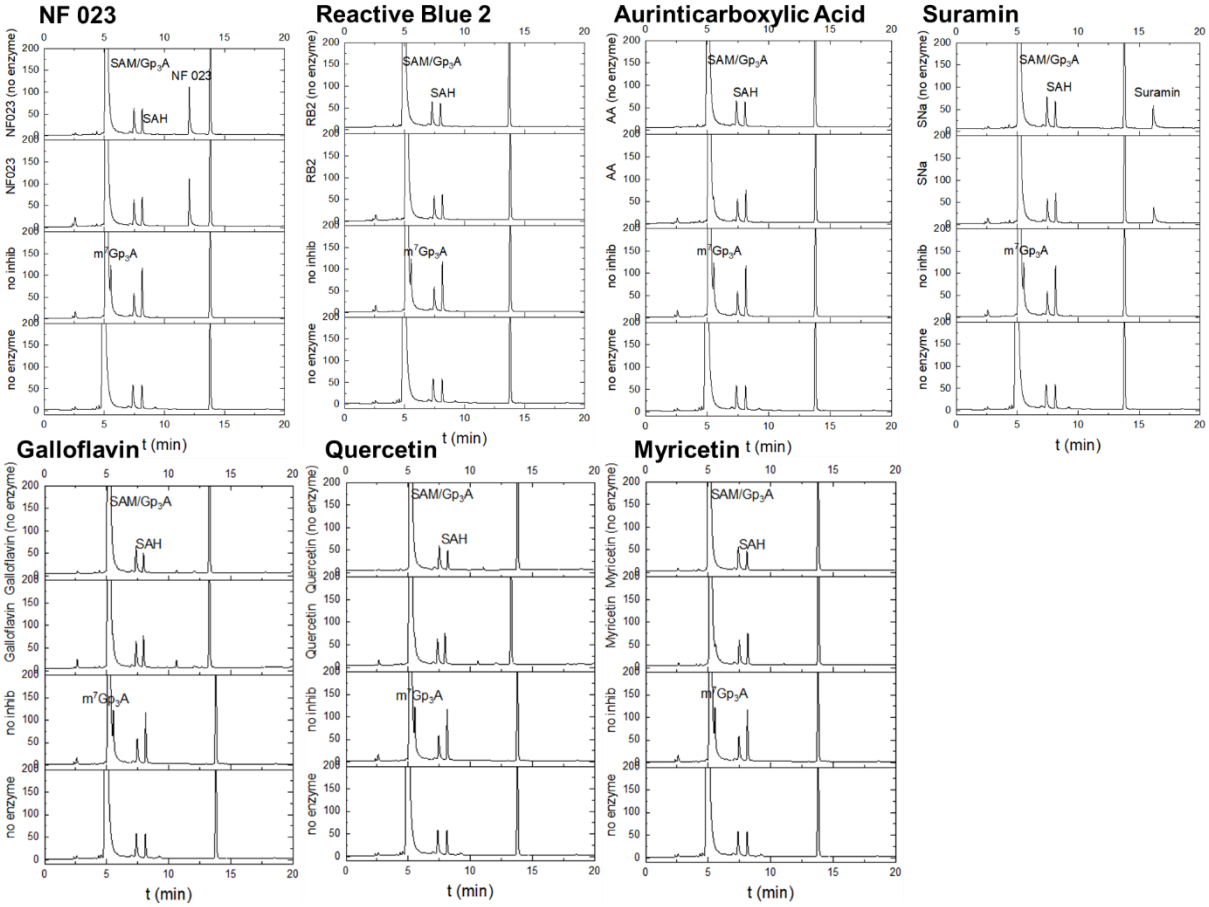
Ciemnozielony – związki z IC_{50} < 0,05 µM
Jasnozielony – związki z IC_{50} pomiędzy 0,05 µM i 0,5 µM
Żółty – sinefungina (kontrola)



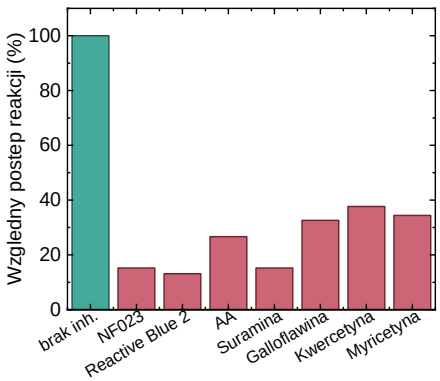
Rys. IV. 97. Struktury najsilniejszych inhibitorów Ecm1, wyselekcjonowanych z biblioteki LOPAC®1280.

W rezultacie zidentyfikowano czternaście związków, których IC_{50} jest niższe niż 400 nM, w tym cztery z IC_{50} < 50 nM. Uzyskane krzywe inhibicji przedstawiono na Rys. IV. 100A. Najsilniejszym znalezionym inhibitorem jest analog suraminy NF 023, którego IC_{50} równe 15 nM jest zbliżone do IC_{50} sinefunginy (14 ± 2 nM). Pozostałe trzy związki to kwas aurintrokarboksylowy (AA), barwnik reactive blue 2 i suramina (Rys. IV. 97). Kolejny zestaw inhibitorów N7–MTaz obejmuje trzy małe molekuły, zbudowane z pierścieni aromatycznych

modyfikowanych grupami hydroksylowymi: galloflawinę (IC_{50} 120 ± 20 nM), kwercetynę (IC_{50} 120 ± 20 nM) i myricetynę (IC_{50} 140 ± 10 nM; Rys. IV. 97). Korzystając z analizy RP HPLC potwierdzono, że mniejsze zmiany fluorescencji sondy **C1-2** obserwowane w obecności inhibitora wynikają z inhibicji procesu N7–metylacji (Rys. IV. 98–99).

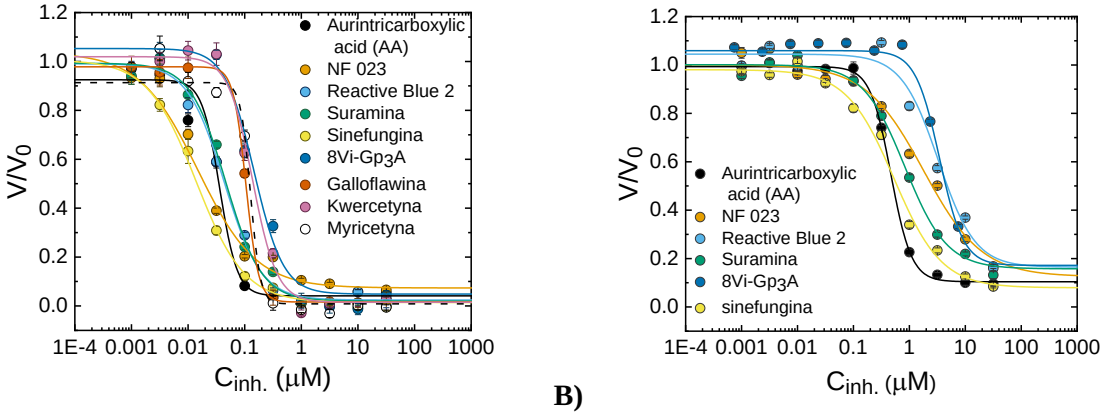


Rys. IV. 98. Chromatogramy RP HPLC przedstawiające inhibicję N7–metylacji Gp_3A katalizowanej przez Ecm1 przez siedem najsilniejszych inhibitorów wyselekcjonowanych z biblioteki LOPAC®1280. Warunki reakcji: 10 µM Gp_3A, 250 µM SAM, 100 nM Ecm1 i 2 µM inhibitora w całkowitej objętości 200 µl w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 1,5 h w 30°C z mieszaniem 300 rpm i zatrzymano inkubując 2 min w 98°C. Warunki analizy RP HPLC: eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: 50% eluanta A/50% MeOH; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]



Rys. IV. 99. Względny postęp reakcji N7–metylacji Gp_3A przez Ecm1 przez inhibitory z biblioteki LOPAC®1280. Dane zaczerpnięte z chromatogramów z Rys. IV. 98. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

Wybrane inhibitory o strukturze nukleotydowej oraz cztery najsilniejsze inhibitory z bilbioteki LOPAC®1280 przetestowano następnie w badaniach ludzkiej N7–metylotransferazy RNMT-RAM. Eksperymenty przeprowadzono w warunkach zoptymalizowanych: 2 µM sondy **C1-2**, 20 µM SAM, 20 nM RNMT-RAM, 0–31,6 µM inhibitora w rozcieńczeniach half-log, 50 mM Tris–HCl pH 7,5, temperatura 30°C (Rys. IV. 100B, Tabela IV. 23). Zaobserwowano, że IC_{50} wyznaczone dla ludzkiego enzymu RNMT-RAM są o rząd wielkości wyższe w porównaniu do Ecm1, podobnie do poprzednich wyników uzyskanych dla inhibitorów opartych o strukturę Gp_3A. Najsilniejszymi inhibitorami RNMT-RAM są kwas aurinitrokarboksylowy oraz barwnik suramina, natomiast w przypadku Ecm1 analog suraminy NF 023. Różnice w inhibicji poszczególnych enzymów przez badane związki są obiecujące pod kątem projektowania selektywnych inhibitorów wybranej N7–metylotransferazy.



Rys. IV. 100. Krzywe inhibicji najsilniejszych inhibitorów z biblioteki LOPAC®1280, otrzymane dla reakcji katalizowanej przez **A)** Ecm1 lub **B)** RNMT-RAM.

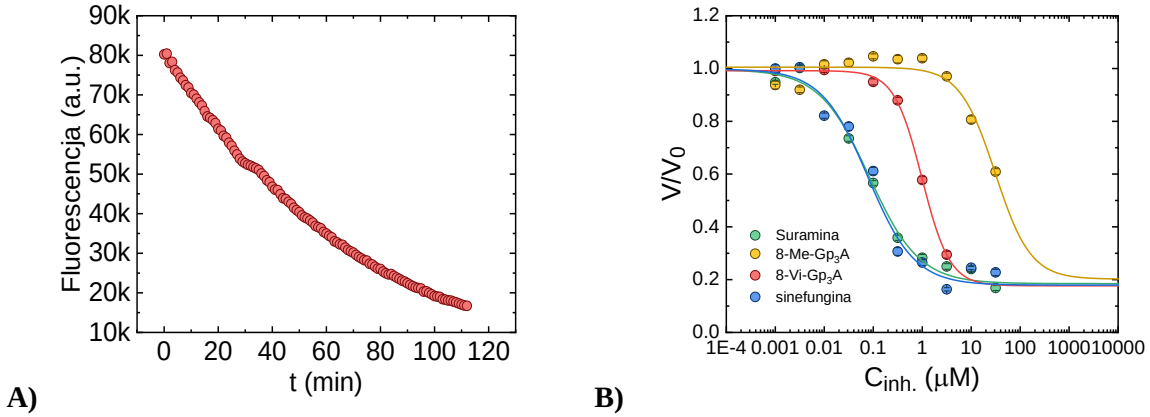
Tabela IV.23. Porównanie wyznaczonych wartości IC_{50} najsilniejszych inhibitorów N7–metylacji, zidentyfikowanych w bibliotece LOPAC®1280 dla enzymów Ecm1 i RNMT-RAM. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	IC_{50} (µM)	
	RNMT-RAM	Ecm1
Kwas aurintrokarboksylowy (AA)	0,47 ± 0,01	0,031 ± 0,005
NF 023	1,80 ± 0,33	0,015 ± 0,005
Reactive Blue 2	3,30 ± 0,73	0,043 ± 0,007
Suramina	0,70 ± 0,08	0,046 ± 0,006
Galloflawina	b.d.	0,12 ± 0,02
Kwercetyna	b.d.	0,12 ± 0,02
Myricetyna	b.d.	0,14 ± 0,01
Sinefungina	0,53 ± 0,07	0,014 ± 0,002

IV.7.7. Charakterystyka modelowej N7–MTazy wirusowej – VCE

W poprzednich rozdziałach zaprezentowano działanie metody PyFLINT-M w badaniach dwóch N7–metylotransferaz – Ecm1 z pasożyta *Encephalitozoon cuniculi* oraz ludzkiej RNMT-RAM. Jednak istotnym potencjalnym zastosowaniem opracowanej metody jest poszukiwanie inhibitorów N7–metylotransferaz wirusowych w celu opracowania leku przeciwko chorobie, którą wywołują. W tym celu sprawdzono, czy metodę PyFLINT-M można zastosować do badań enzymu VCE (ang. *Vaccinia Capping Enzyme*) z modelowego wirusa *Vaccinia*, który to jest dobrze scharakteryzowaną wirusową N7–metylotransferazą.

W pierwszej kolejności sprawdzono, czy sonda **C1-2** jest metylowana przez enzym VCE. W tym celu 2 µM sondy **C1-2** inkubowano z 50 µM SAM i 5U VCE w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 7,5 łącznie z odczytem intensywności fluorescencji w odstępach minutowych. Podczas inkubacji intensywność fluorescencji malała, co potwierdza, że sonda **C1-2** jest faktycznie N7–metylowana przez VCE (Rys. IV. 101A). Następnie wybrano cztery inhibitory: suraminę z biblioteki LOPAC®1280, 8-Vi-Gp$_3$A jako najsilniejszy inhibitor nukleotydowy, 8-Me-Gp$_3$A oraz sinefunginę (kontrola) i wyznaczono ich wartości IC$_{50}$. Eksperyment został przeprowadzony analogicznie do poprzednich dla Ecm1: 2 µM sondy **C1-2**, 50 µM SAM i 5U VCE inkubowano z rozcieńczeniami half-log inhibitora (stężenia od 0,001 nM do 31,6 µM), a postęp reakcji monitorowano prowadząc odczyt intensywności fluorescencji w 378 nm (λ_{exc} = 345 nm) w minutowych odstępach czasowych. Do otrzymanych zależności prędkości początkowych od stężenia substratu dopasowano czteroparametrowe równanie Hilla (22) oraz obliczono IC$_{50}$ (Rys. IV. 101B, Tabela IV. 24).



A) B)

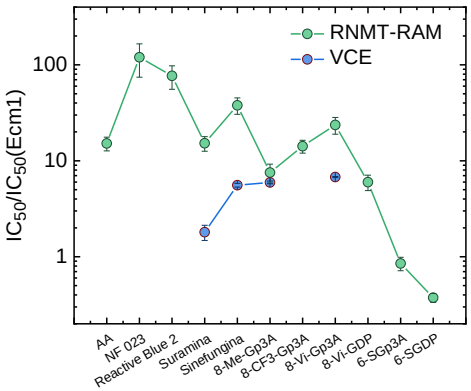
Rys. IV. 101. A) N7–metylacja sondy **C1-2** przez enzym VCE – zmiany intensywności fluorescencji w czasie, zarejestrowane dla mieszaniny reakcyjnej 2 µM sondy, 50 µM SAM i 5U VCE w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5; **B)** Krzywe inhibicji wybranych inhibitorów reakcji N7–metylacji sondy **C1-2**, katalizowanej przez enzym VCE. Mieszaniny reakcyjne zawierały sondę **C1-2** (2 µM), SAM (50 µM), VCE (5U) oraz inhibitor (0–31,6 µM, rozcieńczenia half-log) w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5. Mieszaniny inkubowano w 30°C na 96-dołkowej płytce. Odczyt fluorescencji przeprowadzono dla wzbudzania 345 nm i emisji 378 nm. Wyznaczone IC$_{50}$ zamieszczono w Tabeli IV. 24. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kasprzyk et al. 2020.[307]

Tabela IV.24. Porównanie wartości IC$_{50}$ wybranych inhibitorów wyznaczonych dla N7–metylacji katalizowanej przez enzymy z różnych organizmów: Ecm1, RNMT-RAM i VCE. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SD.

Związek	IC$_{50}$(µM)		
	RNMT-RAM	Ecm1	VCE
Suramina	0,70 ± 0,08	0,046 ± 0,006	0,083 ± 0,015
8-Vi-Gp$_3$A	3,45 ± 0,30	0,146 ± 0,026	0,989 ± 0,045
8-Me-Gp$_3$A	39,3 ± 7,6	5,21 ± 0,58	31,0 ± 6,8
Sinefungina	0,53 ± 0,07	0,014 ± 0,002	0,078 ± 0,026

Wartość IC$_{50}$ uzyskana dla suraminy była zbliżona do sinefunginy (odpowiednio 0,083 µM i 0,078 µM). Brak rozróżnienia pomiędzy tak silnymi inhibitorami może wynikać z ograniczenia metody. Zaobserwowano także, że pomiędzy IC$_{50}$ wyznaczonymi dla VCE, a wartościami uzyskanymi dla Ecm1 nie ma bezpośredniej zależności. Po podzieleniu IC$_{50}$ przez wartość IC$_{50}$ tego samego związku w pomiarze z Ecm1 (Rys. IV. 102) stwierdzono, że spośród badanych inhibitorów najbardziej selektywnym wobec VCE jest suramina. Ta sama analiza

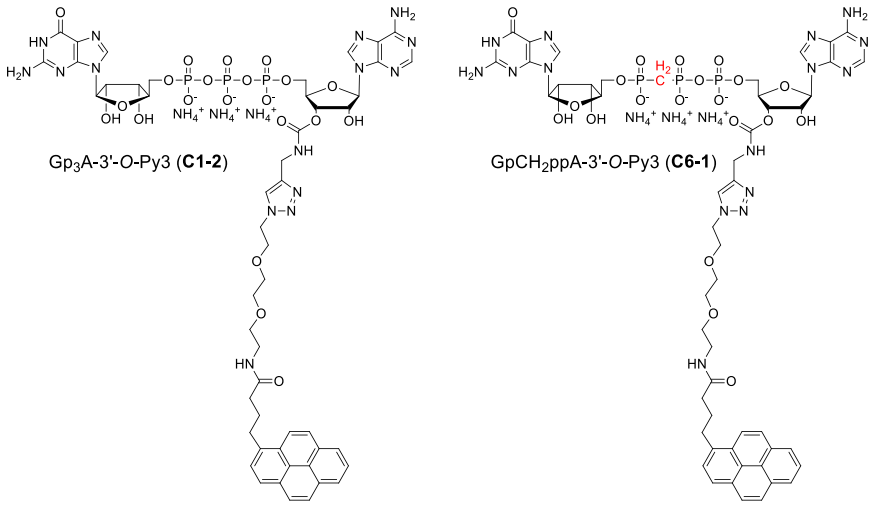
wykonana dla enzymu RNMT-RAM wykazała z kolei, że 6-S analogi nukleotydów są wobec niego preferowane.



Rys. IV. 102. Porównanie IC_{50} wybranych inhibitorów dla enzymów RNMT-RAM i VCE w odniesieniu do IC_{50} wyznaczonego dla Ecm1.

IV.7.8. Odporna na hydrolizę sonda do badań N7–metylotransferaz

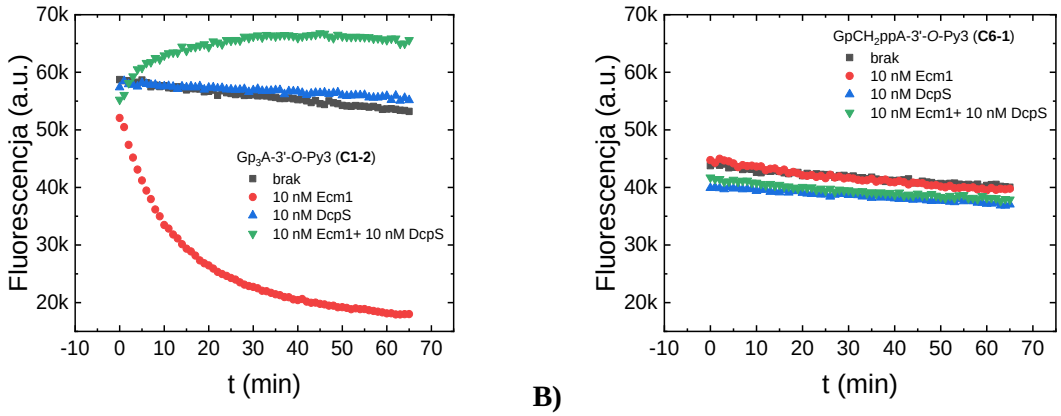
Podczas gdy sonda Gp_3A-3'-*O*-Py3 (**C1-2**) została z powodzeniem zastosowana do badań rekombinowanych N7–metylotransferaz, w bardziej złożonych mieszaninach biologicznych może pojawić się interferencja sygnału pochodząca od degradacji nukleotydu. Hydroliza produktu N7–metylacji sondy **C1-2** powoduje wzrost intensywności fluorescencji na skutek zaniku oddziaływań wygaszających pomiędzy 7-metyloguanozyną, a pirenem (Rozdział IV.4). Aby możliwe było monitorowanie aktywności endogennej N7–metylotransferazy do mieszaniny należy dodać inhibitor enzymów degradacji kapu (w szczególności DcpS) lub sonda musi być odporna na degradację zachodzącą po N7–metylacji. W tym celu zaprojektowany został analog sondy **C1-2**, zawierający modyfikację metylenobisfosfonianową pomiędzy β i γ fosforanem $GpCH_2ppA$-3'-*O*-Py3 (**C6-1**; Rys. IV. 103). Analogi kapu zawierające tego typu modyfikację znane są z odporności na hydrolizę przez DcpS.[168, 293]



Rys. IV. 103. Struktura sondy Gp_3A-3'-*O*-Py3 (**C1-2**) wykorzystanej do opracowania metody fluorescencyjnej PyFLINT-M oraz odpornej na hydrolizę sondy $GpCH_2ppA$-3'-*O*-Py3 (**C6-1**).

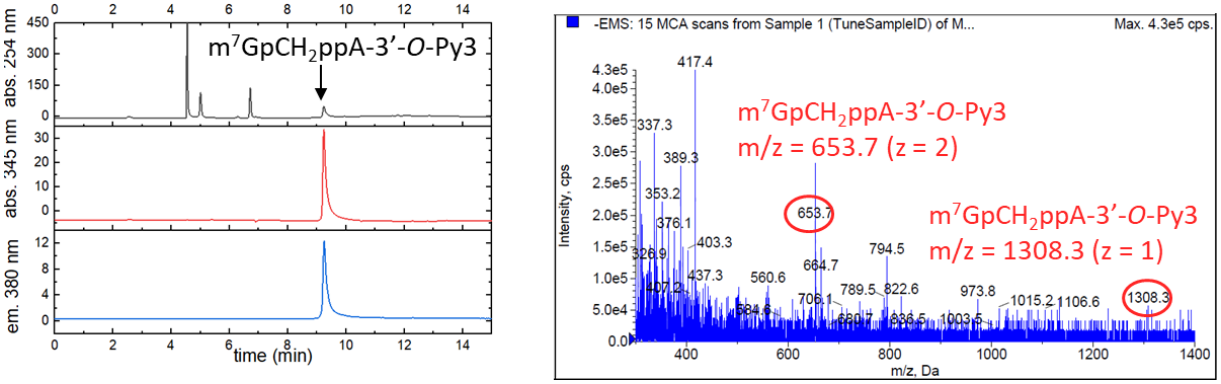
W pierwszej kolejności przetestowano, czy związek **C6-1** jest N7–metylowany przez Ecm1 w warunkach zoptymalizowanych metody PyFLINT-M. Sondę w stężeniu 2 μM inkubowano z 50 μM SAM i 10 nM Ecm1 oraz rejestrowano intensywność fluorescencji w

odstępach czasowych 1 min. Sprawdzono także próbki zawierające 10 nM DcpS zmiast Ecm1 oraz mieszaninę Ecm1 i DcpS w stężeniach 10 nM. W ramach kontroli analogiczny eksperyment przeprowadzono dla sondy niemodyfikowanej **C1-2**. W próbce zawierającej **C1-2** i Ecm1 zaobserwowano spadek fluorescencji związany z N7–metylacją, brak zmian w próbce z DcpS oraz wzrost fluorescencji w mieszaninie białek, który wynikał z nałożenia dwóch efektów – N7–metylacji (spadek) i degradacji produktu N7–metylacji (wzrost; Rys. IV. 104A – zielony). Jednak w żadnej z próbek z sondą **C6-1** nie zaobserwowano zmian fluorescencji (Rys. IV. 104B).



Rys. IV. 104. Zmiany intensywności fluorescencji sondy **A)** Gp_3A-3'-*O*-Py3 (**C1-2**) i **B)** $GpCH_2ppA$-3'-*O*-Py3 (**C6-1**) w trakcie inkubacji z mieszaniną enzymów Ecm1 i DcpS. Warunki reakcji: 2 µM sondy, 50 µM SAM, 10 nM Ecm1 i 10 nM DcpS (dimer). Eksperymenty przeprowadzono na czytniku płytek w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5 w 30°C.

Przeprowadzono dodatkowy eksperyment z użyciem RP HPLC, aby zweryfikować, czy sonda **C6-1** jest metylowana przez Ecm1 (Rys. IV. 105).



Rys. IV. 105. Potwierdzenie przebiegu N7–metylacji sondy **C6-1** przez Ecm1 z użyciem RP HPLC i MS. Warunki reakcji: 100 µM sondy **C6-1**, 1 µM Ecm1, 500 µM SAM, 5 mM DTT w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5. Reakcję inkubowano w 37°C przez 3 h i zatrzymano poprzez 2 min inkubacji w 98°C. Warunki analizy RP HPLC: eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T.

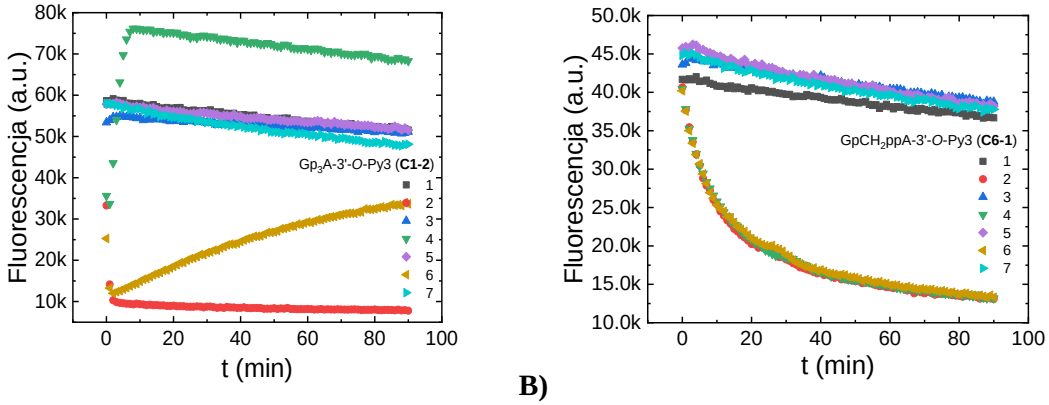
Eksperyment HPLC-MS potwierdził, że sonda **C6-1** ulega N7–metylacji, jednak przypuszczalnie konieczne jest zastosowanie wyższego stężenia enzymu. W kolejnym podejściu powtórzono eksperyment fluorescencyjny z dziesięciokrotnie wyższym stężeniem Ecm1 równym 100 nM. Dodatkowo wykonano także mieszaniny zawierające inhibitor DcpS RG3039 oraz inhibitor N7–metylotransferazy sinefunginę (Rys. IV. 106). Wykonano następujące mieszaniny, zawierające 2 µM sondy, 50 µM SAM oraz:

1 – brak enzymów;

2 – 100 nM Ecm1;

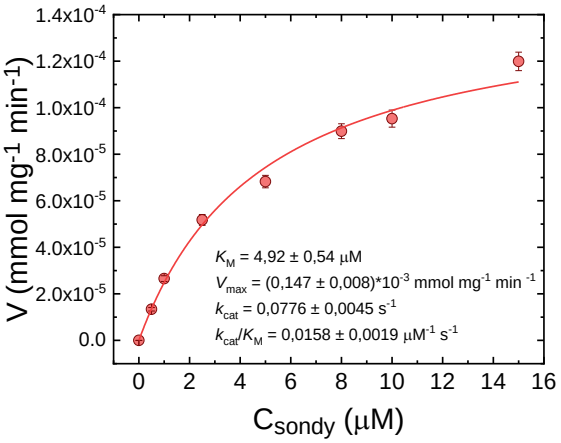
3 – 10 nM DcpS;
4 – 100 nM Ecm1 i 10 nM DcpS;
5 – 100 nM Ecm1, 10 nM DcpS i 30 µM sinefunginy;
6 – 100 nM Ecm1, 10 nM DcpS i 30 µM RG3039;
7 – 100 nM Ecm1, 10 nM DcpS, 30 µM sinefunginy i 30 µM RG3039.

Zaobserwowano, że obydwie sondy ulegają N7–metylacji, czemu towarzyszy spadek intensywności fluorescencji, jednak jedynie produkt metylacji **C6-1** jest stabilny i odporny na hydrolizę przez DcpS (Rys. IV. 106). Wynik ten potwierdza, że sonda GpCH$_2$ppA-3'-*O*-Py3 (**C6-1**) może być stosowana do selektywnego monitorowania aktywności N7–metylotransferazy w obecności enzymów degradujących kap.



Rys. IV. 106. Zmiany intensywności fluorescencji sondy **A)** Gp$_3$A-3'-*O*-Py3 (**C1-2**) i **B)** GpCH$_2$ppA-3'-*O*-Py3 (**C6-1**) w trakcie inkubacji z mieszaniną enzymów Ecm1 i DcpS. Warunki reakcji: 2 µM sondy, 50 µM SAM, 100 nM Ecm1 i 10 nM DcpS (dimer), 30 µM sinefunginy, 30 µM RG3039. Eksperymenty przeprowadzono na czytniku płytek w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,5 w 30°C.

Przypuszczalnie różnica w N7–metylacji sond **C1-2** i **C6-1** wynika z innej kinetyki reakcji. Aby zweryfikować tę hipotezę sondę **C6-1** w stężeniach 0–15 µM inkubowano z 50 µM SAM i 100 nM Ecm1 w 30°C wraz z odczytem intensywności fluorescencji w czasie. Do zależności otrzymanych prędkości początkowych od stężenia sondy **C6-1** dopasowano równanie Michaelisa-Menten i wyznaczono parametry kinetyczne (K_M, V_{max} i k_{cat}; Rys. IV. 107). Wartość K_M sondy **C6-1** wynosiła 4,92 ± 0,54 µM, a wydajność katalityczna (k_{cat}/K_M) 0,0158 ± 0,0019 s^{-1} μM^{-1}, co potwierdza, że sonda **C6-1** jest gorszym substratem N7–metylacji przez Ecm1 (wydajność katalityczna sondy **C1-2** to 0,074 ± 0,010 s^{-1} μM^{-1}).



Rys. IV. 107. Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji N7–metylacji sondy GpCH$_2$ppA-3'-*O*-Py3 (**C6-1**) przez Ecm1. Prędkość początkowa reakcji w funkcji stężenia sondy **C6-1** w obecności kosubstratu SAM i N7–metylotransferazy Ecm1: 100 nM Ecm1/50 µM SAM. Zaprezentowane dane to wartości średnie ± SD. Postęp reakcji odpowiada standardowej kinetyce Michealisa-Menten.

IV.7.9. Podsumowanie

Celem projektu było opracowanie bezpośredniej metody wysokoprzepustowej o ograniczonych kosztach, w oparciu o proste zmiany intensywności fluorescencji do monitorowania aktywności mRNA kap N7–guanino metylotransferazy. Modelowym, dobrze scharakteryzowanym enzymem wykorzystanym w badaniach była N7–metylotransferaza Ecm1 z *Encephalitozoon cuniculi*. Wyniki uzyskane dla Ecm1 następnie wykorzystano do badań ludzkiej N7–metylotransferazy RNMT w kompleksie z podjednostką RAM. W celu zaprezentowania użyteczności metody przetestowano także modelowe białko wirusowe *Vaccinia Capping Enzyme* (VCE), posiadające aktywność N7–metylotransferazy.

Sondy fluorescencyjne zaprojektowano głównie w oparciu o strukturę analogów Gp_3A, które zostały zsyntetyzowane w reakcji CuAAC pomiędzy nukleotydem modyfikowanym grupą alkinową, a znacznikiem fluorescencyjnym, zawierającym grupę azydkową. Należy zaznaczyć, że mononukleotydowy analog G nie był dobrym substratem dla enzymu Ecm1. Wynik ten wymógł zastosowanie bardziej złożonej struktury, takiej jak dinukleotyd. W celu optymalizacji struktury sondy wyselekcjonowano najbardziej korzystny znacznik fluorescencyjny, pozycję znakowania oraz odległość pomiędzy guanozyną i znacznikiem. Przetestowano sześć fluoroforów włączając w to piren (Py, Py3), perylen (Pe), analog BODIPY (BDP-FL), 5-karboksyfluoresceinę ((5)FAM2), cyjaninę 3 (Cy3) i cyjaninę 5 (Cy5). Poszukiwano znacznika, którego intensywność fluorescencji ulega zmianie na skutek różnicy w oddziaływaniu z guanozyną oraz N7–metyloguanozyną – produktem metylacji. Zaobserwowano, że N7–metylacja znakowanego pirenem Gp_3A (**C1-1**) prowadziła do największych zmian intensywności fluorescencji, która spadała w trakcie procesu. Zjawisko to zostało także zaobserwowane w wartościach wydajności kwantowych QY niemetylowanych sond Gp_3A (**C1-1** i **C1-2**) w porównaniu do N7–metylowanych (**C2-1** i **C2-2**), których QY były od dwóch do siedmiu razy niższe. Wynik ten oznacza, że fluorescencja pirenu jest wygaszana bardziej efektywnie przez 7-metyloguanozynę niż guanozynę. Wniosek ten jest podobny do poprzednich obserwacji, w których piren był unikalnym fluoroforem, a jego fluorescencja wygaszana jest w różny sposób przez różne zasady azotowe (Rozdział IV. 4). Struktura Gp_3A znakowanego pirenem poprzez pozycję 3'-*O* adenozyny (**C1-1**) była dalej optymalizowana poprzez testowanie różnych pozycji znakowania, jak 2'-*O*/3'-*O* guanozyny, N6-adeniny i N1-guaniny w Gp_3G. Jedynie znakowanie w 3'-*O* pozycji adenozyny prowadziło do zmian intensywności fluorescencji w trakcie N7–metylacji. Następnie, stosując dłuższy linker pomiędzy pirenem i 3'-*O* adenozyną (Py3) polepszono mierzony sygnał analityczny (**C1-2**). Ostatecznie sonda **C1-2** została wyselekcjonowana do opracowania metody opartej o zmiany intensywności fluorescencji FLINT do badań aktywności N7–metylotransferaz (PyFLINT-M).

W celu zoptymalizowania warunków reakcji wyznaczono parametry kinetyczne N7–metylacji sondy **C1-2** katalizowanej przez Ecm1 i RNMT-RAM. Wartość K_M substratu **C1-2** dla Ecm1 (22,0 ± 2,4 μM) była wyższa niż dla RNMT-RAM (11,4 ± 2,8 μM), co oznacza, że reakcja katalizowana przez RNMT-RAM szybciej osiąga prędkość maksymalną. Wydajność katalityczna enzymów została obliczona, jako k_{cat}/K_M i dla enzymu Ecm1 miała wyższą wartość (0,075 s^{-1} μM^{-1}), niż dla RNMT-RAM (0,014 s^{-1} μM^{-1}), co oznacza, że sonda **C1-2** jest lepszym substratem enzymu Ecm1. Stężenie kosubstratu SAM ustalono z wyznaczonych krzywych Michaelisa-Menten, prezentujących zależność prędkości początkowej od stężenia SAM. Wybrano stężenie SAM z górnego plateau krzywych, aby prędkość reakcji nie zmieniała się na skutek niewielkich zmian stężenia SAM (50 μM dla Ecm1 i 20 μM dla RNMT-RAM).

Metodę fluorescencyjną do badań Ecm1 i RNMT-RAM poddano walidacji poprzez wyznaczenie parametrów *z*. Potwierdzono, że obydwie metody mogą być stosowane w eksperymentach HTS, gdyż ich parametry *z* są większe od 0,5 (0,74 dla Ecm1 i 0,67 dla RNMT-RAM).

W celu wykazania użyteczności metody PyFLINT-M zastosowano ją do charakterystyki małej biblioteki 8 związków o strukturze nukleotydowej, jako potencjalnych inhibitorów N7–metylacji, podstawionych w pozycji C8 lub modyfikowanych siarką w C6. Analogi Gp_3A posiadały modyfikację C8: -metylową, -cyklopropylową, -winylową i –fenylową. Sprawdzono także, czy modyfikacja C8 grupą trifluorometylową, która wyciąga gęstość elektronową z pierścienia guaniny, poprawia właściwości inhibujące N7–metylotransferazy. Na podstawie obliczonych IC_{50} dla enzymu Ecm1 można stwierdzić, że najsilniejszym inhibitorem o strukturze nukleotydowej jest analog winylowy 8-Vi-Gp_3A, którego wysoka wartość współczynnika Hilla może sugerować inhibicję nieodwracalną na skutek zajścia reakcji addycji Michaela z grupą tiolową lub aminową w miejscu wiążącym białka. Z tego względu przetestowano także serię 8-winylowych mononukleotydów guanozynowych oraz 7-metyloguanozynowych. Stwierdzono, że obecność drugiego nukleotydu jest istotna dla właściwośći inhibujących (8-Vi-Gp_3A vs. 8-Vi-GDP oraz $^{6\text{-S}}Gp_3A$ vs. $^{6\text{-S}}$GDP). Nukleotydy 8-winylo-7-metyloguanozynowe, jako analogi produktu N7–metylacji były słabymi inhibitorami.

W kolejnym etapie wybrane związki przetestowano w eksperymencie inhibicji N7–metylacji katalizowanej przez ludzki enzym RNMT-RAM. Także w tym przypadku najsilniejsym nukleotydowym inhibitorem był 8-Vi-Gp_3A, jednak po porównaniu IC_{50} do wartości otrzymanych dla Ecm1, zaobserwowano, że analogi 6-S silniej hamują metylację katalizowaną przez RNMT-RAM. Analizując otrzymane wyniki można także stwierdzić, że modyfikacje C8- i 6-S poprawiają właściwości inhibujące w porównaniu do niemodyfikowanego Gp_3A. W przypadku obydwu białek sinefungina inhibowała metylację najsilniej, jednak 8-Vi-Gp_3A jest strukturalnie podobny do substratu N7–metylotransferaz, wobec czego może posłużyć, jako wyjściowa struktura do dalszego projektowania selektywnie działających inhibitorów.

Następnie metodę PyFLINT-M zastosowano do przeprowadzenia wysokoprzepustowych eksperymentów przesiewowych komercyjnie dostępnej biblioteki związków LOPAC®^{1280}, zawierającej 1280 małocząsteczkowych związków, dla których wykazano, że są farmakologicznie czynne. W efekcie wyselekcjonowano 56 związków, które hamowały postęp N7-metylacji w przynajmniej 90%. Następnie wyznaczono parametry IC_{50} 56 związków, w wyniku, czego zidentyfikowano 14 molekuł o $IC_{50} < 0{,}4$ μM, w tym 4 o $IC_{50} < 0{,}05$ μM. Najsilniejszym znalezionym inhibitorem Ecm1 o IC_{50} 0,015 ± 0,005 μM zbliżonym do sinefunginy (0,020 ± 0,004 μM) był analog suraminy NF 023. Suramina także silnie inhibowała aktywność N7–metylotransferazy, jednak nieco słabiej niż NF 023 (IC_{50} = 0,046 ± 0,006 μM). Suramina i jej analogi działają na wiele celów biologicznych,[310] często oddziałując z miejscem wiążącym nukleotyd w strukturze białka.[311] Ponadto w literaturze wielokrotnie prezentowano ich właściwości inhibujące aktywność metylotransferaz histonowych.[312] Jednak suramina jest dużą molekułą i jej szerokie zastosowania biologiczne sprawiają, że nie jest selektywnym inhibitorem. Kolejny zidentyfikowany inhibitor – kwas aurintrokarboksylowy (ang. *Aurintricarboxylic acid*, AA) polimeryzuje w środowisku wodnym inhibując w ten sposób oddziaływania białko – kwas nukleinowy. Polianionowa forma AA interferuje z oddziaływaniami elektrostatycznymi, które są niezbędne do uformowania kompleksu białka z kwasem nukleinowym.[313] W literaturze wykazano już, że AA jest inhibitorem N7–metylotransferazy, np. koronawirusów,[143] poprzez oddziaływanie z 3'-*O* pozycją rybozy SAM

w miejscu wiążącym białka.[133] Podobnie do suraminy AA oddziałuje na wiele celów molekularnych przez co nie jest inhibitorem selektywnym. Kolejną grupą inhibitorów zidentyfikowanych w bibliotece LOPAC®1280 są analogi flawonoidów: galloflawina (IC_{50} 0,119 ± 0,018 μM), kwercetyna (IC_{50} 0,124 ± 0,019 μM) i myricetyna (IC_{50} 0,140 ± 0,012 μM). Związki te są małymi molekułami, zbudowanymi z pierścieni aromatycznych, funkcjonalizowanych grupami hydroksylowymi (-OH), które mogą być łatwo zmodyfikowane chemicznie, dzięki czemu stanowią obiecujący cel w dalszej optymalizacji struktury i projektowaniu leków. Kwercetyna i myricetyna posiadają właściwości inhibujące białko SARS-nsp14, odpowiedzialne za katalizę N7–metylacji, oraz ludzką N7–MTazę RNMT-RAM.[139] Ciekawym odkryciem jest także barwnik Reactive Blue 2 o IC_{50} 0,043 ± 0,007 μM, w którego strukturze dominują układy aromatyczne.

Porównujac struktury najsilniejszych wykrytych inhibitorów z biblioteki LOPAC®1280 wywnioskowano, że obecność grup sulfonowych zwiększa właściwości inhibitorowe wobec Ecm1. W literaturze odnotowano, że grupy naftylosulfonowe (NS) suraminy konkurują z peptydami w reakcji N7–metylacji przez enzym PRMT1. Podstawnik anionowo-sulfonianowy tworzy wiązania wodorowe z azotami grupy guanidynowej argininy, a pierścień naftalenu oddziałuje z jej łańcuchem bocznym poprzez oddziaływania van der Waalsa i π-stacking.[314]

Pozostałe związki spośród najsilniejszych 14 zidentyfikowanych inhibitorów z biblioteki LOPAC®1280 to: tyrfostina 51, mifamurtyd, protoporfiryna IX, 6-hydroxy-DL-DOPA, cefsulodyna oraz Ro 8-4304. Zgodnie z najlepszą wiedzą Autorki właściwości inhibujące tych związków względem mRNA kap N7–guanino metylotransferazy zaprezentowano po raz pierwszy w niniejszej pracy.

Podsumowując, opracowana metoda fluorescencyjna PyFLINT-M pozwala na monitorowanie aktywności oraz inhibicji enzymu mRNA kap N7–guanino metylotransferazy w czasie rzeczywistym. Metoda oparta jest o zmiany intensywności znakowanego pirenem analogu Gp_3A, którego synteza jest prosta i niedroga oraz nie wymaga skomplikowanego układu. Metodę można stosować do monitorowania aktywności N7–metylotransferaz z różnych organizmów, jak przedstawiono dla enzymów Ecm1, RNMT-RAM i VCE. Zatem możliwa jest ocena selektywności inhibitorów wzlgędem N7–metylotransferaz zaangażowanych w procesy chorobotwórcze, co jest kluczowe do rozwoju odpowiedniej terapii. Ograniczenie metody może wynikać z faktu, iż piren absorbuje i emituje w bliskim UV. Jednak pomimo interferencji z emisją czternastu związków w bibliotece LOPAC®1280 nadal możliwa była ocena ich właściwości inhibitorowych (podobnie w przypadku fluoryzującego 8-Ph-Gp_3A).

Poniższa Tabela IV. 25 zawiera opis warunków oraz sposób wykonania eksperymentów wykorzystujących opracowaną metodę PyFLINT-M.

Tabela IV.25. Optymalne warunki stosowania metody fluorescencyjnej, przeznaczonej do wyznaczania stałych inhibicji inhibitorów N7–MTazy, w oparciu o zmiany fluorescencji sondy pirenowej **C1-2** w czasie (PyFLINT-M).

Skład próbki	Optymalne stężenie sondy	Ecm1 – 2 μM RNMT-RAM – 2 μM
	Optymalne stężenie kosubstratu SAM	Ecm1 – 50 μM RNMT-RAM – 20 μM
	Optymalne stężenie enzymu	Ecm1 – 10 nM RNMT-RAM – 20 nM

	Bufor	50 mM Tris–HCl pH 7,5
Warunki pomiaru	Długość fali wzbudzania/emisji sondy	345 nm/378 nm
	Punkty temperaturowe	30°C
	Warunki preinkubacji	I: 15 min/300 rpm II: 20 minut pomiaru na czytniku bez enzymu

IV.8. Metoda fluorescencyjna do badań tworzenia kompleksu nukleotyd-TG2

W poprzednich rozdziałach zaprezentowano użyteczność metod fluorescencyjnych w badaniach oddziaływań białko–ligand, opartych o proste pomiary intensywności fluorescencji FLINT. Spośród testowanych mononukleotydowych analogów kapu znakowanych różnymi fluorofortami takimi, jak piren, BDP-FL, karboksyfluoresceina czy cyjaniny, jedynie analogi znakowane pirenem zmieniają intensywność fluorescencji na skutek związania z białkiem, bądź degradacji enzymatycznej. Zjawisko to wynika z obecności oddziaływań wygaszających pomiędzy zasadą azotową, a pirenem. Pomiary FLINT mają wiele zalet – są proste i nie wymagają stosowania skomplikowanego układu pomiarowego. Jednak maksimum emisji pirenu znajduje się w zakresie bliskiego UV, co może prowadzić do interferencji z naturalną fluorescencją ligandów. Z tego punktu widzenia korzystne jest stosowanie znaczników fluorescencyjnych o emisji w zakresie światła widzialnego, takich jak fluoresceiny, czy cyjaniny. Gdy zmiana intensywności fluorescencji zachodząca w trakcie procesu jest nieznaczna związek może znaleźć zastosowanie m. in. w pomiarach polaryzacji fluorescencji FP (anizotropii FA).

Monoznakowane nukleotydy guanozynowe zostały zastosowane w niniejszej pracy doktorskiej do opracowania metody fluorescencyjnej przeznaczonej do charakterystyki miejsca wiążącego GTP ludzkiego białka transglutaminazy II (TG2) w oparciu o pomiary polaryzacji fluorescencji. Transglutaminaza II przejawia wiele aktywności związanych z metabolizmem aminokwasów, peptydów i nukleotydów. Podobnie do innych transglutaminaz, TG2 jest odpowiedzialna za katalizę procesu sieciowania białek i peptydów w reakcji transamidacji pomiędzy glutaminą, a lizyną (lub inną aminą pierwszorzędową). Proces ten jest zależny od jonów Ca^{2+} i prowadzi do utworzenia odpornego na proteolizę wiązania γ-glutamylo-ε-lizyny.[145] Drugą, wspomnianą aktywnością TG2 jest wiązanie GTP/aktywność GTPazy (także ATP). Związanie cząsteczki GTP/GDP przez TG2 prowadzi do inhibicji jego aktywności transamidacji i promuje aktywność białka G. Związanie jonów wapnia Ca^{2+} wywołuje odwrotny efekt. Zatem GTP/GDP i jony Ca^{2+} są odwrotnymi regulatorami aktywności transamidazy i GTPazy białka TG2.[147]

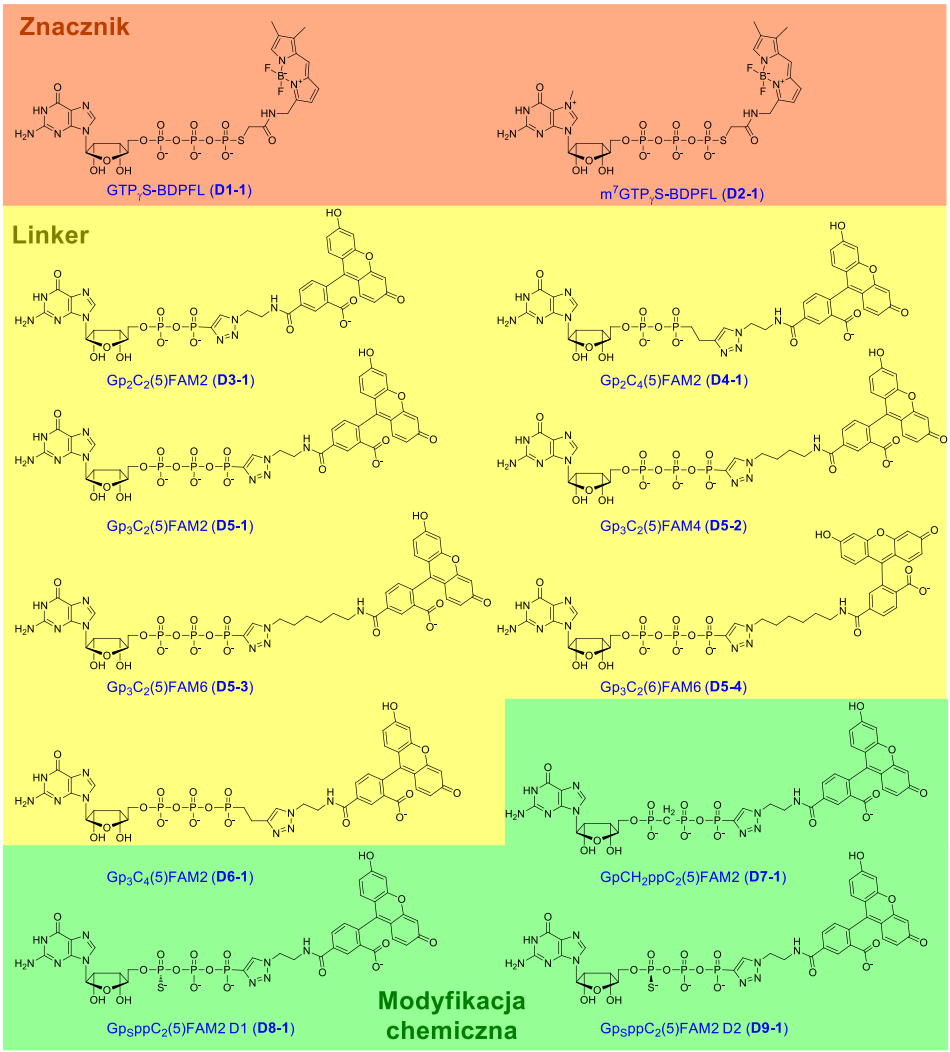
W ramach projektu poszerzono zestaw fluorescencyjnych sond guanozynowych. Zsyntetyzowano serię G-nukleotydów różniących się znacznikiem fluorescencyjnym (BDP-FL, 5-karboksyfluoresceina lub 6-karboksyfluoresceina), ilością grup fosforanowych, długością linkerów oraz obecnością modyfikacji chemicznej. Analizując wyznaczone wartości stałych dysocjacji K_D oraz współczynników wygaszania Q wybrano najbardziej optymalną sondę fluorescencyjną, wykorzystaną następnie do opracowania metody FA. Poprawność działania

metody zweryfikowano w eksperymencie wiązania kompetycyjnego ze znanymi ligandami białka TG2: GTP, GTP$_\gamma$S, GDP i ATP. Wyznaczono także wartość parametru z w czasie inkubacji układu przez 0, 30 i 60 min. Opracowaną metodę zastosowano następnie do charakterystyki biblioteki 24 ligandów o strukturze nukleotydowej. Na koniec metodę zastosowano do wyznaczenia IC_{50} nieodwracalnych, allosterycznych inhibitorów białka.

Projekt realizowano we współpracy z grupą dr Markusa Pietscha z Instytutu II Farmakologii, Centrum Farmakologii Wydziału Medycznego Uniwersytetu w Kolonii. Autorka niniejszej pracy przeprowadziła syntezę fluorescencyjnych analogów G-nukleotydów oraz ich charakterystykę spektroskopową w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW. Wraz z dr Christophem Hauserem autorka wykonywała także pomiary biofizyczne w trakcie stażu badawczego w grupie dr Markusa Pietscha w ramach programu Erasmus+.

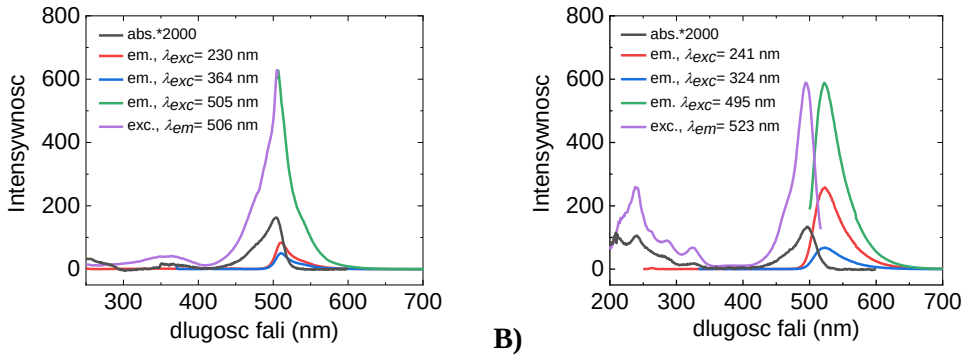
IV.8.1. Charakterystyka spektroskopowa – Seria D

W ramach Serii D fluorescencyjnie znakowanych mononukleotydów zsyntetyzowano 12 związków zawierających fluorofory BDP-FL, 5-karboksyfluoresceinę i 6-karboksyfluoresceinę przyłączone linkerem etylowym, butylowym lub heksylowym z pierścieniem triazolowym. Otrzymano analogi di- i trifosforanów guanozyny oraz jeden analog nukleotydu 7-metyloguanozynowego. Ponadto przetestowano takie modyfikacje chemiczne, jak α,β-metylenobisfosfonianowa i α-tiofosforanowa (Rys. IV. 108).



Rys. IV. 108. Struktury sond stosowanych do badań wiązania ligandów z białkiem TG2.

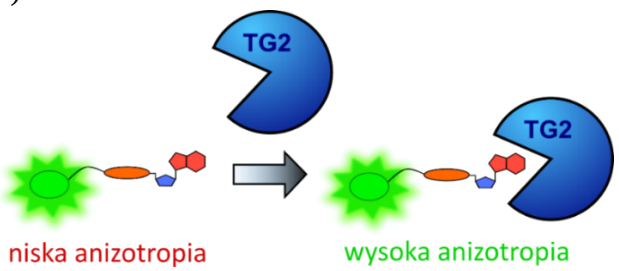
W pierwszej kolejności scharakteryzowane zostały właściwości spektroskopowe otrzymanych sond fluorescencyjnych. Wykonano pomiar widm absorpcji, wzbudzania oraz emisji fluorescencji (Rys. IV. 109). Zarejestrowane widma znakowanych nukleotydów odpowiadają widmom izolowanych znaczników BDP-FL i 5-karboksyfluoresceiny. Emisja fluoroforów znajduje się w zakresie światła widzialnego i charakteryzuje się ona wysokimi wartościami wydajności kwantowych. W przypadku znacznika BDP-FL widoczne jest bardzo małe przesunięcie Stokesa rzędu 2–3 nm.



Rys. IV. 109. Widma absorpcji, wzbudzania oraz emisji fluorescencji analogów GTP znakowanych **A)** BDP-FL (**D1-1**) i **B)** 5-karboksyfluoresceiną (**D5-1**). Widma zostały zarejestrowane w buforze 50 mM Tris–HCl pH 8,0 w stężeniu 1 µM.

IV.8.2. Optymalizacja struktury sondy – wyznaczanie K_D kompleksu nukleotyd-TG2

W celu wyselekcjonowania optymalnej sondy fluorescencyjnej do charakterystyki ligandów miejsca wiążącego GTP białka TG2, wszystkie otrzymane związki przetestowano w eksperymencie mającym na celu wyznaczenie stałej dysocjacji K_D. Anizotropia sondy niezwiązanej jest niska i rośnie w trakcie miareczkowania białkiem TG2 na skutek utworzenia kompleksu (Rys. IV. 110).

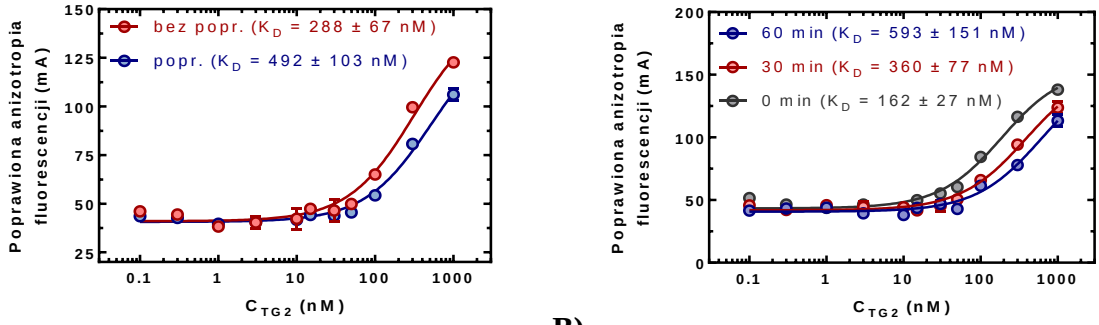


Rys. IV. 110. Schemat przedstawiający zmiany anizotropii fluorescencji małocząsteczkowej sondy fluorescencyjnej z białkiem TG2.

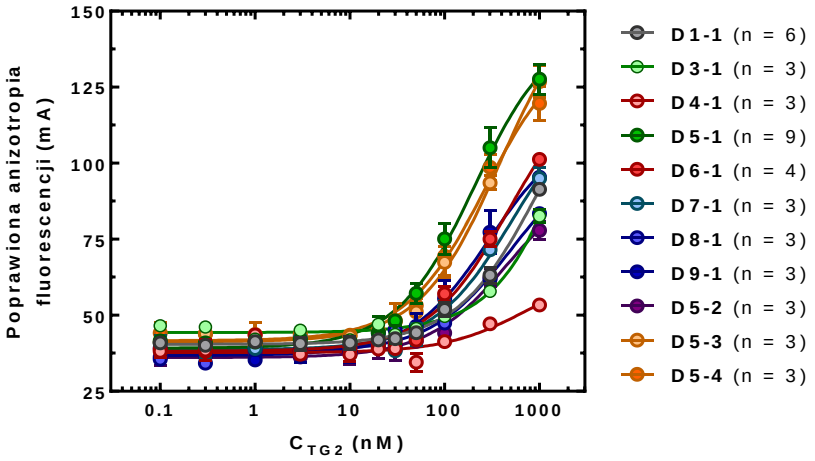
Wykonano od trzech do dziewięciu oddzielnych powtórzeń pomiarów anizotropii fluorescencji mieszanin sondy w stężeniu 50 nM oraz białka TG2 w stężeniach 0.1 – 1000 nM w buforze 200 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7,3. Mieszaniny inkubowano w temperaturze 30°C. Odczytu zarówno anizotropii, jak i intensywności fuorescencji dokonano po 0, 30 i 60 minutach. W oparciu o zmiany intensywności fluorescencji w trakcie wiązania z TG2 wyznaczono wartości współczynnka wygaszania Q, będącego stosunkiem fluorescencji przy całkowitym wiązaniu Q_b do fluorescencji przy braku wiązania Q_f (Q_b/Q_f). Korzystając z obliczonych Q oraz anizotropii wolnej i związanej sondy wykonano poprawkę zarejestrowanych wartości anizotropii fluorescencji w różnych stężeniach białka, zgodnie ze wzorem (25). Do otrzymanych zależności skorygowanej anizotropii fluorescencji od stężenia białka została dopasowana krzywa wiązania

opisana wzorem (3). Zastosowanie poprawki prowadzi do zmniejszenia wartości K_D (Rys. IV. 111A). Czas inkubacji mieszaniny sonda-białko także wpływa na obliczoną wartość K_D – im dłuższy czas tym niższe wyznaczone K_D (Rys. IV. 111B).

Krzywe wiązania uzyskane po 60 minutach inkubacji sond z białkiem TG2 po zastosowaniu poprawki na wartości anizotropii fluorescencji, zostały zaprezentowane na Rys. IV. 112. Obliczone wartości K_D oraz współczynniki wygaszania Q zestawiono w tabeli IV. 26.



Rys. IV. 111. Porównanie krzywych wiązania sondy **D5-1** do białka TG2 wyznaczonych w temperaturze 30°C: **A)** bez lub z poprawką po 60 minutach inkubacji; **B)** z poprawionymi wartościami anizotropii fluorescencji po różnych czasach inkubacji: 0, 30 i 60 min. Wartości średnie ± SEM, n = 1.



Rys. IV. 112. Porównanie krzywych wiązania zsyntetyzowanych sond fluorescencyjnych z Serii D do białka TG2. Przedstawione wartości są wartościami średnimi ± SEM z 3–9 eksperymentów po 60 minutach inkubacji układu w temperaturze 30°C. Obliczone wartości K_D zestawiono w Tabeli IV.26.

Tabela IV.26. Wyznaczone wartości K_D sond **D1-1** oraz **D3-1–D9-1** do białka TG2. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SEM.

Związek		K_D (nM)	n	Q
Znacznik	GTP$_\gamma$S-BDP-FL **(D1-1)**	940 ± 120	6	4,69 ± 0,41
Odległość guanozyna-znacznik	Gp$_2$C$_2$(5)FAM2 (**D3-1**)	4037 ± 2479	3	1
	Gp$_2$C$_4$(5)FAM2 (**D4-1**)	690 ± 443	3	0,77 ± 0,02
	Gp$_3$C$_2$(5)FAM2 (**D5-1**)	181 ± 10	9	1,46± 0,18
	Gp$_3$C$_4$(5)FAM2 (**D6-1**)	447 ± 42	4	1
	Gp$_3$C$_2$(5)FAM4 (**D5-2**)	432 ± 84	3	1
	Gp$_3$C$_2$(5)FAM6 (**D5-3**)	356 ± 33	3	1
	Gp$_3$C$_2$(6)FAM6 (**D5-4**)	239 ± 33	3	1

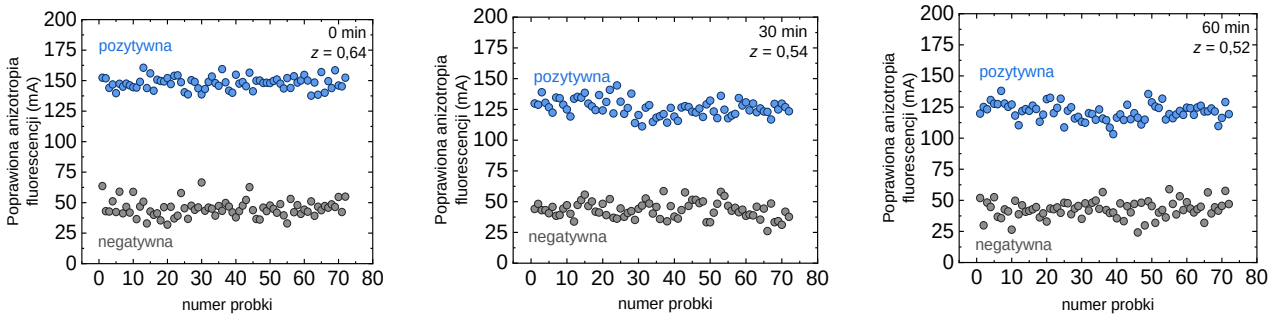
Modyfikacja chemiczna	$GpCH_2ppC_2$(5)FAM2 (**D7-1**)	506 ± 76	3	1
	Gp_SppC_2(5)FAM2 D1 (**D8-1**)	476 ± 65	3	2,22 ± 0,35
	Gp_SppC_2(5)FAM2 D2 (**D9-1**)	266 ± 43	3	1,09 ± 0,72

n – liczba eksperymentów
Q – zmiana intensywności fluorescencji w trakcie wiązania (współczynnik wygaszania)

Związek $m^7GTP_\gamma S$-BDP-FL (**D2-1**) nie wiązał się z białkiem, dlatego też pozostałe sondy zawierały tylko nukleozydy guanozynowe. Nukleotydy znakowane (5)FAM okazały się być lepszymi sondami do opracowania metody badania wiązania z pomiarami anizotropii fluorescencji niż związek znakowany BDP-FL (**D1-1**) ze względu na niższą wartość współczynnika wygaszania *Q*. W przypadku pomiarów anizotropii fluorescencji inaczej niż w pomiarach FLINT istotne jest, aby współczynnik wygaszania był jak najbliższy 1. Obecność pierścienia triazolowego przyłączonego bezpośrednio do atomu fosforu jest preferowana ze względu na niższą wartość K_D, w porównaniu do nukleotydów zawierających linker dwuwęglowy pomiędzy pierścieniem triazolowym, a atomem fosforu (K_D 181 ± 10 nM dla **D5-1** i 447 ± 42 dla **D6-1**). Ponadto difosforany są słabszymi ligandami białka TG2 (K_D 4037 ± 2479 nM dla **D3-1** i 181 ± 10 nM). Wydłużenie linkera pomiędzy pierścieniem triazolowym, a znacznikiem fluorescencyjnym prowadzi do korzystnego zmniejszenia współczynnika *Q* do wartości 1, jednak powinowactwo sondy do białka zmniejsza się około dwukronie. Modyfikacje chemiczne łańcucha fosforanowego α,β-metylenobisfosfonianowa (**D7-1**) i α-tiofosforanowa (**D8-1** i **D9-1**) nie zwiększają powinowactwa sondy do białka TG2. Podsumowując wszystkie wnioski wyciągnięte z pomiarów K_D sonda Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**) została wyselekcjonowana do opracowania metody fluorescencyjnej FA i badania ligandów niefluoryzujących, ze względu na najniższą wartość K_D i *Q* zbliżone do 1. Za optymalne warunki uznano warunki eksperymentu wyznaczania K_D sond fluorescencyjnych i 300 nM białka TG2.

IV.8.3. Walidacja metody

W celu zweryfikowania czy opracowana metoda wykorzystująca pomiary anizotropii fluorescencji może być stosowana w wysokoprzepustowych eksperymentach przesiewowych wyznaczono wartość parametru *z*. W tym celu wykonano pomiary kontroli pozytywnej, będącej mieszaniną 50 nM sondy **D5-1** i 300 nM TG2 oraz negatywnej, zawierającej dodatkowo 30 µM $GTP_\gamma S$ (72 powtórzenia). Mieszaniny inkubowano w 30°C przez 60 minut. Po czasie 0, 30 i 60 min wykonano odczyt intensywności oraz anizotropii fluorescencji (Rys. IV. 113).

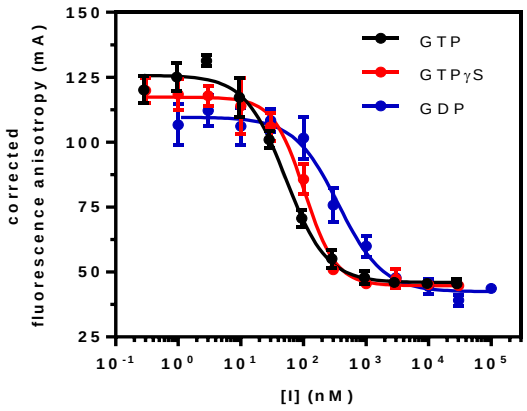


Rys. IV. 113. Wyznaczanie parametru *z* metody FA badania powinowactwa ligandów do białka TG2 po różnych czasach inkubacji: 0, 30 i 60 min w 30°C, z użyciem sondy Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**).

Obliczone wartości parametru z wynosiły 0,64, 0,54 i 0,52 po czasie inkubacji układu odpowiednio 0, 30 i 60 min. Uzyskane wartości powyżej 0,5 oznaczają, że metodę można stosować w eksperymentach HTS. Jakość metody spada wraz z czasem inkubacji próbek, a po 60 minutach znajduje się na granicy klasyfikacji, jako metoda HTS. Metodę można dopracować projektując bardziej czułą sondę, bądź zmieniając warunki prowadzenia pomiarów. Jednakże uzyskany wynik jest wystarczający, aby można było zastosować opracowaną metodę do wyznaczania stałych powinowactwa ligandów tworzących kompleks z białkiem TG2 poprzez oddziaływanie w miejscu wiążącym GTP.

IV.8.4. Wyznaczanie K_D serii niefluoryzujących nukleotydów

Sonda Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**) została wyselekcjonowania do przeprowadzenia eksperymentów kompetycyjnego wiązania z wybranymi, niefluoryzującymi nukleotydami w celu wyznaczenia ich wartości IC_{50}. W pierwszej kolejności wyznaczono IC_{50} znanych ligandów TG2: GTP, GTP$_\gamma$S, GDP oraz ATP, a następnie otrzymane wartości porównano z danymi literaturowymi, celem sprawdzenia poprawności działania metody. Eksperyment wykonano w zoptymalizowanych warunkach: 50 nM sondy **D5-1**, 300 nM TG2 dla 0–100 µM inhibitora. Następnie mieszaniny inkubowano w 30°C przez 60 minut. Zmierzone wartości anizotropii fluorescencji zostały skorygowane w oparciu o wyznaczony wcześniej współczynnik wygaszania dla sondy **D5-1**. Do otrzymanych zależności dopasowano równanie czteroparametrowe (5), dzięki czemu zostały wyznaczone wartości IC_{50} (Rys. IV. 114; Tabela IV. 27). Otrzymane wartości IC_{50} są zbliżone do danych literaturowych (GTP jest najsilniejszym inhibitorem, a ATP najsłabszym), co oznacza, że opracowana metoda może być z powodzeniem stosowana do poszukiwań ligandów miejsca wiążącego GTP ludzkiej transglutaminazy II.



Rys. IV. 114. Krzywe wiązania wybranych ligandów GTP, GTP$_\gamma$S i GDP z białkiem TG2 (wartości średnie ± SEM, n = 3).

Tabela IV.27. Zestawienie wartości IC_{50} wybranych ligandów białka TG2. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SEM.

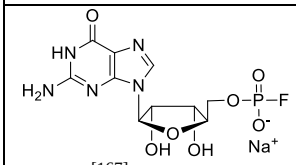
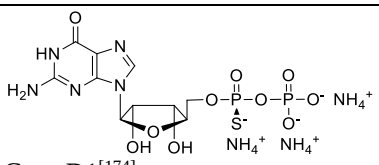
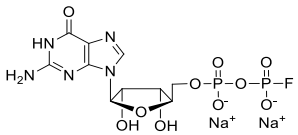
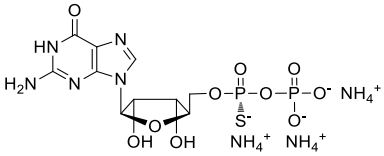
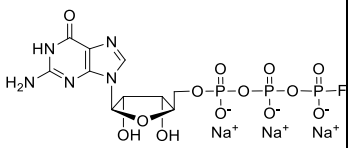
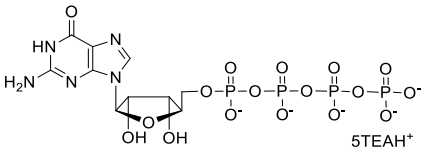
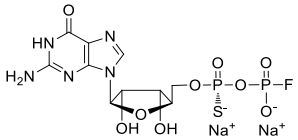
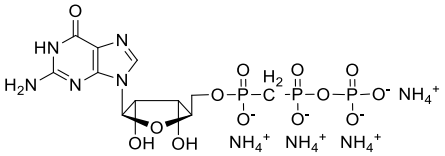
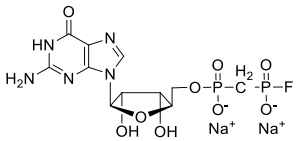
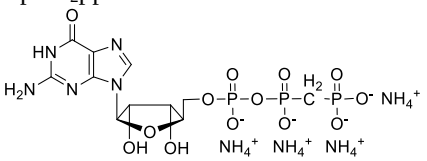
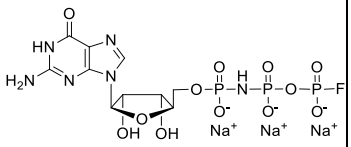
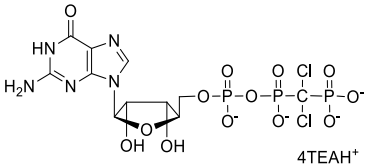
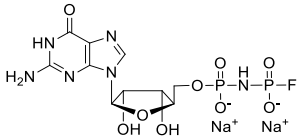
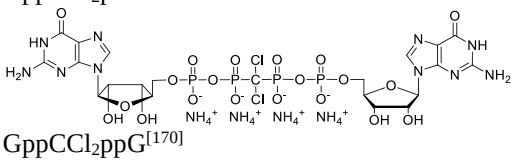
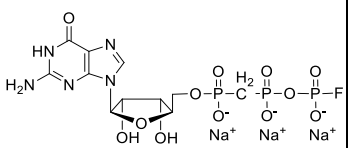
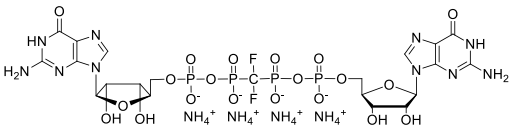
Związek	IC_{50} (µM)	IC_{50} lit. (µM)[155]
GTP	0,069 ± 0,006	0,260
GTP$_\gamma$S	0,115 ± 0,007	0,500
GDP	0,42 ± 0,12	0,77
ATP	b.d*	~ 10^6

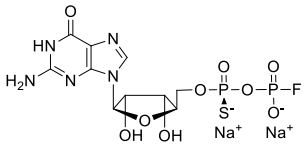
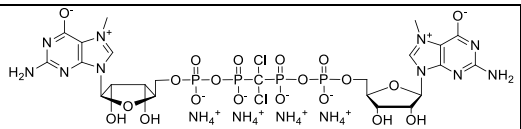
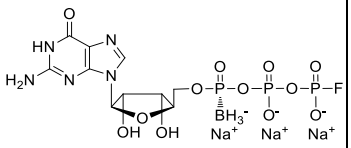
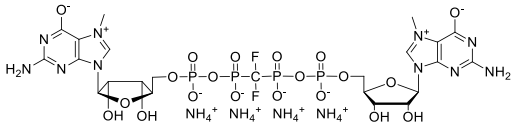
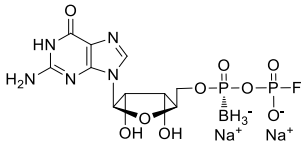
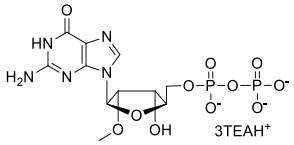
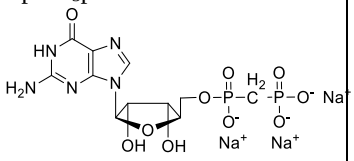
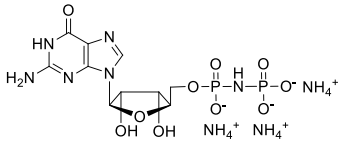
*wartość nie może być wyznaczona ze względu na zbyt słabe wiązanie z białkiem

W kolejnym etapie metodę zastosowano do scharakteryzowania biblioteki 24 ligandów o strukturze nukleotydowej. Wartości IC_{50} wyznaczono w analogiczny sposób, jak opisano

powyżej (Tabela IV. 28). Biblioteka zawierała zarówno mono-, jak i dinukleotydy G- lub m^7G-guanozynowe. Związki różniły się między sobą ilością grup fosforanowych oraz modyfikacjami chemicznymi. Przetestowano wpływ modyfikacji: fluorofosforanowej, α-tiofosforanowej, α-boranofosforanowej, α,β-metylenobisfosfonianowej, α,β-imidofosforanowej, β,γ-dichlorometylenowej i β,γ-difluorometylenowej na powinowactwo nukleotydu do białka TG2.

Tabela IV.28. Zestawienie wartości IC_{50} biblioteki nukleotydów wyznaczonych metodą polaryzacji fluorescencji. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SEM.

Struktura	IC_{50} (μM)	Struktura	IC_{50} (μM)
 GMPF[167]	Brak wiązania	 Gpsp D1[174]	0,440 ± 0,046
 GDPF[167]	4,30 ± 0,83	 Gpsp D2[174]	0,520 ± 0,065
 GTPF[167]	0,550 ± 0,083	 Gp$_4$[315]	0,190 ± 0,016
 GpspF D2[167]	12,0 ± 1,2	 GpCH$_2$pp[168]	0,300 ± 0,034
 GpCH$_2$pF[167]	14,7 ± 2,9	 GppCH$_2$p[170]	0,96 ± 0,15
 GpNHppF[167]	0,410 ± 0,085	 GppCCl$_2$p[170]	0,350 ± 0,041
 GpNHpF[167]	8,99 ± 0,76	 GppCCl$_2$ppG[170]	0,640 ± 0,083
 GpCH$_2$ppF[167]	1,56 ± 0,24	 GppCF$_2$ppG[170]	0,250 ± 0,019

 GpspF D1[167]	14,23 ± 0,73	 m^{7}GppCCl$_2$ppm^{7}G[a]	brak wiązania
 GpBH$_3$ppF D2[167]	1,90 ± 0,32	 m^{7}GppCF$_2$ppm^{7}G[a]	brak wiązania
 GpBH$_3$pF D2[167]	45,4 ± 9,0	 2'-*O*-MeGDP[315]	0,450 ± 0,032
 GpCH$_2$p[168]	3,91 ± 0,45	 GpNHp[169]	0,91 ± 0,24

[a] nieopublikowane

W oparciu o wyznaczone IC_{50} biblioteki nukleotydowej można określić następujące zależności struktura–aktywność SAR (ang. *Structure-Activity Relationship*):

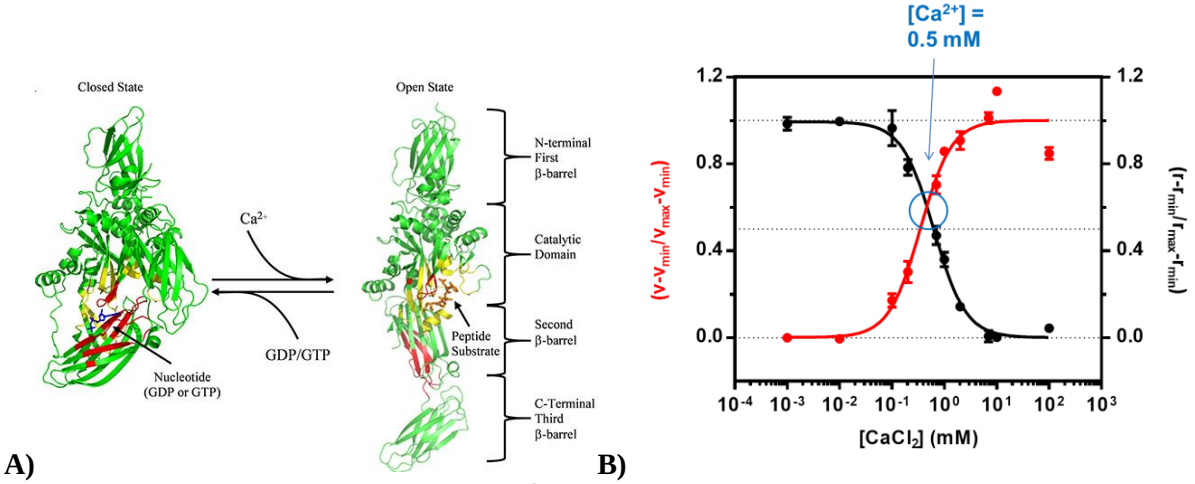
- Atom fluoru w terminalnej grupie fosforanowej niweluje jeden ładunek ujemny, co prowadzi do około 10-krotnego osłabienia wiązania (GDPF vs. GDP, GTPF vs. GTP, GpCH$_2$pF vs. GpCH$_2$p, GpNHpF vs. GpNHp, GpspF vs. Gpsp);
- Trifosforany nukleozydów wiążą się silniej niż difosforany – wartości IC_{50} rosną około 10-krotnie (GTP vs. GDP, GTPF vs. GDPF, GpCH$_2$ppF vs. GpCH$_2$pF, GpNHppF vs. GpNHpF, GpBH$_3$ppF D2 vs. GpBH$_3$pF D2, GpCH$_2$pp vs. GpCH$_2$pp);
- Modyfikacja α–β (np. P-O-P do P-CH$_2$-P) jest lepsza dla wiązania liganda z TG2 niż β–γ (GpCH$_2$pp vs. GppCH$_2$p);
- Modyfikacje chemiczne łańcucha fosforanowego wpływają na powinowactwo ligandów do białka. Można uszeregować je w następującej kolejności od najlepszych do najgorszych: –NH-(α–β) ~ -S (α) ~ -CF$_2$- (β–γ) dinukleotyd ~ brak modyfikacji > -CH$_2$-(α–β) ~ -CCl$_2$-(β–γ) > -CH$_2$-(β–γ) > ~ -BH$_3$ (α).

IV.8.5. Wyznaczanie IC_{50} inhibitorów allosterycznych miejsca wiążącego GTP białka TG2

TG2 jest białkiem wielofunkcyjnym o różnych aktywnościach, takich jak katalizowanie transamidacji peptydów i wiązanie GTP. Obydwie aktywności są zależne od stężenia jonów wapnia Ca^{2+} w roztworze. W wysokich stężeniach Ca^{2+} TG2 posiada konformację otwartą i wykazuje aktywność transamidacji, podczas gdy w niskich stężeniach Ca^{2+} TG2 zmienia konformację na zamkniętą, zdolną do wiązania GTP (Rys. IV. 115A).[145, 149]

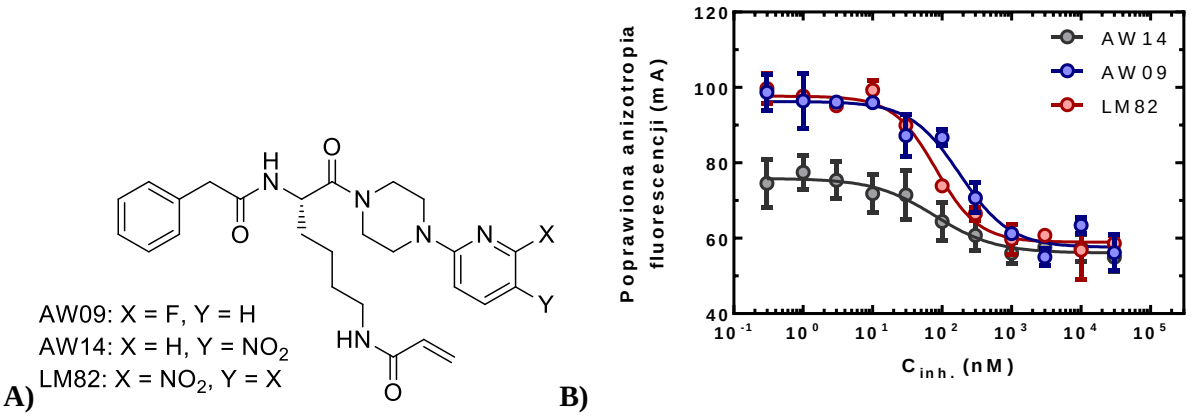
Naukowcy z grupy dr Pietscha opracowali metodę anizotropii fluorescencji, pozwalającą na monitorowanie aktywności transamidazy białka TG2 oraz jej zależność od stężenia jonów Ca^{2+}.[316] Korzystając z opracowanej metody badania wiązania G–nukleotydów do białka TG2,

opisanej w niniejszym rozdziale, zweryfikowano jak stężenie Ca^{2+} wpływa na tworzenie kompleksu nukleotyd–TG2. Na podstawie obydwu zależności wyznaczono stężenie jonów wapnia Ca^{2+} równe 0,5 mM, jako optymalne do obserwacji obydwu aktywności TG2 jednocześnie (Rys. IV. 115B).



Rys. IV. 115. A) Wpływ jonów wapnia Ca^{2+} oraz ligandów GDP/GTP na konformację białka TG2. Rysunek zaczerpnięto z pracy Katt et al. 2018.[317] **B)** Wpływ jonów wapnia Ca^{2+} na aktywność transamidazy (czerwony) i wiązania G-nukleotydów (wyznaczona przy pomocy sondy **D5-1**; czarny) białka TG2. Rysunek udostępniony dzięki uprzejmości dr C. Hausera i dr M. Pietscha.

Opracowaną metodę badania wiązania ligandów z TG2 wykorzystującą zmiany anizotropii fluorescencji sondy **D5-1** przypuszczalnie można stosować do badań inhibitorów miejsca aktywnego TG2, będących inhibitorami allosterycznymi miejsca wiążącego G-nukleotydy, w stężeniu Ca^{2+} 0,5 mM. Aby zweryfikować to założenie przeprowadzono eksperyment wyznaczania IC_{50} trzech nieodwracalnych inhibitorów miejsca aktywnego TG2: AW09, AW14 i LM82 (bufor pomiarowy 100 mM MOPS, 0,5 mM $CaCl_2$, 50 µM EDTA, pH 7,3). Związki zostały zsyntetyzowane przez dr Roberta Wodtke z Wydziału Chemii i Chemii Żywności, Politechniki w Dreznie (Rys. IV. 116A).[316] Wartości IC_{50} wyznaczono w zoptymalizowanych warunkach metody opartej na sondzie **D5-1** w stężeniu jonów wapnia Ca^{2+} równym 0,5 mM (Rys. IV. 116B; Tabela IV. 29).



Rys. IV. 116. A) Struktury nieodwracalnych inhibitorów miejsca aktywnego białka TG2, będących inhibitorami allosterycznymi w metodzie badania wiązania; **B)** Krzywe wiązania nieodwracalnych inhibitorów aktywności transamidazy białka TG2 wyznaczone z użyciem opracowanej metody fluorescencyjnej z sondą **D5-1** po 30 minutach inkubacji w temperaturze 30°C (wartości średnie ± SEM, n = 3).

Tabela IV.29. Zestawienie wartości IC_{50} wybranych nieodwracalnych inhibitorów aktywności transamidacji białka TG2. Przedstawione dane są średnimi wartościami z 3 niezależnych eksperymentów ± SEM.

Inhibitor	IC_{50} (nM)	Współczynnik Hilla *p*	IC_{50} lit. (μM)[a][316]
AW09[316]	179 ± 13	1,26 ± 0,29	6,28 ± 0,33
AW14[316]	80,1 ± 27,2	1,37 ± 0,10	2,45 ± 0,09
LM82[316]	81,4 ± 7,4	1,41 ± 0,02	2,26 ± 0,10

[a] wartości wyznaczone metodą monitorowania aktywnośći transamidazy białka TG.

Uzyskane wartości IC_{50} są zgodne z zależnością literaturową – inhibitory AW14 i LM82 są około 2,2–2,5 raza silniejsze niż AW09. Wynik ten potwierdza, iż opracowana metoda badania wiązania ligandów w miejscu wiążącym GTP białka TG2 może także z powodzeniem być stosowana w testach inhibitorów miejsca aktywnego białka.

IV.8.6. Podsumowanie

W ramach Serii D znakowanych fluorescencyjnie analogów nukleotydów zsyntetyzowano 12 analogów GDP, GTP i m^7GTP różniących się znacznikiem fluorescencyjnym, rodzajem *C*-fosfonianu użytego do syntezy, długością linkerów łączących znacznik fluorescencyjny z pierścieniem triazolowym oraz obecnością modyfikacji chemicznych łańcucha oligofosforanowego. Związek Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**) wytypowano jako najbardziej odpowiednią sondę do badań TG2 na podstawie niskiej wartości K_D 181 ± 10 nM i współczynnika wygaszania *Q* zbliżonego do 1 (1,46 ± 0,18). Walidacji metody dokonano poprzez wyznaczenie IC_{50} znanych ligandów TG2 – GDP, GTP, $GTP_\gamma S$ i ATP oraz wyznaczenie parametru z, który wynosił 0,64, 0,54 i 0,52 dla czasów inkubacji układu 0, 30 i 60 min. Widoczny jest spadek czułości metody wraz z czasem inkubacji. Wartość 0,52 dla 60 minut znajduje się na granicy zaliczenia metody do metod wysokoprzepustowych. Jednak potwierdzono, iż może być ona z powodzeniem stosowana do badań ligandów miejsca wiążącego GTP białka TG2 poprzez wyznaczenie IC_{50} biblioteki związków o strukturze nukleotydowej. Na podstawie uzyskanych wartości przeprowadzono analizę zależności powinowactwa liganda do miejsca wiążącego TG2 od jego struktury. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych prac nad strukturą ligandów o silnym powinowactwie do TG2.

W ostatnim etapie badań potwierdzono możliwość stosowania metody także do analizy inhibitorów miejsca aktywnego dodając dodatkowo do mieszaniny 0,5 mM jonów Ca^{2+} ($CaCl_2$). Scharakteryzowano trzy znane nieodwracalne inhibitory miejsca aktywnego AW09, AW14 i LM82,[316] będące równocześnie inhibitorami allosterycznymi miejsca wiążącego G–nukleotydy.

Tabela IV.30. Optymalne warunki stosowania metody fluorescencyjnej, przeznaczonej do wyznaczania stałych powinowactwa ligandów do białka TG2, w oparciu o zmiany anizotropii fluorescencji sondy nukleotydowej.

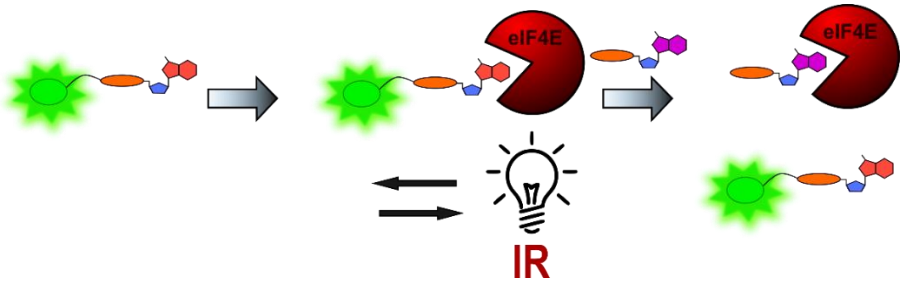
Skład próbki	Optymalne stężenie sondy (zwykle niższe niż jej K_D)	**D5-1** – 50 nM
	Optymalne stężenie białka (wysycające sygnał anizotropii fluorescencji sondy w 80%)	300 nM TG2
	Bufor	200 mM MOPS, 2% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,3
	DTT	1 mM

	DMSO	5%
Warunki pomiaru	Długość fali wzbudzania sondy	485/20 nm
	Długość fali emisji sondy	528/20 nm
	Temperatura	30°C
	Czas potrzebny do stabilizacji sygnału	60 min

IV.9. Znakowane nukleotydy w pomiarach MST

Wykorzystanie podejścia FLINT opiera się na prostych pomiarach, niewymagających skomplikowanego układu pomiarowego. Z poprzednich badań wynika, że spośród testowanych znaczników – pirenowych, BODIPY, fluorescein i cyjanin, jedynie piren może być zastosowany w tego typu pomiarach, gdyż na skutek oddziaływań z zasadami azotowymi wewnątrz znakowanego nukleotydu, intensywność jego emisji ulega zmianie. Jednak absorpcja i emisja pirenu znajduje się w zakresie bliskiego światła UV, co może prowadzić do pojawiania się interferencji fluorescencji pochodzącej od badanego liganda. Emisja pozostałych badanych znaczników nie ulegała zmianie wynikającej z wpływu nukleotydu, jednak ich zaletą jest emisja fluorescencji w świetle widzialnym. Tego typu znakowane nukleotydy nadal mogą zostać wykorzystane w badaniach oddziaływań z białkami z zastosowaniem innego niż FLINT rodzaju pomiarów – polaryzacji/anizotropii fluorescencji (FP/FA) lub mikroskalowej termoforezy (MST). Obydwie techniki wymagają zmiany masy w trakcie zachodzącego procesu. Z tego względu małocząsteczkowe, fluorescencyjne sondy molekularne nie mogą być zastosowane do monitorowania ich hydrolizy enzymatycznej z użyciem FP i MST ze względu na zbyt małą zmianę rozmiaru molekuły. Możliwe jest jednak stosowanie obydwu technik w metodach badania tworzenia kompleksów białko–ligand.

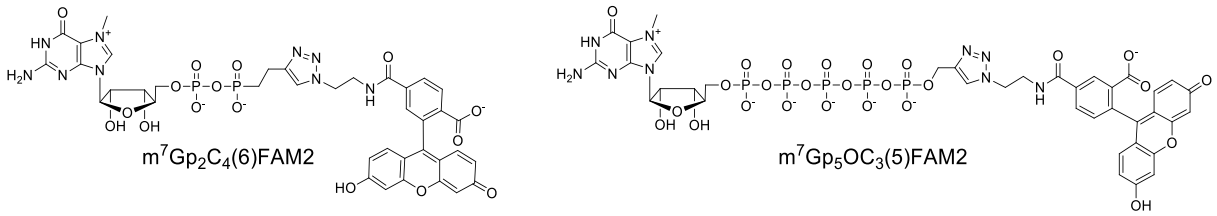
W ramach pracy doktorskiej otrzymano wiele analogów nukleotydów znakowanych fluorescencyjnie innymi niż piren znacznikami. Niektóre z nich znalazły już zastosowanie w badaniach wiązania ligandów do białka eIF4E metodą MST.[318] Zmiana sygnału fluorescencji w tym przypadku wynika z różnicy migracji wolnej sondy i w kompleksie z białkiem eIF4E na skutek pojawiającego się źródła ciepła. (lampa IR; Rys. IV. 117).



Rys. IV. 117. Schemat działania metody MST do badań powinowactwa ligandów do białka eIF4E.

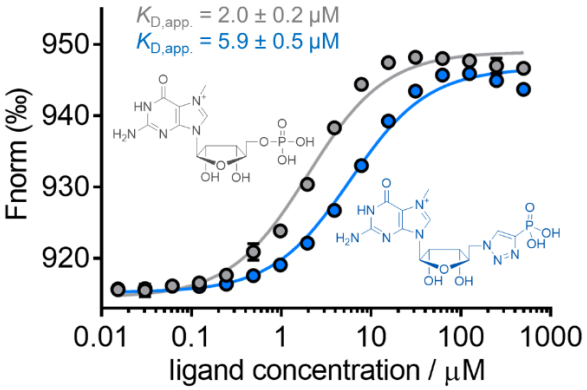
Przykładem otrzymanego przez Autorkę niniejszej pracy związku fluorescencyjnego wykorzystanego do badań ligandów eIF4E, jest difosforan znakowany (6)-karboksyfluoresceiną poprzez terminalną resztę *C*-fosfonianową ($m^7Gp_2C_4$(6)FAM2; Rys. IV. 118). Zgodnie z wiedzą

literaturową im mniejsza liczba grup fosforanowych, tym niższe powinowactwo analogu kapu do eIF4E.[115] Sonda o słabym powinowactwie jest użyteczna w badaniach mających na celu zróżnicowanie powinowactwa słabych ligandów danego białka.



Rys. IV. 118. Struktury mononukleotydowych analogów kapu znakowanych izomerem 6 lub 5 karboksyfluoresceiny, przeznaczonych do badań MST.

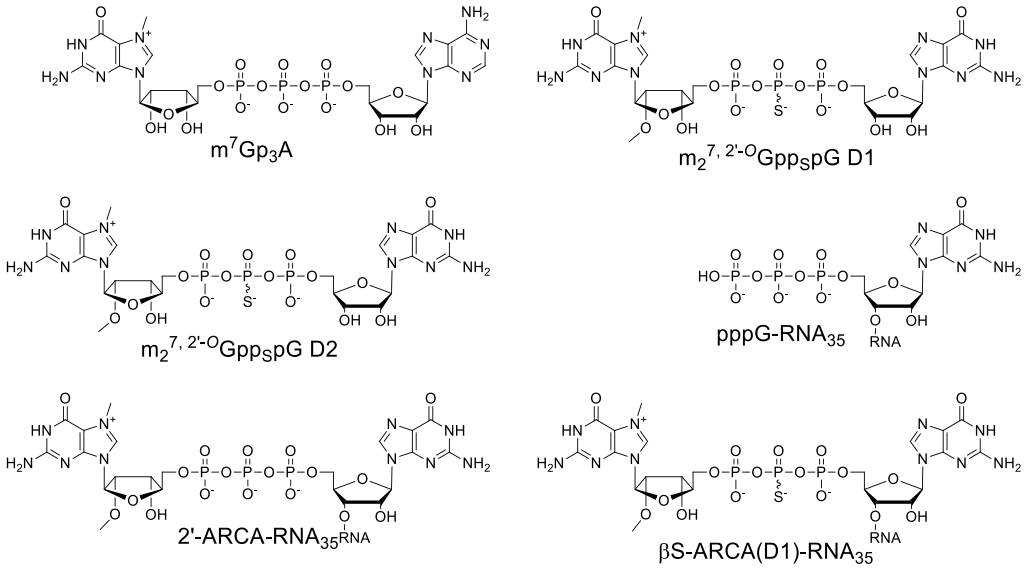
Związek $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2 wykorzystano do badań powinowactwa analogu m^7GMP, zawierającego modyfikację pierścieniem triazolowym w pozycji 5' rybozy (m^7G-t-p), do białka eIF4E. Związki do badań zsyntetyzował i scharakteryzował mgr Mateusz Kozarski w Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT i Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego). Eksperyment przeprowadzono w warunkach 25 nM sondy $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2, 1 µM eIF4E, ligand w stężeniach od 15,2 nM do 500 µM w buforze 50 mM HEPES–KOH, pH 7,2, zawierającym 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 0,05% Tween-20, w temperaturze 25°C. W celu wyznaczenia pozornych stałych dysocjacji (ang. *apparent dissociation constant*, $K_{D,app.}$) do otrzymanych zależności sygnału MST od stężenia liganda dopasowano czteroparametrową krzywą ((5); Rys. IV. 119). Pomiary przeprowadzono razem z dr Dorotą Kubacką w Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT i Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego). Obliczone wartości $K_{D,app.}$ Wynosiły 2,0 ± 0,2 µM dla m^7GMP i 5,9 ± 0,5 µM dla m^7G-t-p. Wynik ten oznacza, że modyfikacja pierścieniem triazolowym w pozycji 5' rybozy powoduje spadek powinowactwa związku do białka eIF4E. Sondę $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2 można zatem z powodzeniem stosować do rozróżniania słabych ligandów białka eIF4E metodą MST.[318]



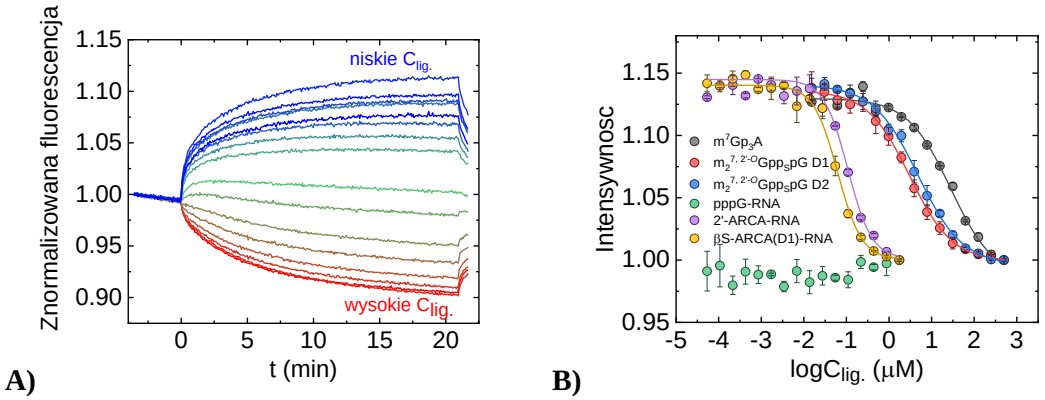
Rys. IV. 119. Krzywe wiązania kompetycyjnego słabych ligandów białka eIF4E – m^7GMP i m^7G-t-p, wyznaczone metodą MST z użyciem sondy difosforanowej $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kozarski, Kubacka et al. 2017. [318]

Kolejnym przykładem związku fluorescencyjnego otrzymanego w ramach niniejszej pracy doktroskiej, zastosowanego w badaniach MST jest mononukleotydowy, pentafosforanowy analog kapu znakowany izomerem 5 karboksyfluoresceiny poprzez terminalną resztę fosforanową ($m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2; Rys. IV. 118). Sondę zaprojektowano w celu wyznaczenia stałych powinowactwa kompleksów krótkich kapowanych RNA (35 nukleotydów) z białkiem eIF4E. Ligandy te silnie wiążą się z białkiem eIF4E, wobec czego do ich charakterystyki wymagana jest sonda o wysokim powinowactwie. Niewątpliwą zaletą podejścia MST w tym przypadku jest mała ilość próbki wymagana do pomiaru, co jest niezwykle istotne w badaniach RNA. Sondę $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2 zastosowano do scharakteryzowania kompleksów dinukleotydów i krótkich kapowanych RNA modyfikowanych atomem siarki z eIF4E (Rys. IV. 120). Dinukleotydy wykorzystane w badaniach zsyntetyzował i scharakteryzował dr Marcin

Warmiński w Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT i Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego). Krótkie RNA otrzymał dr inż. Paweł Sikorski w Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT Uniwersytetu Warszawskiego). Eksperyment wykonano z wykorzystaniem 10 nM sondy $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2, 50 nM eIF4E oraz ligandów w stężeniach od 15,2 nM do 500 µM (dinukleotydy) lub od 0,05 nM do 1,75 µM (RNA) w 50 mM HEPES–KOH pH 7,2, zawierającym 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA i 0,05% Tween-20 w temperaturze 25°C. Do otrzymanej zależności sygnału MST od stężenia liganda dopasowano czteroparametrową krzywą (5) w celu wyznaczenia pozornych stałych dysocjacji badanych związków (Rys. IV. 121). Uzyskane wartości $K_{D,app.}$ zaprezentowano w Tabeli IV. 31 oraz na Rys. IV. 122.



Rys. IV. 120. Struktury ligandów eIF4E badanych metodą MST z użyciem sondy pentafosforanowej $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2.

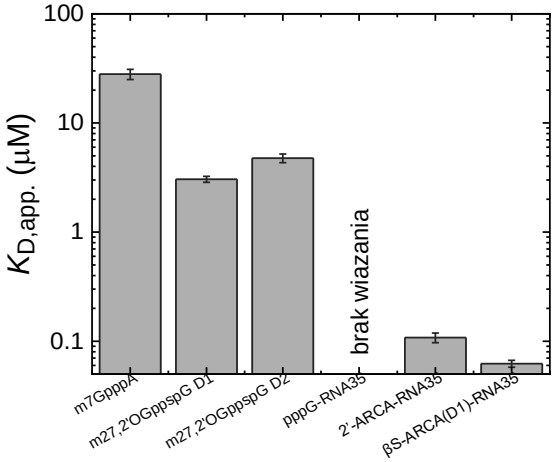


Rys. IV. 121. A) Przykładowy przebieg eksperymentu MST kompetycyjnego wiązania liganda $m_2^{7,2'-O}GppSpG$ D1; **B)** Krzywe wiązania kompetycyjnego dinukleotydów oraz krótkich (35 nukleotydów) RNA do białka eIF4E, wyznaczone metodą MST z użyciem sondy pentafosforanowej $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2.

Tabela IV.31. Zestawienie pozornych stałych dysocjacji $K_{D,app.}$ wbranych ligandów eIF4E, wyznaczonych metodą MST z użyciem sondy pentafosforanowej $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2.

Związek	**$K_{D,\ app.}$ (µM)**
m^7Gp_3A	28,0 ± 3,0
$m_2^{7,\ 2'-O}GppSpG$ D1	3,05 ± 0,19
$m_2^{7,\ 2'-O}GppSpG$ D2	4,76 ± 0,43

pppG–RNA_{35}	brak wiązania
2'-ARCA–RNA_{35}	0,108 ± 0,011
βS-ARCA(D1)–RNA_{35}	0,0623 ± 0,0045



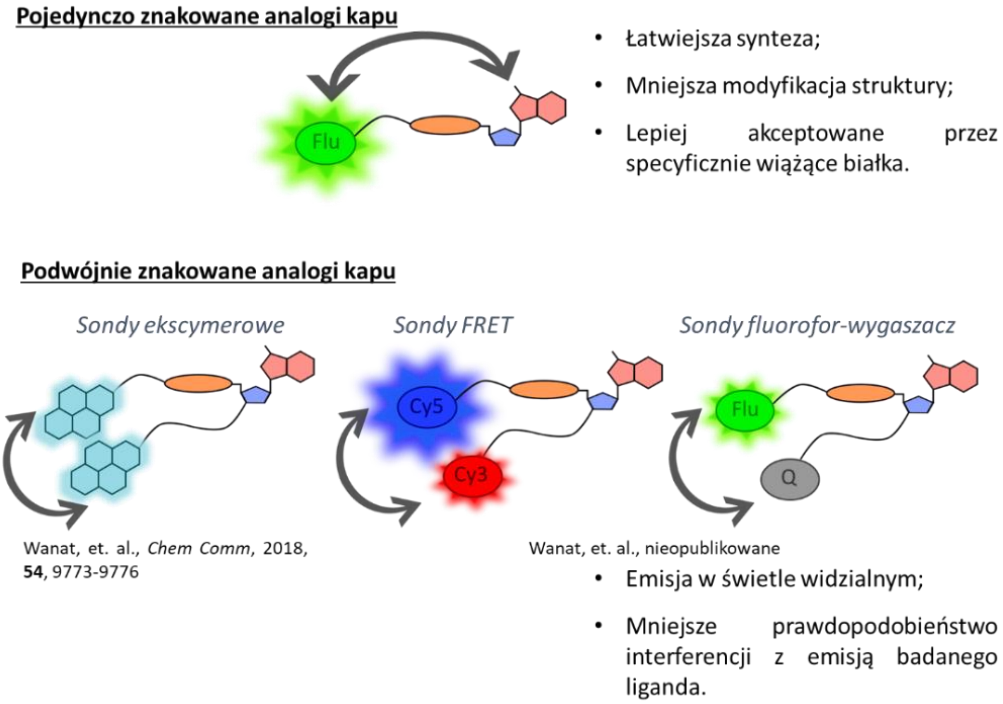
Rys. IV. 122. Graficzne przedstawienie wyznaczonych pozornych stałych dysocjacji serii dinukleotydów i krótkich kapowanych RNA z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2 i pomiarów MST.

Nukleotydy modyfikowane siarką w pozycji β łańcucha fosforanowego mają wyższe powinowactwo do białka eIF4E. Kontrola pppG–RNA_{35} zgodnie z oczekiwaniami nie tworzyła kompleksu z eIF4E Wartości $K_{D,app.}$ 35–nukleotydowych mRNA są ok. 50 razy niższe niż dinukleotydów (3,05 μM dla $m_2^{7,2'-O}GppspG$ D1 i 0,062 nM dla βS-ARCA–RNA_{35}). Pomimo tak silnego wiązania otrzymana sonda fluorescencyjna $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2 może być z powodzeniem stosowana do badań powinowactwa krótkich mRNA do białka eIF4E. Opis opracowania i zastosowania metody MST wykorzystującej sondę $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2 zaprezentowano w zaakceptowanej pracy „*Structural insights into the interaction of clinically relevant phosphorothioate mRNA cap analogs with translation initiation factor 4E reveal stabilization via electrostatic thio-effect*".

IV.10. Podwójnie znakowane analogi nukleotydów

Piren, jako znacznik fluorescencyjny posiada wiele możliwości tworzenia nukleotydowych sond molekularnych, gdyż jego właściwości fluorescencyjne zależą od obecności zasady azotowej. Wadą stosowania pirenu jest jego emisja w bliskim UV, w zakresie gdzie mogą pojawiać się interferencje emisji własnej charakteryzowanych molekuł organicznych. W poprzednim rozdziale zaprezentowano jedno z rozwiązań pozwalających w dużej mierze wyeliminować problem interferencji poprzez stosowanie znaczników fluorescencyjnych emitujących w świetle widzialnym. Sondy tego typu mogą być wykorzystane w pomiarach polaryzacji fluorescencji oraz mikroskalowej termoforezy. Jednak techniki te wymagają wyspecjalizowanego sprzętu i nie można ich stosować we wszystkich przypadkach, m. in. do monitorowania degradacji małocząsteczkowej sondy fluorescencyjnej (zbyt mała zmiana masy). W niniejszym rozdziale przedstawiono kolejne rozwiązanie, umożliwiające stosowanie detekcji FLINT, wykorzystujące zmiany fluorescencji wynikające z oddziaływań pomiędzy dwoma znacznikami, znajdującymi się w obrębie jednej molekuły. Przykładem takich

oddziaływań jest tworzenie ekscymeru (m. in. przez dwie molekuły pirenu), pary FRET lub wygaszanie fluorescencji fluorofora w obecności wygaszacza (Rys. IV. 123).

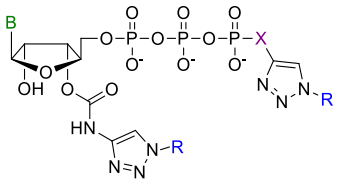


Rys. IV. 123. Porównanie mononukleotydowych sond fluorescencyjnych mono- i dwuznakowanych.

IV.10.1. Sondy ekscymerowe

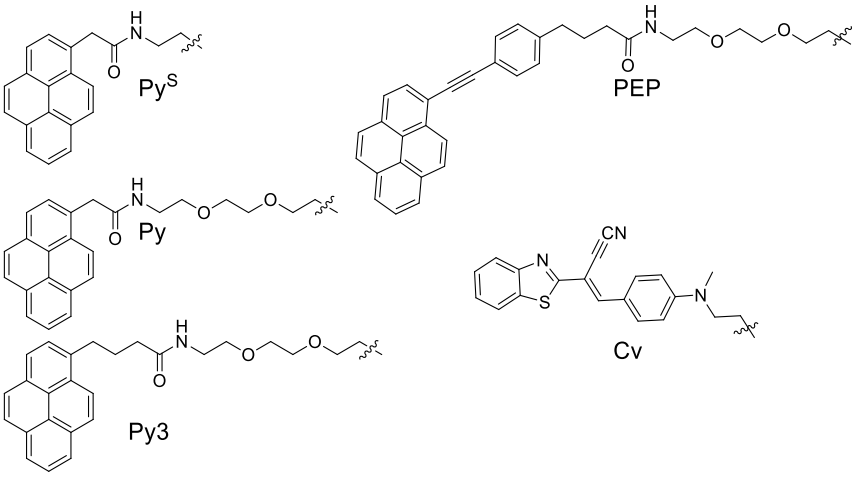
W ramach projektu doktorskiego Autorka pracy wykonała charakterystykę spektroskopową i enzymatyczną serii analogów ATP i m^7GTP podwójnie znakowanych poprzez pozycję 3'-*O* adenozyny lub 2'-*O*/3'-*O* 7-metyloguanozyny (odpowiednio izomery I1 i I2; Rys. IV. 124). Związki różniły się między sobą znacznikiem fluorescencyjnym, rodzajem fosfonianu (etynylo-*C*-fosfonian, 2-propargilo-*C*-fosfonian i 2-propargilofosforan) oraz różną długością linkera łączącego znacznik z pierścieniem triazolowym. Podwójnie znakowane analogi ATP zsyntetyzował i scharakteryzował mgr Przemysław Wanat, a m^7GTP mgr Michał Kopciał w Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT i Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego).

Podstawowym znacznikiem fluorescencyjnym wykorzystanym w badaniach był piren, który znany jest ze zdolności do tworzenia kompleksów ekscymerowych i emisji w postaci szerokiego pasma o maksimum ~500 nm. Przetestowano także pochodną pirenu – fenyloetynylopiren (PEP),[224, 319] posiadającą przesunięte batochromowo maksima absorpcji i emisji oraz barwnik cyjanowinylenowy (Cv),[228] którego ekscymery zostały odnotowane w literaturze. Właściwości spektroskopowe związków scharakteryzowano w stężeniach 1 lub 4 µM, w buforze, w którym ich emisja była stabilna w czasie. W przypadku Py i PEP był to bufor 50 mM Tris–HCl pH 8,0, natomiast analogi Cv wykazywały największą stabilność w buforze 50 mM MES/KOH pH 6,0. W ramach kontroli zmierzono także widma pojedynczo znakowanych analogów ATP (Rys. IV. 125).

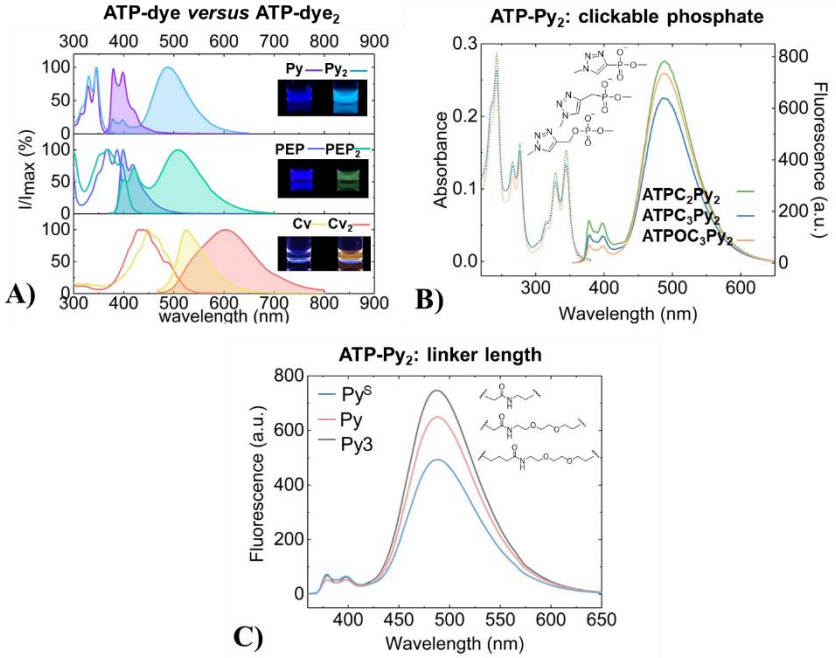


$ATPC_2(Py)_2$: B = A, X = brak; R = Py
$ATPC_2(Cv)_2$: B = A, X = brak; R = Cv
$ATPC_3(Py)_2$: B = A, X = CH_2; R = Py
$ATPC_3(PEP)_2$: B = A, X = CH_2; R = PEP
$ATPC_3(Cv)_2$: B = A, X = CH_2; R = Cv
$ATPOC_3(Py)_2$: B = A, X = O-CH_2; R = Py
$ATPOC_3(Py^S)_2$: B = A, X = O-CH_2; R = Py^S
$ATPOC_3(Py3)_2$: B = A, X = O-CH_2; R = Py3
$ATPOC_3(PEP)_2$: B = A, X = O-CH_2; R = PEP

$m^7GTPC_2(Py)_2$ I1: B = m^7G, X = brak; R = Py
$m^7GTPC_2(Py)_2$ I2: B = m^7G, X = brak; R = Py
$m^7GTPC_3(Py)_2$ I1: B = m^7G, X = CH_2; R = Py
$m^7GTPC_3(Py)_2$ I2: B = m^7G, X = CH_2; R = Py
$m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1: B = m^7G, X = O-CH_2; R = Py
$m^7GTPOC_3(Py)_2$ I2: B = m^7G, X = O-CH_2; R = Py
$m^7GTPOC_3(Py3)_2$ I1: B = m^7G, X = O-CH_2; R = Py3
$m^7GTPOC_3(PEP)_2$ B = m^7G, X = O-CH_2; R = PEP



Rys. IV. 124. Struktury analogów ATP i m^7GTP podwójnie znakowanych znacznikami zdolnymi do formowania ekscymerów.[294]

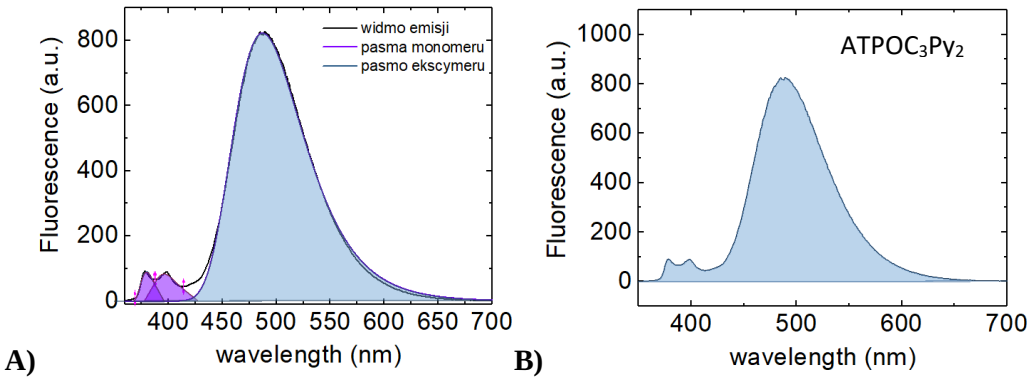


Rys. IV. 125. Porównanie właściwości spektroskopowych dwuznakowanych fluorescencyjnie analogów ATP, różniących się: **A)** znacznikiem fluorescencyjnym (widmo emisji – zacieniowane, widmo wzbudzania – kontur), **B)** rodzajem *C*-fosfonianu/fosforanu użytego do reakcji CuAAC lub **C)** długością linkera łączącego piren z pierścieniem triazolowym. Rysunek zaczerpnięto z pracy Wanat et al. 2018.[294]

Analiza widm emisji fluorescencji wykazała, że:

- Widma emisji dwuznakowanych analogów ATP różniły się kształtem i położeniem maksimów od pojedynczo znakowanych próbek kontrolnych;
- W przypadku pirenu widma wzbudzania w maksimum emisji (pasmo ekscymeru dla dwuznakowanej sondy i monomeru dla monoznakowanej) miały taki sam kształt, co potwierdza, że molekuły pirenu tworzą ekscymer w obrębie jednej cząsteczki ATP;
- Widma wzbudzania w maksimum emisji znaczników PEP oraz Cv różniły się między sobą, co oznacza, że wpływ na fluorescencję mają także oddziaływania w stanie podstawowym;
- Widma wzbudzania i emisji analogów ATP znakowanych pirenem, różniących się *C*-fosfonianem/fosforanem użytym w reakcji CuAAC były do siebie zbliżone. Rodzaj alkinowej pochodnej ATP nie ma, więc znacznego wpływu na właściwości fluorescencyjne po znakowaniu;
- Porównanie długości linkera, którym modyfikowana była molekuła pirenu wykazało, iż ma on wpływ na intensywność emisji związku. Im dłuższy linker tym wyższa fluorescencja sondy, a równocześnie czułość układu.

Kolejnym etapem charakterystyki sond fluorescencyjnych było wyznaczenie wartości ich wydajności kwantowych. W tym celu wykorzystano podejście porównania do wzorca, którym w przypadku Py i PEP był roztwór siarczanu chininy (QS) w 0,1 M H_2SO_4. Dla nukleotydów znakowanych Cv zastosowano wzorzec roztworu fluoresceiny w 0,1 M NaOH. Do obliczenia wartości QY niezbędne jest obliczenie pola powierzchni pod zarejestrowanym widmem emisji. Nukleotydy dwuznakowane pirenem posiadają dwa maksima emisji monomerowej oraz duże, szerokie pamo emisji ekscymerowej. Obliczenia pola powierzchni wykonano na dwa sposoby. W pierwszym podejściu do widma emisji dopasowano krzywe w kształcie piku (np. Gaussa, Lorentza) oraz obliczono pole powierzchni pod każdą z dopasowanych krzywych. Pole powierzchni monomeru obliczono, jako sumę pól pod powierzchnią dwóch dopasowanych funkcji w ~400 nm ($QY_{mon.}$), natomiast ekscymeru, jako pole powierzchni pod dopasowaną krzywą z maksimum ~500 nm ($QY_{eksc.}$; Rys. IV. 126A). Drugie podejście polegało na obliczeniu pola powierzchni całego widma ($QY_{całk.}$), do czego wykorzystano oprogramowanie Origin® 2019b (Rys. IV. 126B). Na przykładzie związku $ATPOC_3(Py)_2$ całkowite QY wynosiło 25,7 ± 0,7% ($QY_{całk.}$), QY monomeru 0,99 ± 0,03% ($QY_{mon.}$), a ekscymeru 25,1 ± 0,7% ($QY_{exc.}$). W analogiczny sposób wyznaczono QY analogów znakowanych PEP, natomiast QY analogów znakowanych Cv wyznaczono obliczając pole powierzchni pod całym widmem. Charakterystyka spektroskopowa badanych związków została podsumowana w Tabeli IV. 32.



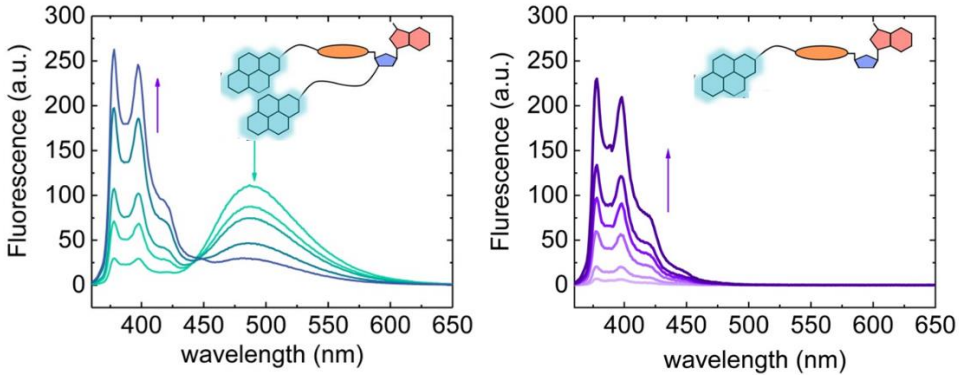
Rys. IV. 126. Porównanie sposobu obliczania powierzchni pod widmem emisji sondy $ATPOC_3Py_2$.

Tabela IV.32. Porównanie właściwości spektroskopowych dwuznakowanych analogów ATP i m^7GTP – maksima absorpcji, emisji monomerowej i ekscymerowej oraz wydajności kwantowe QY. Związki znakowane Py i PEP badano w buforze 50 mM Tris–HCl pH 8,0, a znakowane Cv w buforze 50 mM MES/KOH pH 6,0.

Skrót	Maksima absorpcji (nm)	λ_{max} (mon.) (nm)	λ_{max} (eksc.) (nm)	$QY_{całk.}$ (%)	$QY_{mon.}$ (%)	$QY_{eks.}$ (%)	$QY_{eksc.}/QY_{mon}$	$I_{eksc.}/I_{mon.}$
$ATPC_2(Py)_2$	329, 345	378, 398	488	23,0 ± 0,6	0,42 ± 0,01	22,6 ± 0,6	53,4	4,8
$ATPC_2(Cv)_2$	434	b.d.	607	0,89 ± 0,11	b.d.	b.d.	b.d.	1,7
$ATPC_3(Py)_2$	329, 345	379, 398	488	21,5 ± 0,6	1,04 ± 0,03	20,6 ± 0,6	19,7	4,5
$ATPC_3(PEP)_2$	368, 394	399, 420	508	25,5 ± 1,5	0,54 ± 0,03	25,2 ± 1,5	46,5	17,1
$ATPC_3(Cv)_2$	437	b.d.	602	0,32 ± 0,04	b.d.	b.d.	b.d.	2,6
$ATPOC_3(Py)_2$	329, 345	378, 398	489	25,7 ± 0,7	0,99 ± 0,03	25,1 ± 0,7	23,3	11,7
$ATPOC_3(Py^S)_2$	328, 345	378, 397	490	19,9 ± 0,2	1,27 ± 0,04	18,3 ± 0,5	14,3	7,0
$ATPOC_3(Py3)_2$	328, 344	378, 398	498	30,4 ± 0,8	1,18 ± 0,03	29,4 ± 0,8	24,8	9,4
$ATPOC_3(PEP)_2$	368, 394	399, 419	508	19,1 ± 1,2	0,70 ± 0,04	18,6 ± 1,1	26,6	21,5
$m^7GTPC_2(Py)_2$ I1	329, 345	380, 397	488	7,2 ± 0,1	0,94 ± 0,03	6,6 ± 0,2	7,1	2,5
$m^7GTPC_2(Py)_2$ I2	329, 345	379, 396	489	7,1 ± 0,2	0,74 ± 0,02	6,6 ± 0,2	8,9	2,7
$m^7GTPC_3(Py)_2$ I1	329, 345	380, 396	490	8,8 ± 0,3	1,77 ± 0,05	7,3 ± 0,2	4,1	2,5
$m^7GTPC_3(Py)_2$ I2	329, 345	379, 396	489	7,8 ± 0,2	1,52 ± 0,04	6,4 ± 0,2	4,2	4,0
$m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1	330, 345	380, 397	488	5,7 ± 0,0	0,86 ± 0,02	5,0 ± 0,1	5,8	3,3
$m^7GTPOC_3(Py)_2$ I2	329, 345	380, 397	488	8,9 ± 0,1	0,94 ± 0,03	8,1 ± 0,2	8,6	4,0
$m^7GTPOC_3(Py3)_2$ I1	329, 345	380, 397	486	8,3 ± 0,3	0,99 ± 0,03	7,5 ± 0,2	7,6	2,6
$m^7GTPOC_3(PEP)_2$ I1	368, 394	400, 419	507	24,0 ± 1,5	0,13 ± 0,01	24,1 ± 1,5	186,2	11,1

W kolejnym etapie badań podwójnie znakowane analogi ATP i m^7GTP poddano reakcji hydrolizy enzymatycznej katalizowanej przez fosfodiesterazę PDE-I. Dodatkowo analogi m^7GTP przetestowano, jako sondy molekularne do monitorowania aktywności enzymu degradacji kapu DcpS. W trakcie degradacji nukleotydu podwójnie znakowanego Py lub PEP obserwowano spadek intensywności emisji ekscymerowej i wzrost emisji monomerowej w czasie (Rys. IV. 127). Warto zauważyć, że przyrost fluorescencji monomerowej jest wyższy w porównaniu do spadku ekscymerowej, co wynika także z zaniku oddziaływań wygaszających piren–zasada azotowa. W przypadku związków pojedynczo znakowanych degradację sondy

można monitorować jedynie poprzez pasmo monomerowe, którego intensywność rośnie w trakcie procesu na skutek zaniku oddziaływań wygaszających pomiędzy znacznikiem, a zasadą azotową (Rys. IV. 127).



Rys. IV. 127. Przebieg degradacji enzymatycznej sondy podwójnie i pojedynczo znakowanej pirenem, monitorowanej poprzez rejestrację widm emisji (λ_{exc} = 345 nm).

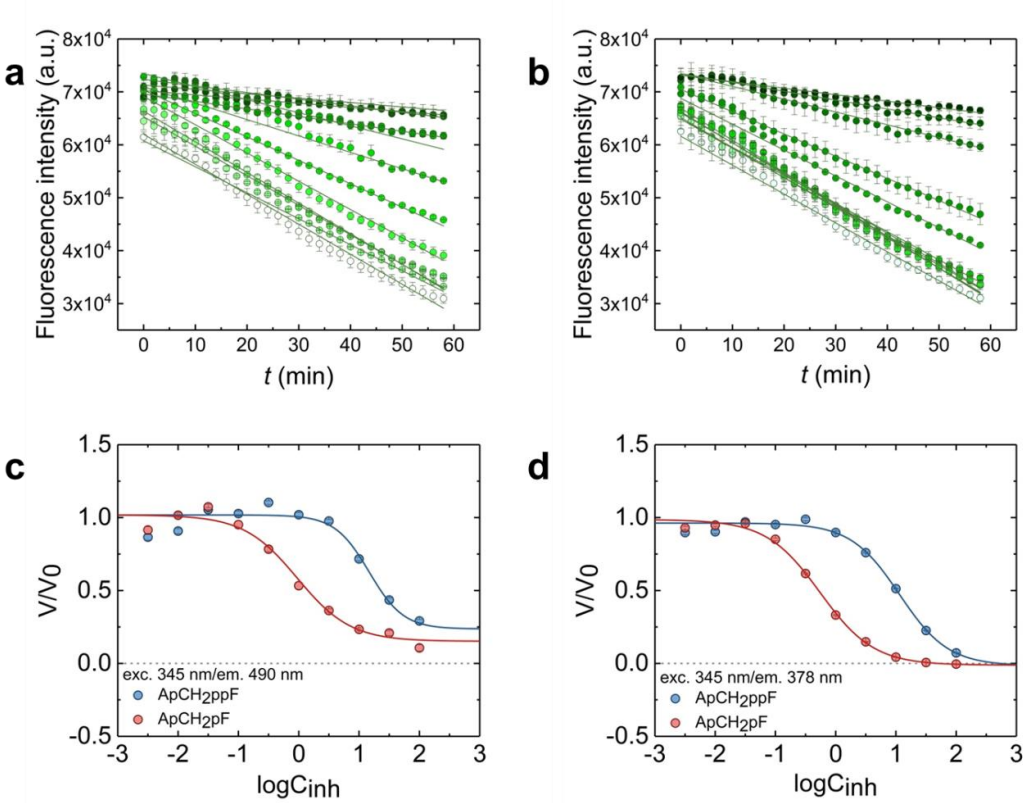
Nukleotydy zawierające znacznik cyjanowinylenowy okazały się być niestabilne w pH optymalnym do działania enzymu PDE-I (pH 8,0). Ich fluorescencja jest stabilna w niskim pH < 6,0. Zatem związki tego typu mogą być stosowane do badań białek wiążących A–nukleotydy, posiadających aktywność w niskim pH.

Dla każdego z badanych związków obliczono wartość czasu półtrwania $t_{1/2}$, odpowiadającego czasowi trwania reakcji, w którym rejestrowany sygnał równy jest połowie maksymalnej zmiany fluorescencji (Tabela IV. 33). Spośród modyfikowanych ATP analog $ATPOC_3(Py)_2$ wybrano do badań inhibicji enzymu PDE-I, natomiast związek $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1 do charakterystyki inhibitorów enzymu DcpS. Zaobserwowano, że izomer I1 2'-*O*-m^7GTP jest znacznie lepszym substratem enzymu DcpS w porównaniu do izomeru I2 (3'-*O*). Czas półtrwania izomerów I1 był od 3 do 13 razy krótszy niż izomerów I2. W przypadku PDE-I różnica ta była nieco mniejsza i wynosiła od 1 do 2,5. Z tego względu m^7GTP znakowane PEP i Py3 otrzymane zostały tylko z użyciem izomeru I1.

Tabela IV.33. Charakterystyka enzymatyczna sond ekscymerowych w postaci czasów półtrwania sondy w obecności pirofosfatazy PDE-I lub DcpS.

Związek	$t_{1/2}$ (min) hydroliza PDE-I	$t_{1/2}$ (h) hydroliza DcpS
$ATPC_2(Py)_2$	19,7	b.d.
$ATPC_3(Py)_2$	21,9	b.d.
$ATPC_3(PEP)_2$	3,9	b.d.
$ATPOC_3(Py)_2$	9,3	b.d.
$ATPOC_3(Py^S)_2$	10,2	b.d.
$ATPOC_3(Py3)_2$	9,3	b.d.
$ATPOC_3(PEP)_2$	6,1	b.d.
$m^7GTPC_2(Py)_2$ I1	38,4	7,3
$m^7GTPC_2(Py)_2$ I2	63,9	23,4
$m^7GTPC_3(Py)_2$ I1	30,4	3,2
$m^7GTPC_3(Py)_2$ I2	79,8	42,0
$m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1	62,7	1,2
$m^7GTPOC_3(Py)_2$ I2	67,0	8,0
$m^7GTPOC_3(Py3)_2$ I1	35,2	0,3
$m^7GTPOC_3(PEP)_2$ I1	3,6	b.d.

Sondę $ATPOC_3(Py)_2$ zastosowano do wyznaczenia IC_{50} dwóch znanych inhibitorów enzymu PDE-I: $ApCH_2pF$ i $ApCH_2ppF$ (Rys. IV. 128A–B)[122] Wartości IC_{50} obliczono korzystając z detekcji przy pomocy emisji ekscymerowej (Rys. IV 128C) oraz monomerowej (Rys. IV. 128D). Uzyskane IC_{50} dwóch inhibitorów zaprezentowano w Tabeli IV. 34. $ApCH_2pF$ jest silniejszym inhibitorem enzymu PDE-I, co jest zgodne z przesłankami literaturowymi.[122]

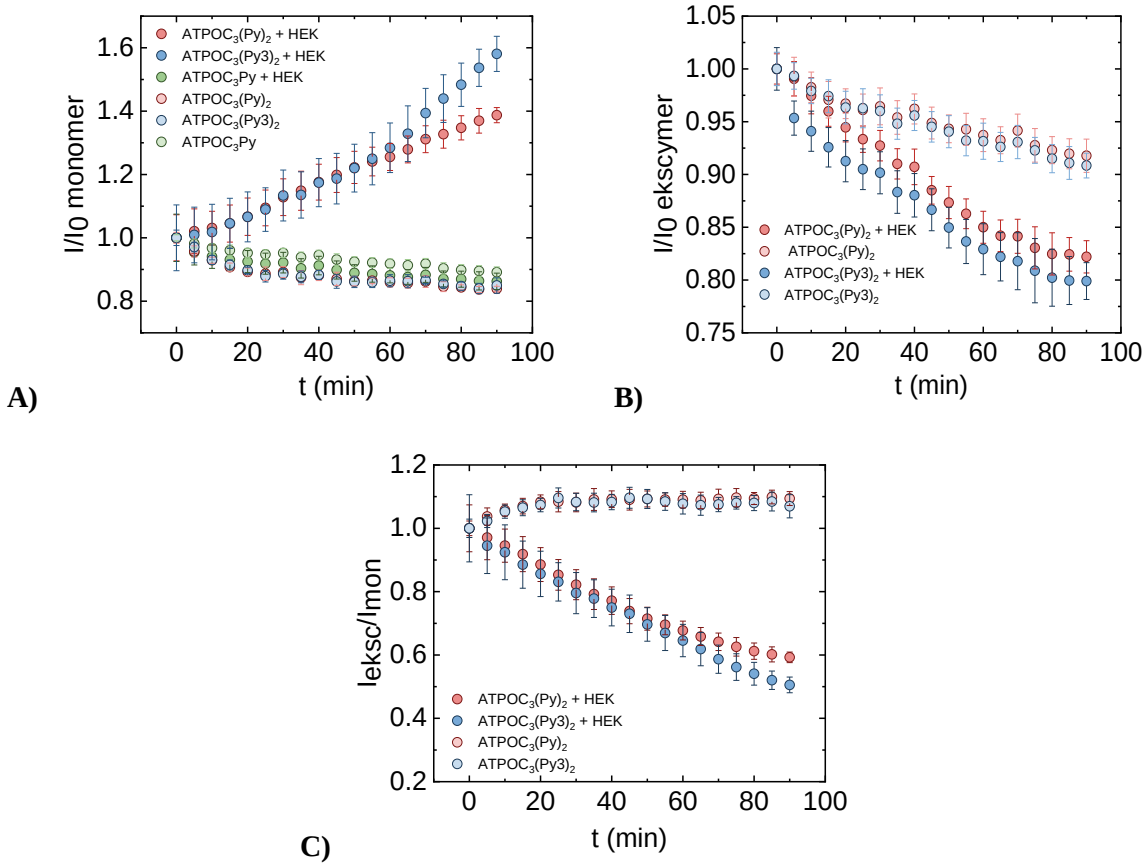


Rys. IV. 128. Inhibicja PDE-I (30 ng/ml) przez dwa wybrane inhibitory: **A)** $ApCH_2pF$ i **B)** $ApCH_2ppF$, badana w obecności 1,5 µM sondy $ATPOC_3(Py)_2$, monitorowana poprzez pomiar emisji ekscymerowej. Eksperyment wykonano na czytniku płytek z detekcją emisji: **C)** monomeru (λ_{exc} = 345 nm, λ_{em} = 378 nm) lub **D)** ekscymeru (λ_{exc} = 345 nm, λ_{em} = 490 nm) w buforze 50 mM Tris–HCl pH 8,0, zawierającym 5 mM $MgCl_2$ w 30°C. Przedstawione dane to wartości średnie z trzech niezależnych eksperymentów ± SD. Rysunek zaczerpnięto z pracy Wanat et al. 2018.[294]

Tabela IV.34. Zestawienie wartości IC_{50} oraz współczynników Hilla *p* obliczonych na podstawie zmian intensywności fluorescencji monomerowej lub ekscymerowej sondy $ATPOC_3(Py)_2$ w obecności enzymu PDE-I. Przedstawione dane to średnie wartości z trzech niezależnych eksperymentów ± SD.

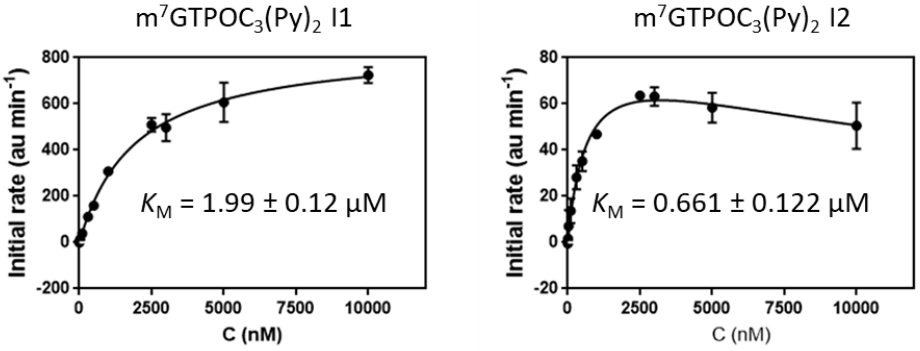
Inhibitor	**IC_{50} (µM) emisja monomeru (378 nm)**	***p* (monomer)**	**IC_{50} (µM) emisja ekscymeru (490 nm)**	***p* (ekscymer)**
$ApCH_2pF$	0,549 ± 0,029	-0,97 ± 0,02	0,95 ± 0,19	-0,98 ± 0,15
$ApCH_2ppF$	11,44 ± 0,50	-1,07 ± 0,03	14,7 ± 3,1	-1,53 ± 0,41

Związki $ATPOC_3(Py)_2$ oraz $ATPOC_3(Py3)_2$ zastosowano także do monitorowania aktywności pirofosfatazy w ekstraktach cytoplazmatycznych z komórek HEK 293 (Rys. IV. 129).



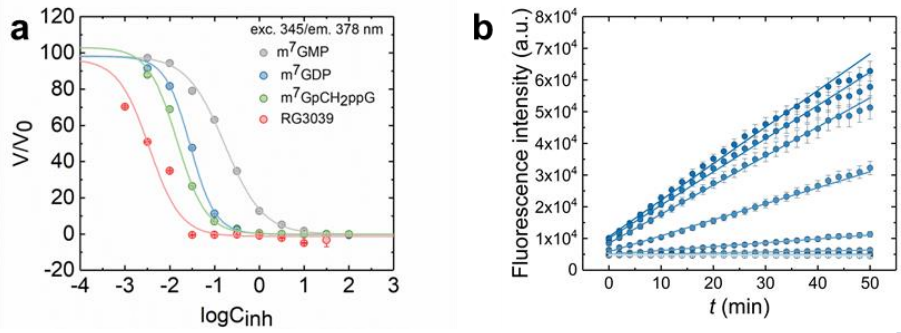
Rys. IV. 129. Monitorowanie aktywności pirofosfatazy w ekstraktach cytoplazmatycznych z komórek HEK 293 z wykorzystaniem sondy $ATPOC_3(Py)_2$ lub $ATPOC_3(Py3)_2$. Przedstawione dane to wartości średnie z trzech niezależnych eksperymentów ± SD. Rysunek zaczerpnięto z pracy Wanat et al. 2018.[294]

Monitorując degradację dwuznakowanych analogów m^7GTP przez specyficznie rozpoznający je enzym degradacji kapu DcpS zaobserwowano różnicę w postępie reakcji dla izomerów I1 i I2 – izomer I1 był widocznie lepszym substratem. Wykonano eksperyment, w którym przeanalizowano zależność prędkości początkowej degradacji sondy $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1 oraz $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I2 od stężenia związku. W przypadku izomeru I1 zależność była zgodna z przebiegiem krzywej Michaelisa-Menten, podczas gdy dla izomeru I2 widoczna była dodatkowa inhibicja reakcji w wysokich stężeniach substratu (Rys. IV. 130). Obliczone wartości stałych Michaelisa K_M wynosiły 1,99 ± 0,12 µM dla I1 i 0,66 ± 0,12 µM dla I2.



Rys. IV. 130. Zależność prędkości początkowej reakcji hydrolizy katalizowanej przez DcpS sond **A)** $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1 i **B)** $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I2 od ich stężenia (substratu). Do krzywej izomeru I1 dopasowano model Michaelisa-Menten, natomiast dla izomeru I2 krzywą inhibicji substratowej. Rysunek zaczerpnięto z pracy Wanat et al. 2018.[294]

Sondę $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1 wykorzystano ostatecznie do charakterystyki czterech znanych inhibitorów DcpS: m^7GMP, m^7GDP m^7GpCH_2ppG i RG3039 (Rys. IV. 131). Obliczone IC_{50} zamieszczono w Tabeli IV. 35. Uzyskane wartośc IC_{50} przy pomocy pomiarów zarówno emisji ekscymerowej, jak i monomerowej są zgodne z zależnościami literaturowymi.

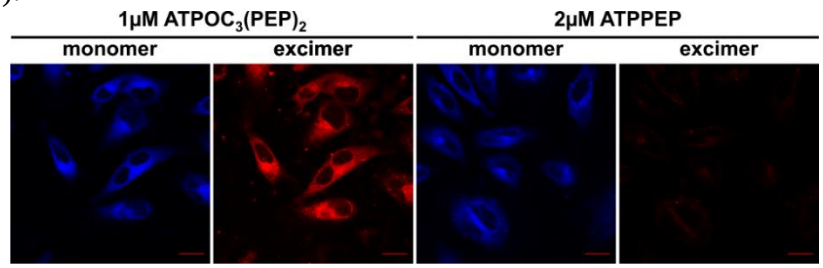


Rys. IV. 131. Inhibicja DcpS (10 nM dimeru) przez cztery wybrane inhibitory: m^7GMP, m^7GDP, m^7GpCH_2ppG i RG3039, scharakteryzowana w obecności 2 µM sondy $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1. Eksperyment przeprowadzono na czytniku płytek (λ_{exc} = 345 nm, λ_{em} = 378 nm) w buforze 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierającym 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA w 37°C. Przedstawione dane to wartości średnie z trzech niezależnych eksperymentów ± SD. Rysunek zaczerpnięto z pracy Wanat et al. 2018.[294]

Tabela IV.35. Zestawienie wartości IC_{50} obliczonych na podstawie zmian intensywności fluorescencji monomerowej lub ekscymerowej sondy $m^7GTPOC_3(Py)_2$ I1 w obecności enzymu DcpS. Przedstawione dane to średnie wartości z trzech niezależnych eksperymentów ± SD.

Inhibitor	IC_{50} (nM) emisja monomerowa (378 nm)	*p* (monomer)	IC_{50} (nM) emisja ekscymerowa (490 nm)	*p* (ekscymer)	IC_{50} (µM) lit.[122]
m^7GMP	163,2 ± 11,5	-1,02 ± 0,2	117 ± 25	-1,17 ± 0,14	97 ± 21
m^7GDP	29,77 ± 0,92	-1,54 ± 0,60	19,7 ± 2,7	-1,37 ± 0,27	5,2 ± 1,2
m^7GpCH_2ppG	16,67 ± 0,46	-1,34 ± 0,06	13,8 ± 1,8	-1,27 ± 0,19	4,0 ± 1,1
RG3039	3,62 ± 0,42	-1,24 ± 0,20	3,3 ± 1,0	-0,93 ± 0,18	0,048 ± 0,010

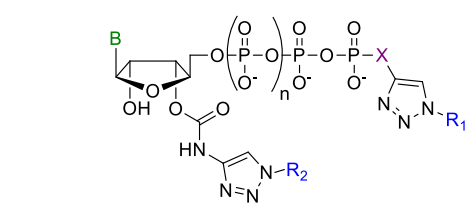
Dodatkową zaletą stosowania dwóch znaczników fluorescencyjnych jest zwiększenie hydrofobowości nukleotydu, dzięki czemu może on przeniknąć przez błonę komórkową. Jednym z wyników projektu było wyselekcjonowanie podwójnie znakowanych nukleotydów, które wnikają do komórek HeLa, umożliwiając ich obrazowanie zarówno za pomocą emisji monomerowej, jak i ekscymerowej (Rys. IV. 132). Badania komórkowe oraz mikroskopowe wykonał dr inż. Paweł Sikorski z Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT Uniwersytetu Warszawskiego).



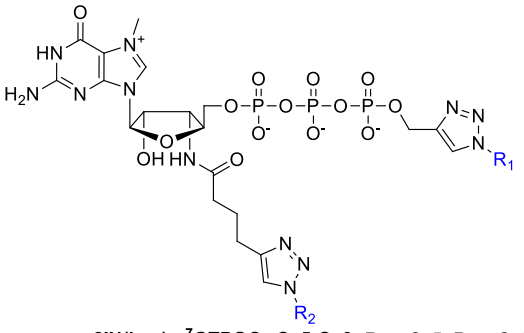
Rys. IV. 132. Detekcja sondy $ATPOC_3(PEP)_2$ w komórkach HeLa. Komórki inkubowano z 1 µM $ATPOC_3(PEP)_2$ lub 2 µM $ATPOC_3PEP$ przez 1 h. Panele 1 i 3 przedstawiają emisję monomerową znacznika PEP (300–420 nm), a panele 2 i 4 emisję ekscymerową (495–800 nm). Pasek skali: 20 nm. Zdjęcia z użyciem mikroskopu konfokalnego wykonał dr inż. Paweł Sikorski z Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT i Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego). Rysunek zaczerpnięto z pracy Wanat et al. 2018.[294]

IV.10.2. Sondy FRET i wygaszeniowe

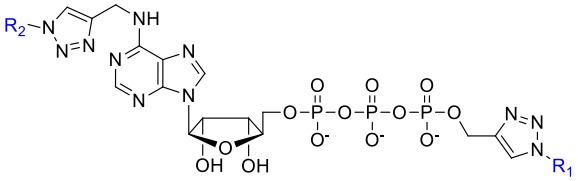
Kolejnym przykładem oddziaływań znaczników fluorescencyjnych, które mogą być wykorzystane do podwójnego znakowania nukleotydów, jest rezonansowy transfer energii FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*). W ramach projektu mgr Przemysław Wanat w Laboratorium Chemii Bioorganicznej (CeNT i Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego) zsyntetyzował i scharakteryzował serię dwuznakowanych mononukleotydów adenozynowych i 7-metyloguanozynowych (Rys. IV. 133). Autorka pracy wykonała charakterystykę spektroskopową i enzymatyczną części związków.



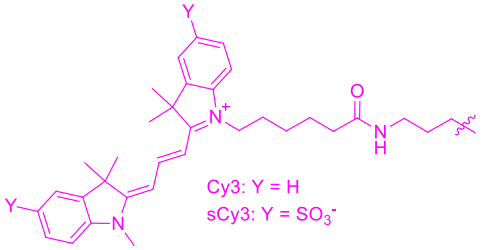
cpADPC$_3$-Cy5-Cy3: B = A, X = CH$_2$; R$_1$ = Cy5; R$_2$ = Cy3, n = 0
cpADPC$_3$-Cy3-Cy5: B = A, X = CH$_2$; R$_1$ = Cy3; R$_2$ = Cy5, n = 0
cpATPC$_2$-Cy3-Cy5: B = A, X = brak; R$_1$ = Cy3; R$_2$ = Cy5, n = 1
cpATPOC$_3$-Cy5-Cy3: B = A, X = OCH$_2$; R$_1$ = Cy5; R$_2$ = Cy3, n = 1
cpATPOC$_3$-Cy3-Cy5: B = A, X = OCH$_2$; R$_1$ = Cy3; R$_2$ = Cy5, n = 1
cpATPOC$_3$-TQ2-(5)FAM: B = A, X = OCH$_2$; R$_1$ = TQ2; R$_2$ = (5)FAM, n = 1
cpATPOC$_3$-TQ3-Cy3: B = A, X = OCH$_2$; R$_1$ = TQ3; R$_2$ = Cy3, n = 1
cpATPOC$_3$-B12-(5)FAM: B = A, X = OCH$_2$; R$_1$ = B12; R$_2$ = (5)FAM, n = 1
3'cp(m)^{7}GTPOC$_3$-Cy5-Cy3: B = m^{7}G, X = OCH$_2$; R$_1$ = Cy5; R$_2$ = Cy3, n = 1
2'cp(m)^{7}GTPOC$_3$-Cy3-Cy5: B = m^{7}G, X = OCH$_2$; R$_1$ = Cy5; R$_2$ = Cy3, n = 1

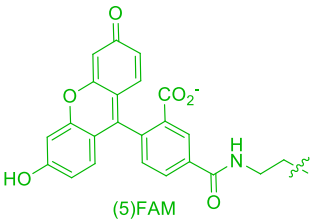


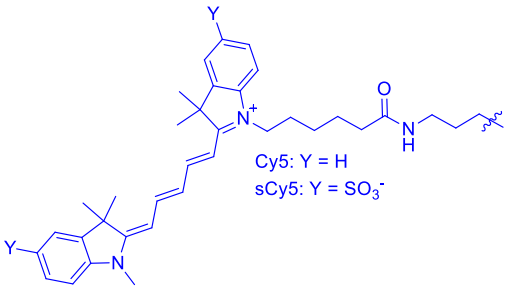
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy5-Cy3: R$_1$ = Cy5; R$_2$ = Cy3
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-Cy5: R$_1$ = Cy3; R$_2$ = Cy5
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-sCy5-Cy3: R$_1$ = sCy5; R$_2$ = Cy3
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-sCy5: R$_1$ = Cy3; R$_2$ = sCy5
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-sCy3-sCy5: R$_1$ = sCy3; R$_2$ = sCy5
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-TQ3-(5)ROX: R$_1$ = TQ3; R$_2$ = (5)ROX

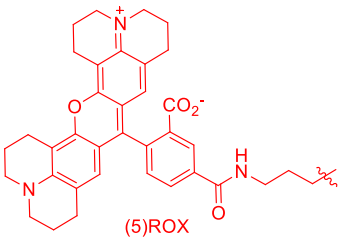


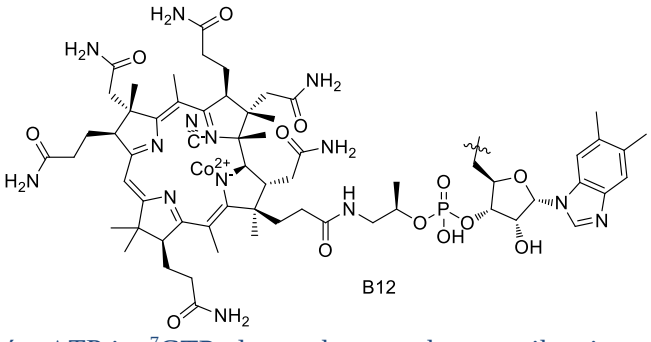
6N-Cy3-ATPOC$_3$-Cy5: R$_1$ = Cy5; R$_2$ = Cy3
6N-(5)ROX-ATPOC$_3$-TQ3: R$_1$ = (5)ROX; R$_2$ = TQ3









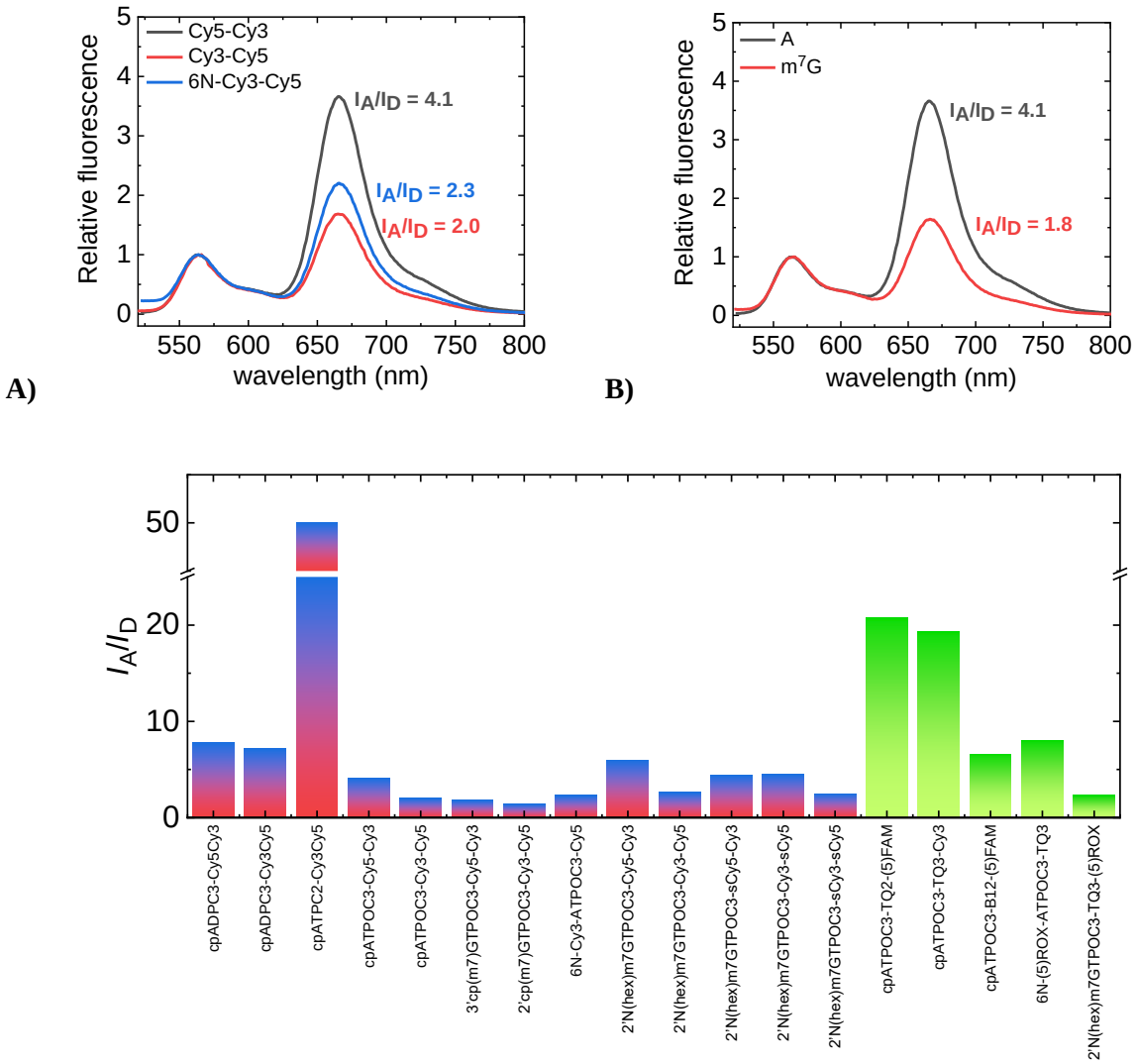


Rys. IV. 133. Struktury badanych analogów ATP i m^{7}GTP, dwuznakowanych znacznikami tworzącymi parę FRET lub parę fluorofor–wygaszacz.

Sondy FRET zawierały układ znaczników cyjaninowych, składający się z cyjaniny 3 (Cy3) i cyjaniny 5 (Cy5), w kilku przypadkach występujących w formie sulfonylowej (sCy3 i sCy5). Nukleotydy znakowane były w większości przez terminalną grupę fosfonianową/fosforanową oraz pozycję 2'-*O*/3'-*O* rybozy (sondy adeninowe zostały otrzymane w formie mieszaniny izomerów). Zapis Cy3-Cy5 oznacza, że nukleotyd jest znakowany Cy3 poprzez łańcuch fosforanowy, a Cy5 poprzez rybozę. Dla sond adenozynowych przetestowano także znakowanie w pozycji 6N adeniny. Sondy m^7G–nukleotydowe posiadały trzy warianty wprowadzenia znacznika w pozycję rybozy: poprzez grupę 2'-*O*, 3'-*O* lub 2'NH. W ramach projektu scharakteryzowano także dwuznakowane sondy, zawierające układ fluorofor–wygaszacz. Zbadano takie pary, jak witamina B12 z 5-karboksyfluoresceiną (B12-(5)FAM), Tide Quencher 2 z 5-karboksyfluoresceiną (TQ2-(5)FAM) , Tide Quencher 3 z cyjaniną 3 (TQ3-Cy3) oraz Tide Quencher 3 z rodaminą X (TQ3-(5)ROX). Struktury wygaszaczy Tide Quencher nie są udostępnione przez producenta.

Związki scharakteryzowano spektroskopowo poprzez pomiar widm absorpcji, wzbudzania oraz emisji fluorescencji. W przypadku sond FRET znakowanych cyjaninami w celu wyeliminowania emisji Cy5 pochodzącej z absorpcji fluorofora i aby obserwować jedynie efekt FRET układ wzbudzano w 500 nm. Emisja sond cyjaninowych składa się z dwóch pasm z maksimami odpowiadającymi izolowanym znacznikom (odpowiednio ~565 nm i ~665 nm), których intensywność była różna dla różnych sond. Aby ilościowo zobrazować efekt FRET obliczono stosunek powierzchni pod pasmem akceptora (Cy5) do powierzchni pod pasmem donora (Cy3; I_A/I_D; Tabela IV. 36), korzystając z zarejestrowanych widm emisji. Najsilniejszy efekt FRET (I_A/I_D = 50,0) zaobserwowano dla sondy cpATPC$_2$-Cy3-Cy5, zawierającej pierścień triazolowy przyłączony bezpośrednio do atomu fosforu. Analizując widma emisji sond ATP zawierających układ cyjanin w różnych pozycjach nukleotydu stwierdzono, że kombinacja Cy5-Cy3 pozwala na uzyskanie silniejszego efektu FRET z wartością I_A/I_D większą o 1,1-raza dla sondy cpADPC$_3$-Cy5-Cy3 vs cpADPC$_3$-Cy3-Cy5 (Rys. IV. 134A), o 2-razy dla sondy cpATPOC$_3$-Cy5-Cy3 vs cpATPOC$_3$-Cy3-Cy5 oraz o 2,3-raza dla sondy 2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-Cy5-Cy3 vs 2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-Cy3-Cy5 (Tabela IV. 36). Umieszczenie Cy3 w pozycji 6N adeniny z Cy5 w łańcuchu fosforanowym prowadzi do dwukrotnego zmniejszenia wartości I_A/I_D (z 4,1 do 2,0; Rys. IV. 134A; Tabela IV. 36). Podobnie zastąpienie zasady azotowej 7-metyloguaniną zmniejsza dwukrotnie I_A/I_D (Rys. IV. 134B; Tabela 36). Porównanie I_A/I_D wszystkich sond FRET zamieszczono na Rys. IV. 134C.

W celu porównania wielkości wygaszania sond zawierających układ fluorofor–wygaszacz przeprowadzono reakcję ich degradacji, katalizowanej przez fosfodiesterazę PDE-I. Następnie obliczono współczynniki wygaszania *Q* obliczone, jako stosunek intensywności fluorescencji po całkowitej hydrolizie (I_∞) do intensywności fluorescencji sondy niezdegradowanej (I_0; Tabela IV. 37). Najwyższą wartość *Q* uzyskano dla sond ATP znakowanych w obrębie łańcucha fosforanowego i rybozy parami TQ2-(5)FAM (cpATPOC$_3$-TQ2-(5)FAM; *Q* = 20,8; Tabela IV. 37) i TQ3-Cy3 (cpATPOC$_3$-TQ3-Cy3; *Q* = 19,3; Tabela IV. 37). Witamina B12 okazała się być słabszym wygaszaczem emisji 5-karboksyfluoresceiny w porównaniu do TQ2 (*Q* = 6,6 dla sondy cpATPOC$_3$-B12-(5)FAM; Tabela IV. 37). Umieszczenie Cy3 w pozycji 6N adeniny sparowanej z TQ3 (6N-Cy3-ATPOC$_3$-TQ3) prowadzi do zmniejszenia *Q* do wartości 8,0 (Tabela IV. 37). Natomiast najsłabsze wygaszanie wyrażone w najniższej wartości *Q* = 2,3 odnotowano dla sondy m^7G (2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-TQ3-(5)ROX). Porównanie *Q* wszystkich sond wygaszeniowych zamieszczono na Rys. IV. 134C.



Rys. IV. 134. Właściwości fluorescencyjne podwójnie znakowanych sond nukleotydowych: **A)** widma emisji sond ATP znakowanych Cy3 i Cy5 w różnych pozycjach nukleotydu (cpATPOC$_3$-Cy5-Cy3, cpATPOC$_3$-Cy3-Cy5 i 6N-Cy3-ATPOC$_3$-Cy5); **B)** widma emisji sond Cy5-Cy3 zawierających różne zasady azotowe (cpATPOC$_3$-Cy5-Cy3 i 3'cp(m^7)GTPOC$_3$-Cy5-Cy3); **C)** Porównanie stosunku powierzchni pod pasmem emisji akceptora do powierzchni pod pasmem emisji donora (niebiesko-czerwone kolumny). W przypadku sond wygaszeniowych (zielone kolumny) przedstawiono stosunek intensywności fluorescencji przed i po całkowitej degradacji enzymatycznej.

Tabela IV.36. Właściwości spektroskopowe podwójnie znakowanych sond FRET.

Związek	Maksima absorpcji (nm)	Maksima emisji (nm)	I_D/I_A
cpADPC$_3$-Cy5-Cy3	535, 646	566, 667	7,8
cpADPC$_3$-Cy3-Cy5	535, 646	566, 668	7,2
cpATPC$_2$-Cy3-Cy5	535, 646	563, 667	50,0
cpATPOC$_3$-Cy5-Cy3	536, 646	564, 665	4,1
cpATPOC$_3$-Cy3-Cy5	537, 647	564, 665	2,0
6N-Cy3-ATPOC$_3$-Cy5	536, 646	566, 667	2,3

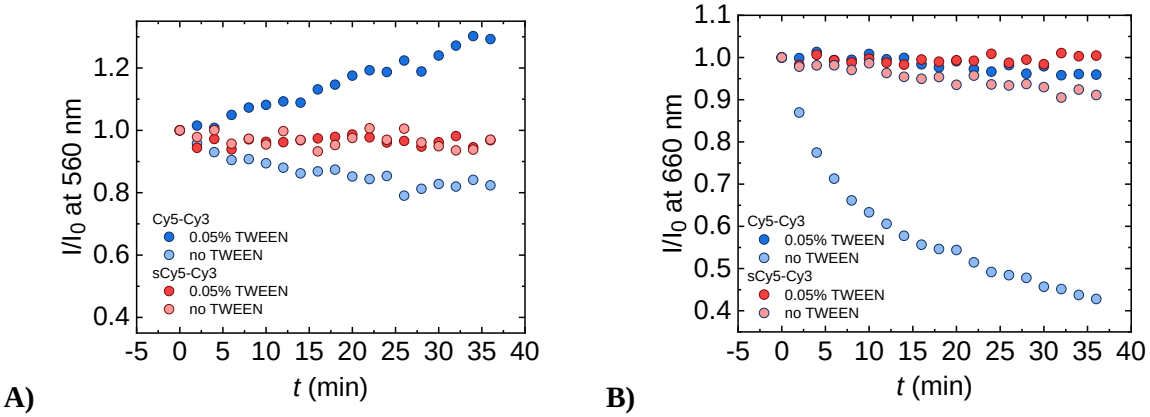
3'cp(m^7)GTPOC$_3$-Cy5-Cy3	536, 650	565, 666	1,8
2'cp(m^7)GTPOC$_3$-Cy3-Cy5	537, 647	561, 662	1,4
2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-Cy5-Cy3	539, 647	563, 665	6,0
2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-Cy3-Cy5	537, 647	567, 666	2,6
2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-sCy5-Cy3	533, 651	559, 665	4,4
2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-Cy3-sCy5	542, 650	560, 664	4,5
2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-sCy3-sCy5	547, 647	561, 664	2,5

Tabela IV.37. Właściwości spektroskopowe podwójnie znakowanych sond wygaszeniowych.

Związek	Maksima absorpcji (nm)	Maksima emisji (nm)	Q^a
cpATPOC$_3$-TQ2-(5)FAM	492	524	20,8
cpATPOC$_3$-TQ3-Cy3	521	561	19,3
cpATPOC$_3$-B12-(5)FAM	499	528	6,6
6N-(5)ROX-ATPOC$_3$-TQ3	553	613	8,0
2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-TQ3-(5)ROX	567	603	2,3

[a] współczynnik wygaszania zdefiniowany, jako I_∞/I_0

W kolejnym etapie zamierzano przeprowadzić badania enzymatyczne sond dwuznakowanych w eksperymentach degradacji katalizowanej fosfodiesterazą PDE-I. W trakcie badań zaobserwowano niestabilność fluorescencji sond FRET z układem cyjanin Cy3 i Cy5 w buforze Tris–HCl pH 8,0 z 5 mM $MgCl_2$, dedykowanym do badań reakcji degradacji nukleotydu przez PDE-I. Spadek intensywności fluorescencji sondy 2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-Cy5-Cy3 zarówno pasma donora (Cy3; Rys. IV. 135A), jak i akceptora (Cy5; Rys. IV. 135B) był znaczący. Problem ten rozwiązano poprzez dodanie do mieszaniny 0,05% detergentu Tween-20. Przypuszczalnie źródłem niestabilności fluorescencji była agregacja, spowodowana słabą rozpuszczalnością Cy3 i Cy5 w buforze Tris. Dlatego też innym rozwiązaniem stało się wykorzystanie wersji cyjanin 3 i 5 rozpuszczalnych w wodzie, zawierających modyfikację grupą sulfonową ($-SO_3^-$; sCy3 i sCy5), co poskutkowało stabilizacją sygnału fluorescencji (Rys. IV. 135).



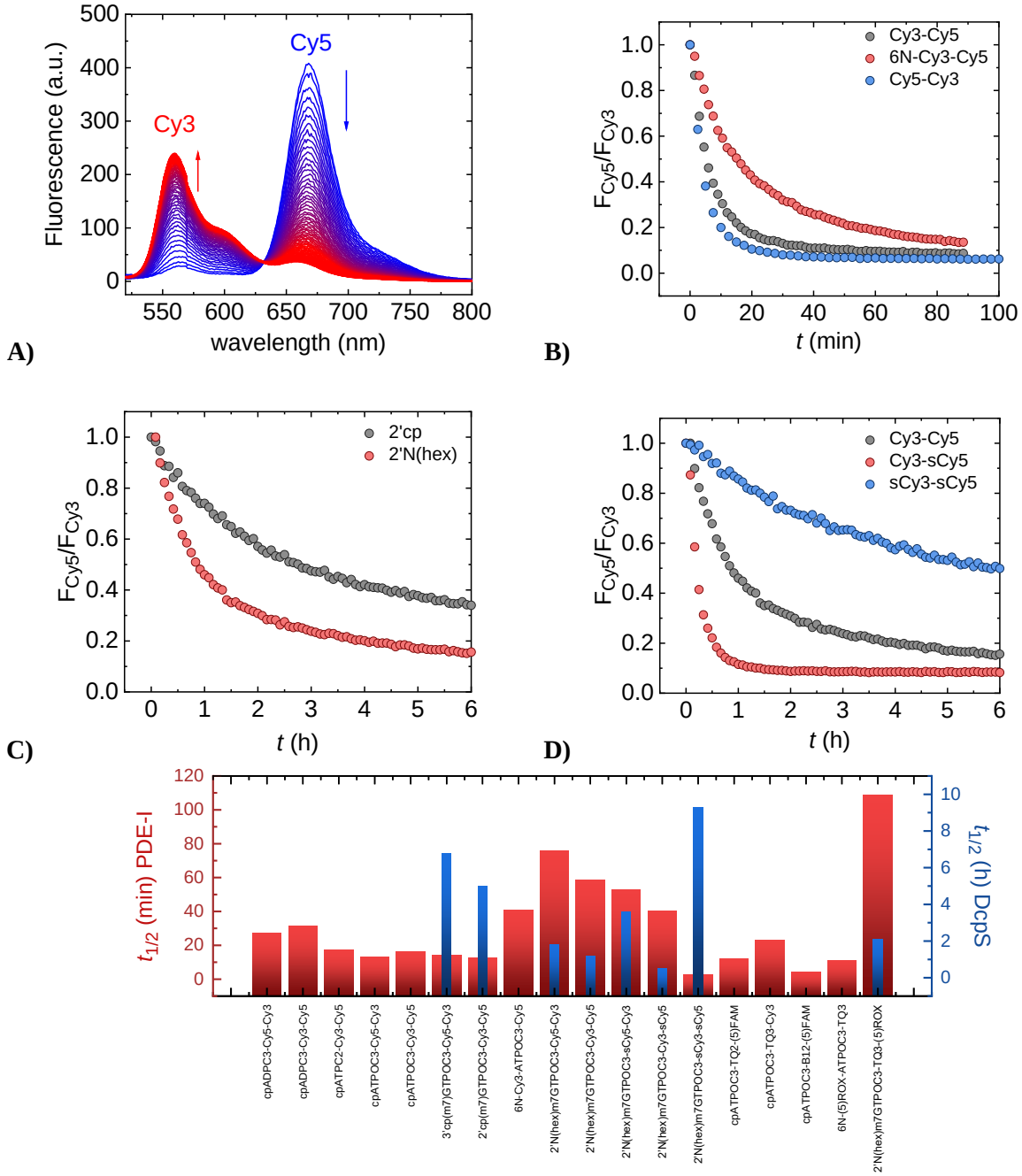
Rys. IV. 135. Wpływ detergentu Tween-20 na stabilność pasma fluorescencji **A)** Cy3 (560 nm) i **B)** Cy5 (660 nm) sond 2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-Cy5-Cy3 i 2'N(hex)m^7GTPOC$_3$-sCy5-Cy3.

Po ustaleniu optymalnych warunków stabilizujących efekt FRET, sprawdzono czy może on zostać wykorzystany do monitorowania aktywności pirofosfatazy. Przeprowadzono reakcje hydrolizy enzymatycznej wszystkich sond dwuznakowanych, katalizowanej przez PDE-I wraz z

rejestracją widm emisji w czasie. Na przykładzie sondy cpATPC$_2$-Cy3-Cy5 zgodnie z oczekiwaniami intensywność fluorescencji Cy5 (λ_{em} = 660 nm) malała, natomiast Cy3 rosła (λ_{em} = 560 nm), zgodnie z postępem reakcji enzymatycznej (Rys. IV. 136A). Aby ocenić specyficzność substratową PDE-I obliczono czasy półtrwania $t_{1/2}$ reakcji hydrolizy na podstawie przyrostu fluorescencji Cy3 (Tabela IV. 38). Najlepszym substratem spośród sond adenozynowych okazała się być sonda cpATPOC$_3$-B12-(5)FAM ($t_{1/2}$ = 4,3 min), natomiast spośród 7-metyloguanozynowych – 2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-sCy3-sCy5 ($t_{1/2}$ = 2,5 min). Podczas gdy dla sond A najbardziej korzystną kombinacją z punktu widzenia PDE-I okazała się być Cy5 na fosforanie i Cy3 na rybozie (Cy5-Cy3; Rys. IV. 136B; Tabela IV. 38), dla sond m^{7}G zaobserwowano odwrotną tendencję ($t_{1/2}$ = 78,5 min dla 2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy5-Cy3 i $t_{1/2}$ = 58,5 min dla 2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-Cy5; Tabela IV. 38). Ponadto sondy m^{7}G oparte o 2'-amino-2'-deoksyrybozę były gorszymi substratami PDE-I w porównaniu do ich odpowiedników 2'/3'-karbaminianowych (Tabela IV. 38). Zaobserwowano, że podstawienie cyjaniny sulfocyjaniną przyspiesza postęp reakcji degradacji sond m^{7}G, natomiast przeniesienie cyjaniny 5 w pozycję 6N adeniny – spowalnia (Rys. IV. 136B).

Sondy 7-metyloguanozynowe (analogi kapu) mogą zostać wykorzystane do badań enzymów specyficznie degradujących kap, jak enzym DcpS. Z tego względu sondy m^{7}G przetestowano także w eksperymencie enzymatycznej hydrolizy katalizowanej przez DcpS wraz z rejestracją widm emisji w czasie. Sondy 2'/3'-karbaminianowe ulegały degradacji w bardzo niewielkim stopniu z $t_{1/2}$ od 5 do 7 h (Tabela IV. 38). Znaczne spowolnienie przebiegu reakcji prawdopodobnie wynikało ze słabego rozpoznania substratu m^{7}GTP w miejscu aktywnym DcpS po zmodyfikowaniu go dwoma znacznikami. Wiązanie substratu jest stabilizowane m.in. poprzez utworzenie wiązań wodorowych pomiędzy grupami 2'/3' hydroksylowymi rybozy, a łańcuchami bocznymi kwasu asparaginowego 205 (Asp 205) i lizyny 207 (Lys 207; Rys. IV. 137). Modyfikacja grupy hydroksylowej 2' lub 3' karbaminianem prowadzi do usunięcia jednego z atomów wodoru, a tym samym jednego z wiązań wodorowych z Asp205, powodując destabilizację wiązania substratu. Z tego powodu część z sond m^{7}G zawierała strukturę 2'-amino-2'-deoksynukleozydu, gdyż modyfikacja grupy aminowej 2'N-(hex-5-ynamidem) pozostawia aminę drugorzędową (–NH–), wciąż zdolną do utworzenia wiązania wodorowego z Asp205. Hipotezę tą zweryfikowano poprzez wykonanie enzymatycznej degradacji sond 2'N(hex) z DcpS. Zaobserwowano spadek wartości $t_{1/2}$ z 5,0 h dla sondy 2'cp(m^7)GTPOC$_3$-Cy3-Cy5 do 1,2 h dla 2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-Cy5, co potwierdza opisane powyżej przypuszczenia (Rys. IV. 136C; Tabela IV. 38). Dodatkowa modyfikacja Cy5 (sCy5) prowadzi do dalszego spadku $t_{1/2}$ do 0,5 h (Rys. IV. 136D). Jednakże podwójne podstawienie sulfocyjaninami (2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-sCy3-sCy5) skutkuje dużym spowolnieniem reakcji z $t_{1/2}$ = 9,3 h (Rys. 136D; Tabela IV. 38).

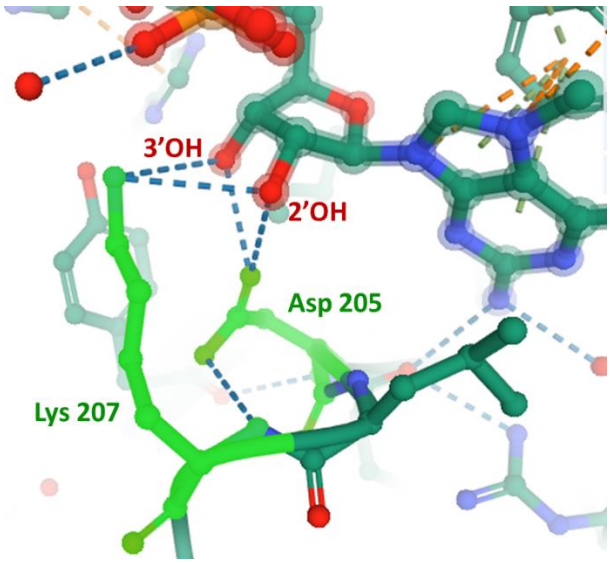
Czasy półtrwania degradacji sond dwuznakowanych katalizowanej przez PDE-I lub DcpS porównano na Rys. IV. 136E i w Tabeli IV. 38. Trwają badania nad zastosowaniem wybranych sond do monitorowania degradacji kapu w komórkach z zastosowaniem pomiarów fluorescencyjnych w tym czasoworozdzielczych. Publikacja dotycząca dwuznakowanych sond FRET i wygaszeniowych jest obecnie w przygotowaniu („*Doubly labelled nucleotide probes synthesized via one-pot-two-step click chemistry enable monitoring enzymatic activity in live cells"*).



Rys. IV. 136. Charakterystyka enzymatyczna podwójnie znakowanych sond nukleotydowych: **A)** hydroliza sondy cpATPC$_2$-Cy3-Cy5 przez PDE-I, monitorowana poprzez rejestrację widm emisji fluorescencji w odstępach, co 1 minutę; **B)** porównanie przebiegu katalizowanej PDE-I hydrolizy sond ATP znakowanych Cy3 i Cy5 w różnych pozycjach nukleotydu (cpATPOC$_3$-Cy3-Cy5, cpATPOC$_3$-Cy5-Cy3 i 6N-Cy3-ATPOC$_3$-Cy5); **C)** porównanie przebiegu katalizowanej DcpS hydrolizy sond m^{7}GTP znakowanych Cy3 w terminalnym fosforanie i Cy5 poprzez grupę 2'-*O* (2'cp(m^7)GTPOC$_3$-Cy3-Cy5) lub 2'NH (2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-Cy5); **D)** wpływ modyfikacji cyjanin grupą sulfonową na kinetykę katalizowanej DcpS hydrolizy sond m^{7}G (2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-Cy5, 2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-sCy5 i 2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-sCy3-sCy5); **E)** porównanie czasów półtrwania hydrolizy sond dwuznakowanych katalizowanej przez PDE-I (czerwone kolumny) i DcpS (niebieskie kolumny).

Tabela IV.38. Charakterystyka enzymatyczna podwójnie znakowanych sond nukleotydowych. Kolorem czerwonym zaznaczono najlepsze substratu PDE-I, a zielonym – DcpS.

Związek	$t_{1/2}$ (min) PDE-I	$t_{1/2}$ (min) DcpS
cpADPC$_3$-Cy5-Cy3	27,4	–
cpADPC$_3$-Cy3-Cy5	31,4	–
cpATPC$_2$-Cy3-Cy5	17,3	–
cpATPOC$_3$-Cy5-Cy3	13,2	–
cpATPOC$_3$-Cy3-Cy5	16,2	–
cpATPOC$_3$-TQ2-(5)FAM	12,1	–
cpATPOC$_3$-TQ3-Cy3	23,0	–
cpATPOC$_3$-B12-(5)FAM	4,3	–
3'cp(m^7)GTPOC$_3$-Cy5-Cy3	14,0	6,8
2'cp(m^7)GTPOC$_3$-Cy3-Cy5	12,5	5,0
6N-Cy3-ATPOC$_3$-Cy5	40,6	–
6N-(5)ROX-ATPOC$_3$-TQ3	11,2	–
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy5-Cy3	75,8	1,8
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-Cy5	58,5	1,2
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-sCy5-Cy3	52,7	3,6
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-Cy3-sCy5	40,2	0,5
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-sCy3-sCy5	2,5	9,3
2'N(hex)m^{7}GTPOC$_3$-TQ3-(5)ROX	108,5	2,1



Rys. IV. 137. Miejsce wiążące enzymu DcpS z m^{7}GpppG[94] z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi pomiędzy grupami 2' i 3' hydroksylowymi 7-metyloguanozyny, a grupami aminową i karbonylową w łańcuchu bocznym odpowiednio lizyny 207 (Lys 207) i kwasy asparaginowego 205 (Asp 205). Strukturę krystalograficzną zwizualizowano z użyciem narzędzia Mol* dostępnego na stronie PDB (https://www.rcsb.org/).

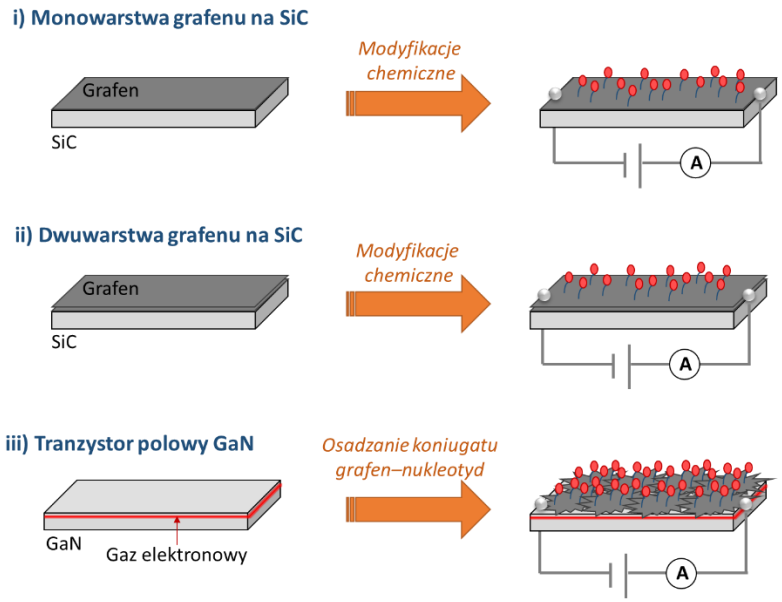
IV.11. Modyfikacja podłoży grafenowych

Opracowane dotychczas metody badań oddziaływań kap–białko opierały się na detekcji zmian sygnału fluorescencyjnego – intensywności bądź anizotropii fluorescencji oraz efektu mikroskalowej termoforezy. Jedną z części niniejszego projektu doktorskiego było zaprojektowanie układu przeznaczonego do oznaczania stężenia białka eIF4E (marker nowotworowy) poprzez rejestrację zmian parametrów elektrycznych warstw grafenowych kowalencyjnie modyfikowanych analogami kapu. W celu przyłączenia nukleotydu planowano wykorzystać reakcję CuAAC pomiędzy odpowiednio zmodyfikowanymi chemicznie nukleotydem oraz podłożem grafenowym. Zaplanowano trzy sposoby konstrukcji sondy:

i) Modyfikacje chemiczne monowarstwy grafenu odłożonej na SiC metodą CVD;
ii) Modyfikacje chemiczne dwuwarstwy grafenu odłożonej na SiC metodą CVD;
iii) Osadzanie koniugatu grafen–nukleotyd na tranzystorze polowym z GaN z dwuwymiarowym gazem elektronowym.

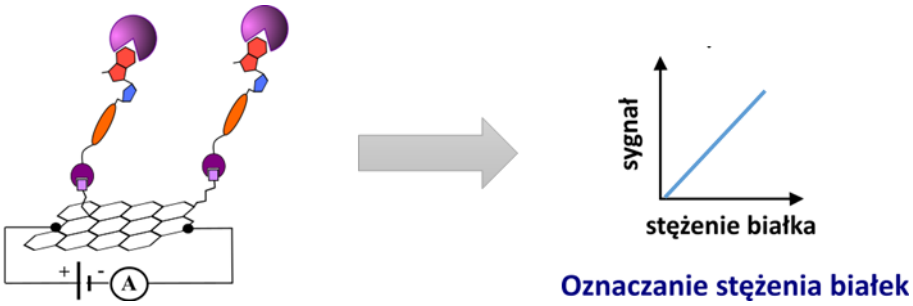
Dwa pierwsze podejścia miały na celu wykorzystanie mono- lub dwuwarstwy grafenu, jako elementu przewodzącego prąd, czułego na zmiany otoczenia. Przy pomocy modyfikacji chemicznych grafenu planowano wprowadzić w jego strukturę analog kapu, który specyficznie wiąże białka metabolizujące koniec 5’ mRNA (Rys. IV.138i–ii). Różnica w podejściu i) oraz ii) polega na tym, że w przypadku monowarstwy grafenowej można oczekiwać, że modyfikacje bezpośrednio wpływają na jej zdefektowanie i mogą negatywnie wpłynąć na właściwości elektryczne. W przypadku ii), w założeniu modyfikacji ulega jedynie warstwa wierzchnia, a warstwa pod nią zachowałaby dobre właściwości elektryczne (np. wysoka ruchliwość nośników).

Trzecie podejście zakładało w pierwszej kolejności syntezę koniugatu analogu kapu z odpowiednio sfunkcjonalizowaną pochodną grafenu. W tej sytuacji analog grafenu, czy też sam koniugat ma postać proszku. Następnie proszek miałby zostać osadzony na tranzystorze polowym GaN FET (ang. *Field-Effect Transistor*) z dwuwymiarowym gazem elektronowym 2DEG (ang. *2D Electron Gas*).[320] Tranzystory tego typu znane są pod nazwą HEMT (ang. *High Electron Mobility Transistors*) i charakteryzują się niezwykle dużymi ruchliwościami nośników ładunku. Ich specyfika polega na wykorzystaniu heterozłącza – w tym przypadku AlGaN/GaN, dwóch materiałów o różnej szerokości pasma energii zabronionych do utworzenia warstwy (kwazidwuwymiarowej) ze swobodnymi nośnikami ładunku. Układ przypomina trójkątną studnię potencjału dla elektronów (ew. dziur), która wynika z położenia pasm przewodnictwa (pasm walencyjnych) dwóch materiałów. Elektrony mogą poruszać się jedynie w dwóch wymiarach, a poziomy energii ruchu w trzecim kierunku są skwantowane. To właśnie te elektrony tworzą warstwę dwuwymiarowego gazu przewodzącego 2DEG. Heterostruktury z gazem 2DEG są wykorzystywane do konstrukcji tranzystorów polowych. Składają się one z trzech podstawowych elementów: źródła (*source*), drenu (*drain*) oraz bramki (*gate*). Pomiędzy źródłem, a drenem znajduje się kanał, w którym płynie prąd. W FET kontrola przepływu prądu odbywa się poprzez przyłożenie napięcia do bramki, co z kolei zmienia przewodnictwo elektryczne między źródłem, a drenem. W proponowanym układzie rolę bramki pełni modyfikowany nukleotydem analog grafenu. Odłożenie koniugatu na powierzchni tranzystora będzie wpływać na przepływ prądu.



Rys. IV. 138. Schematyczne przedstawienie zaplanowanych podejść do konstrukcji sondy.

Schemat działania sondy molekularnej przeznaczonej do oznaczania stężenia białka eIF4E zaprezentowano na Rys. IV. 139.



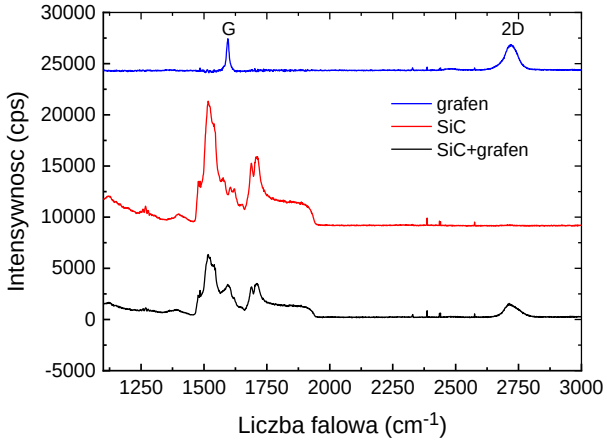
Rys. IV. 139. Schemat działania metody przeznaczonej do badań oddziaływań kap–białko, w oparciu o pomiary zmian parametrów elektrycznych warstw grafenowych.

IV.11.1. Charakterystyka monowarstwy grafenu odłożonej na SiC

W pierwszym podejściu przeprowadzono próby modyfikacji chemicznej monowarstwy grafenu odłożonej na podłożu z półprzewodnika – węglika krzemu SiC. Idea polegała na tym, aby sfunkcjonalizować grafen tak, żeby zmieniał swoje przewodnictwo elektryczne pod wpływem dołączonych do niego molekuł. W tym celu wykorzystano próbkę grafenu o wymiarach 1x1 cm (oznaczoną 2562 G2C1), wyhodowanego w Instytucie Technologii i Materiałów Elektronicznych w Warszawie metodą chemicznego osadzania z fazy gazowej CVD (ang. *Chemical Vapor Deposition*). Polega ona na wzroście epitaksialnym grafenu na podłożu z SiC, z użyciem propanu, jako gazowego prekursora węglowego w warunkach wysokiej temperatury i niskiego ciśnienia argonu.[321]

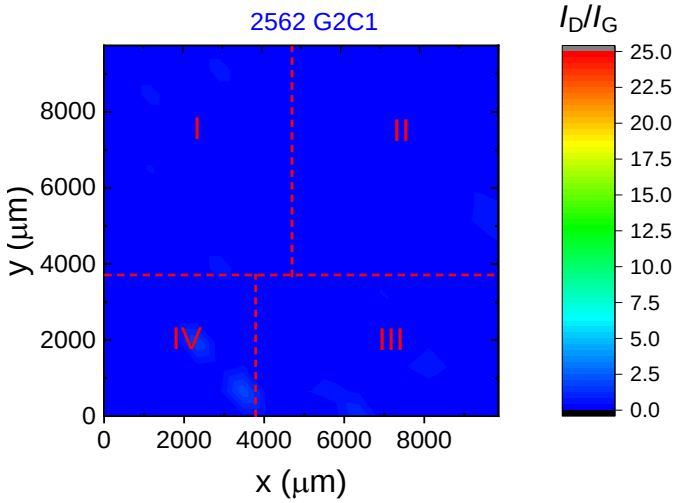
W celu scharakteryzowania właściwości grafenu wykonywano dwuwymiarowe mapy ramanowskie powierzchni próbki. Ponieważ w pomiarze następuje zarówno wzbudzanie grafenu, jak też podłoża SiC, aby uzyskać widma samego grafenu należy umiejętnie odjąć widmo SiC. Widmo czystego SiC rejestrowano oddzielnie, ogniskując laser w głębi próbki, tuż pod warstwą grafenową. Ze względu na to, że intensywności pasm mierzonych widm różnią się między sobą przed odjęciem tła SiC należy wykonać odpowiednią procedurę matematyczną

zapisaną w zautomatyzowanym skrypcie.[322] W pierwszej kolejności dopasowywano funkcję liniową do obszaru spektralnego (~2200–2400 cm^{-1}), w którym nie obserwuje się żadnych struktur, a następnie tak uzyskane tło odejmowano od surowych danych zarówno dla widma SiC, jak i każdego z widm mierzonych z powierzchni próbki. Zabieg ten pozwalał na wyeliminowanie różnic w tle (głównie) luminescencyjnym. Następnie wykonano sumowanie numeryczne sygnału w obszarze ~1750–1850 cm^{-1} widma SiC oraz widm powierzchni. Stosunek obydwu zintegrowanych wartości był czynnikiem skalującym, wykorzystanym do odjęcia referencyjnego sygnału SiC. Stosując opisaną procedurę dla każdego zarejestrowanego widma odejmowano sygnał SiC (podłoża) w celu uzyskania czystego widma grafenu, co przykładowo przedstawiono na Rys. IV. 140.



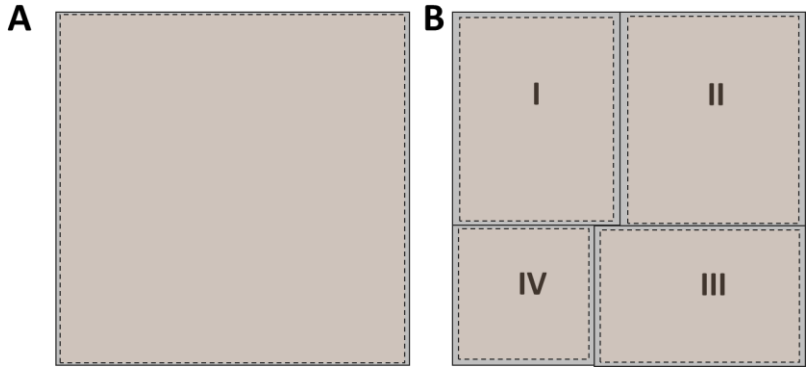
Rys. IV.140. Wybrane widma ramanowskie warstwy grafenu, podłoża SiC oraz grafenu i SiC płytki 2562 G2C1.

Skrypt przeznaczony do odjęcia tła SiC zawierał także dopasowanie funkcji Lorentza do trzech głównych sygnałów widma grafenu: G, D i 2D, na podstawie, którego obliczane były także takie parametry pasm, jak położenie maksimum (energia), intensywność pasma (powierzchnia pod widmem) oraz szerokość połówkowa (FWHM, ang. *Full Width at Half Maximum*). Na otrzymanych widmach grafenu wyróżnia się przede wszystkim wąskie pasmo G przy 1594 cm^{-1}, szersze pasmo 2D przy 2720 cm^{-1} oraz słabo widoczne pasmo D (oznacza to niskie zdefektowanie materiału). Analizę stosunku intensywność pasm D (I_D) do intensywności pasma G (I_G) dla całej próbki przedstawiono na Rys. IV. 141. Mapę płytki wykonano w odstępach 579,5 µm na osi OX i 650 µm na osi OY (288 punktów).

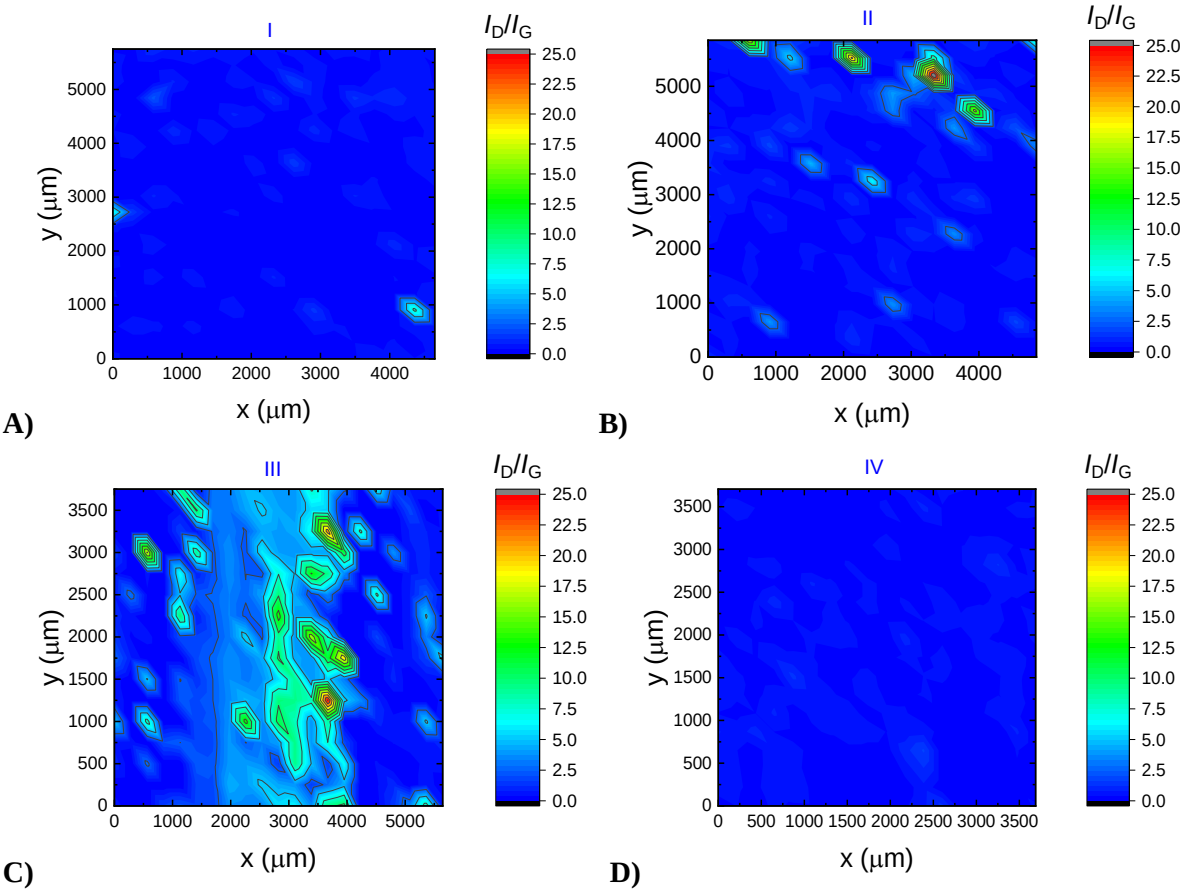


Rys. IV. 141. Stosunek powierzchni pod pasmem D do powierzchni pod pasmem G płytki 2562 G2C1 obliczony na podstawie zarejestrowanych widm ramanowskich w kolejnych punktach płytki. Czerwonymi liniami zaznaczono rozmiar próbek po podziale.

Płytka została następnie pocięta na 4 części, każda o innych wymiarach (Rys. IV. 142). Na podstawie uzyskanych map ramanowskich wykonano analizę parametrów pasm G, D dla fragmentów I do IV, powstałych z pierwotnej próbki (Rys. IV. 143).



Rys. IV. 142. Schematyczne przedstawienie płytki 2562 G2C1 **A)** przed i **B)** po cięciu na cztery fragmenty. Powierzchnia otoczona linią przerywaną oznacza obszar, na którym mierzono widma ramanowskie.

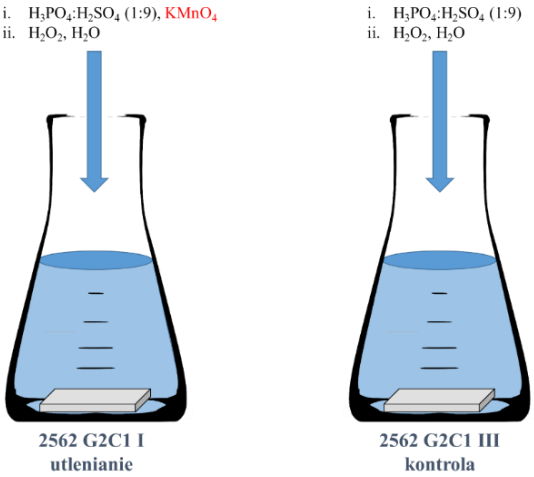


Rys. IV. 143. Stosunek powierzchni pod pasmem D do powierzchni pod pasmem G obliczony dla kolejnych punktów płytki 2562 G2C1 **A)** I, **B)** II, **C)** III i **D)** IV z zarejestrowanych widm ramanowskich.

Podział płytki nie wpłynął znacząco na jakość warstw grafenu fragmentów I, II i IV, natomiast w przypadku fragmentu III zaobserwowano wzrost zdefektowania (zobrazowany wzrostem wartości I_D/I_G). Pasmo G dominuje na widmach ramanowskich, każdego z fragmentów. W nielicznych miejscach zdefektowania pojawia się silniejsze pasmo D (wyższy stosunek I_D/I_G). W kolejnych etapach fragmenty płytek poddane zostały modyfikacjom chemicznym, mającym na celu wprowadzenie grupy azydkowej.

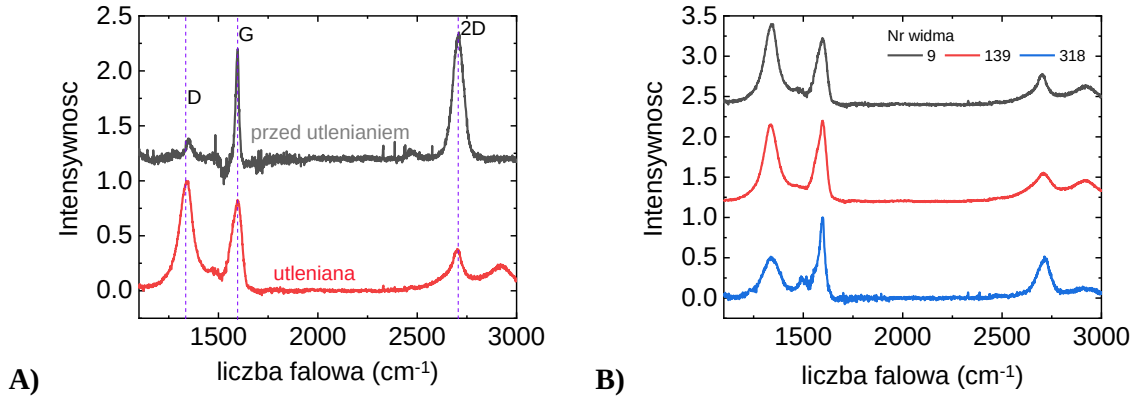
IV.11.2. Utlenianie monowarstwy grafenu

Aby zmodyfikować chemicznie powierzchnię grafenu dobrym punktem wyjściowym jest przeprowadzenie reakcji utleniania. Wprowadzone w ten sposób grupy hydroksylowe, epoksydowe i karboksylowe ułatwiają dalsze modyfikacje chemiczne. Część I płytki 2562 G2C1 została umieszczona na dnie szklanego naczynia, do którego wprowadzono mieszaninę utleniającą, złożoną z: kwasów H_3PO_4:H_2SO_4 (1:9) oraz $KMnO_4$. Układ inkubowano przez 5 min w temperaturze 30°C, po czym dodano 30% H_2O_2. W trakcie inkubacji naczynie wytrząsano z prędkością obrotową 300 rpm. Następnie powierzchnię płytki przemyto wielokrotnie wodą i wysuszono w strumieniu argonu. Procedurę zaczerpnięto z pracy Marcano, et al. 2010.[323] W ramach kontroli równolegle w tych samych warunkach inkubowano fragment III płytki bez dodatku utleniacza $KMnO_4$ (Rys. IV. 144).

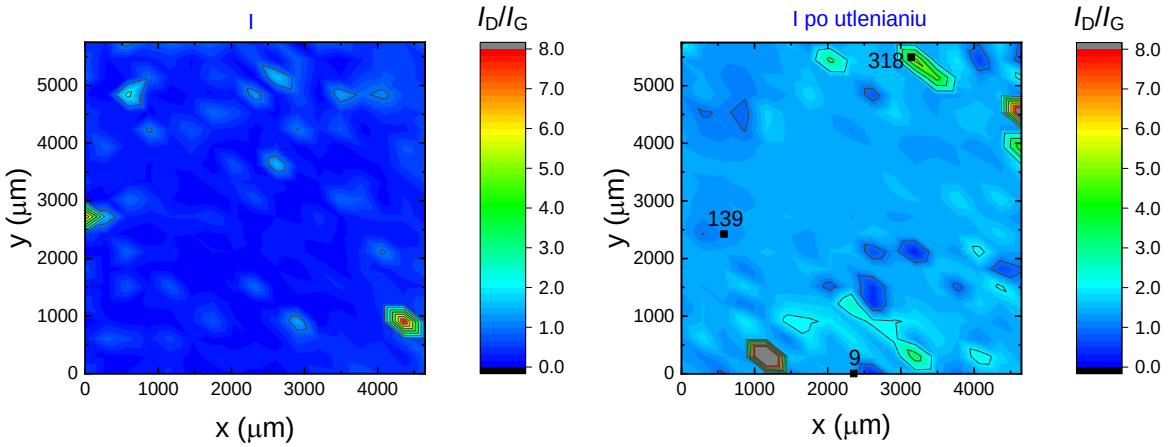


Rys. IV. 144. Schematyczne przedstawienie układu, w którym inkubowano płytkę z warstwą grafenu odłożonego na SiC.

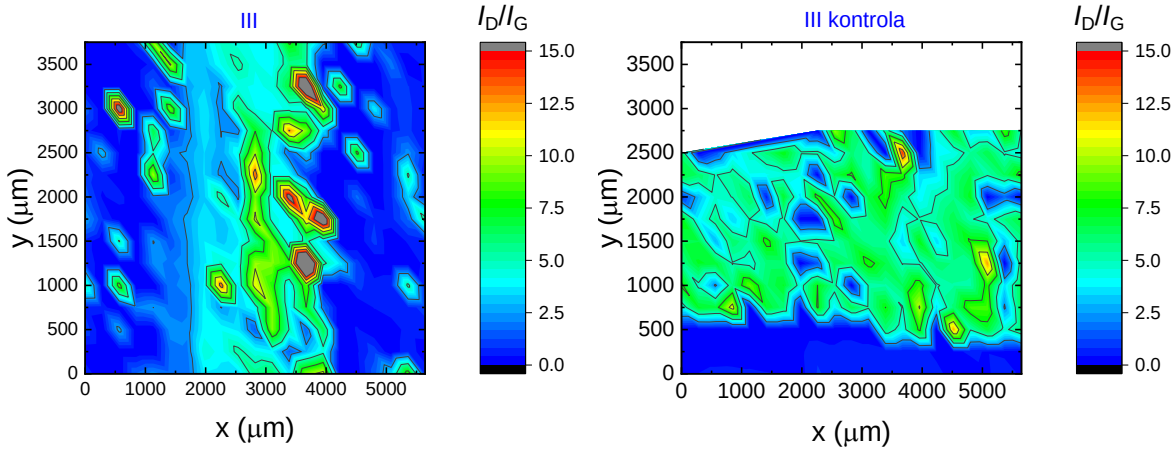
Obydwie płytki zostały scharakteryzowane poprzez rejestrację map ramanowskich z parametrami pomiaru (rozmiar mapy, moc lasera) analogicznymi do map wykonanych przed inkubacją. Wybrane widma ramanowskie, zarejestrowane dla fragmentu I przedstawiono na Rys. IV. 145. Zauważalną zmianą było pojawienie się intensywnego pasma D z maksimum w ok. 1340 cm^{-1} oraz poszerzonego pasma przy ok. 2920 cm^{-1}, które można przypisać obecności wiązań C-H.[322] Świadczy to o pojawieniu się defektów w strukturze grafenu. Ilościowo zmianę tę obrazują wykresy stosunku powierzchni pasma D do G (I_D/I_G; Rys. IV. 146). Przed inkubacją w warunkach utleniających wartości I_D/I_G były niskie gdyż pasmo D było szczątkowe, natomiast po inkubacji wartości znacząco wzrosły, co związane jest obecnością intensywnego pasma D. Z kolej I_D/I_G płytki kontrolnej III zarówno przed, jak i po inkubacji w mieszaninie kwasów, przyjmowały wysokie wartości (Rys. IV. 147). Brak części mapy płytki III po inkubacji wynika z błędu w ustawieniach wymiarów mapy. Ilościowo zmiany rozkładu powierzchni pasm D do G obrazują histogramy przedstawione na Rys. IV. 148. Po inkubacji w warunkach utleniających widoczne jest przesunięcie maksimum histogramu I_D/I_G płytki I w stronę wyższych wartości, co spowodowane jest wzrostem intensywności pasma D (Rys. IV. 148). Natomiast w przypadku płytki III histogram rozkładu I_D/I_G mapy płytki przed procesem oraz po inkubacji w mieszaninie kwasów jest zbliżony (Rys. IV. 148). Oznacza to, że obecność samych kwasów bez utleniacza prowadzi jedynie do niewielkiego wzrostu zdefektowania próbki. Wszystkie te obserwacje uwidaczniają zmiany, jakie zaszły w strukturze warstwy grafenu na skutek inkubacji w warunkach utleniających.



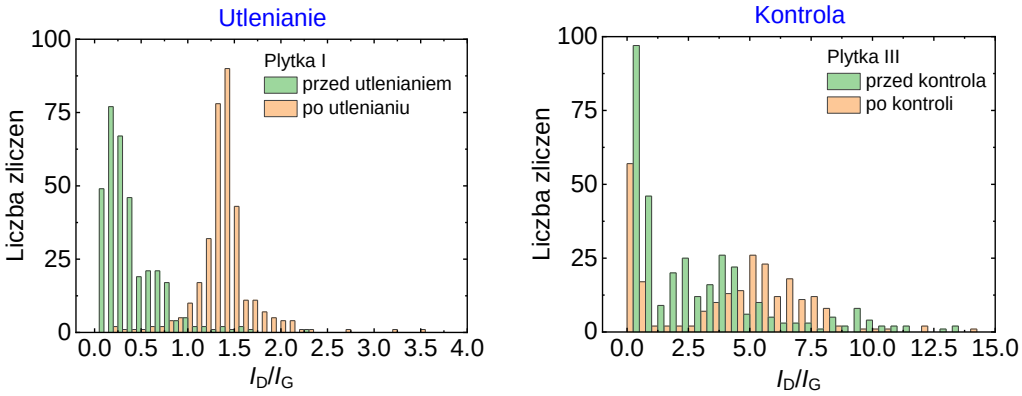
Rys. IV. 145. A) Porównanie wybranych widm ramanowskich płytki 2562 G2C1 I przed oraz po utlenianiu; **B)** Wybrane widma ramanowskie z mapy płytki 2562 G2C1 I po utlenianiu.



Rys. IV. 146. Porównanie stosunków intensywności I_D/I_G dla kolejnych punktów płytki 2562 G2C1 I przed i po procesie utleniania obliczonych z zarejestrowanych widm ramanowskich. Na mapie po utlenianiu zaznaczono numerami widma, zaprezentowane na Rys. IV. 145B.

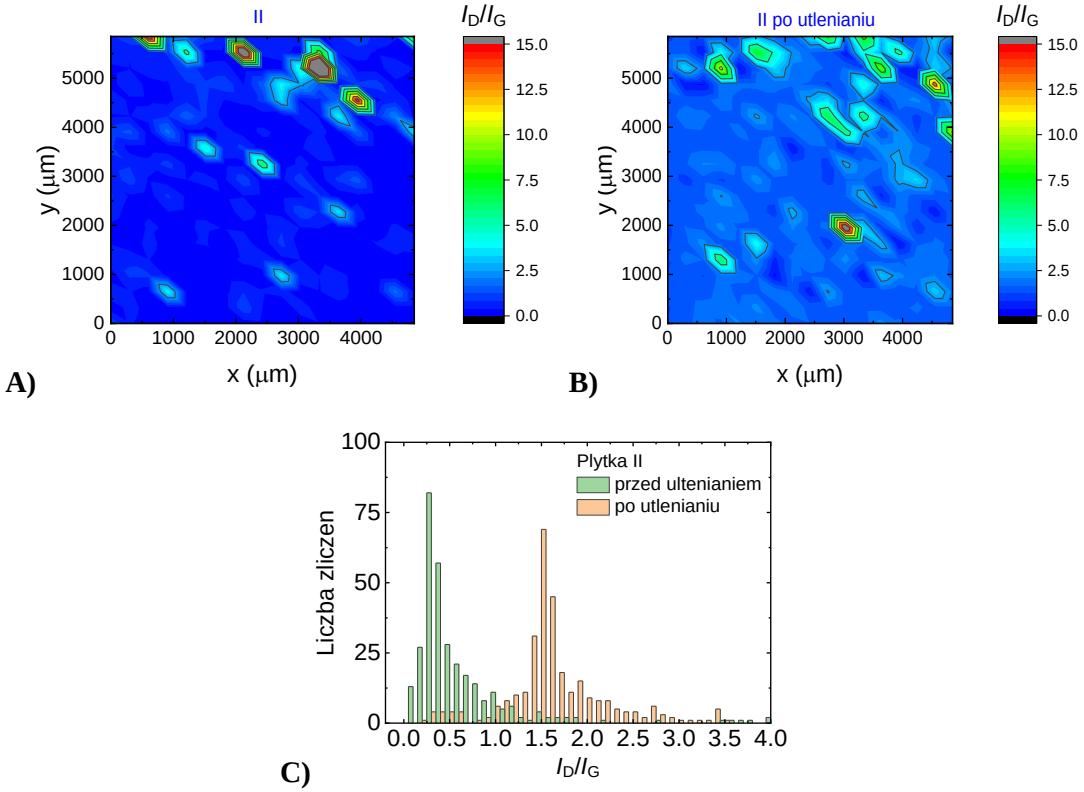


Rys. IV. 147. Porównanie stosunków intensywności I_D/I_G dla kolejnych punktów płytki 2562 G2C1 III (kontrola) przed i po inkubacji w warunkach reakcji bez $KMnO_4$ obliczonych z zarejestrowanych widm ramanowskich.



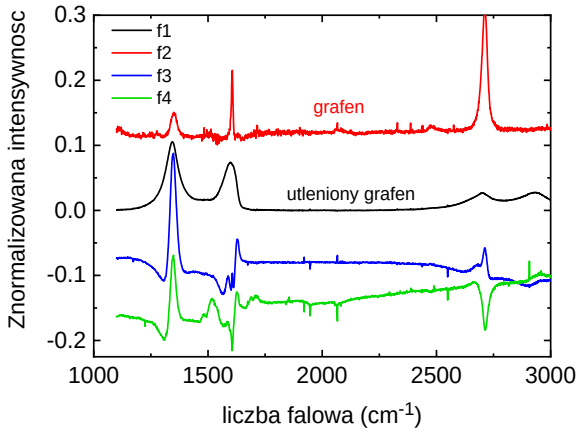
Rys. IV.148. Porównanie histogramów przedstawiających rozkład stosunku powierzchni pasma D do G, obliczonych z kolejnych zarejestrowanych widm ramanowskich płytki 2562 G2C1 I przed i po utlenianiu oraz płytki 2562 G2C1 III przed oraz po procesie kontrolnym (inkubacja w kwasach).

Proces utleniania powtórzono dla części II płytki 2562 G2C1 w tym samych warunkach, jednak z wydłużonym czasem inkubacji z 5 min do 1 h. Po wysuszeniu płytki przeprowadzono pomiar mapy ramanowskiej i porównano do wyników uzyskanych dla niemodyfikowanej płytki II. Wykonano pomiar mapy ramanowskiej płytki II po inkubacji w warunkach utleniających oraz zanalizowano zmiany w wartościach stosunku powierzchni pod pasmem D do G. Podobnie jak w przypadku płytki I wartości I_D/I_G znacznie wzrosły, a maksimum histogramu I_D/I_G przesunęło się w stronę wyższych wartości, co koreluje z pojawieniem się intensywnego pasma D na widmach ramanowskich (Rys. IV. 149).

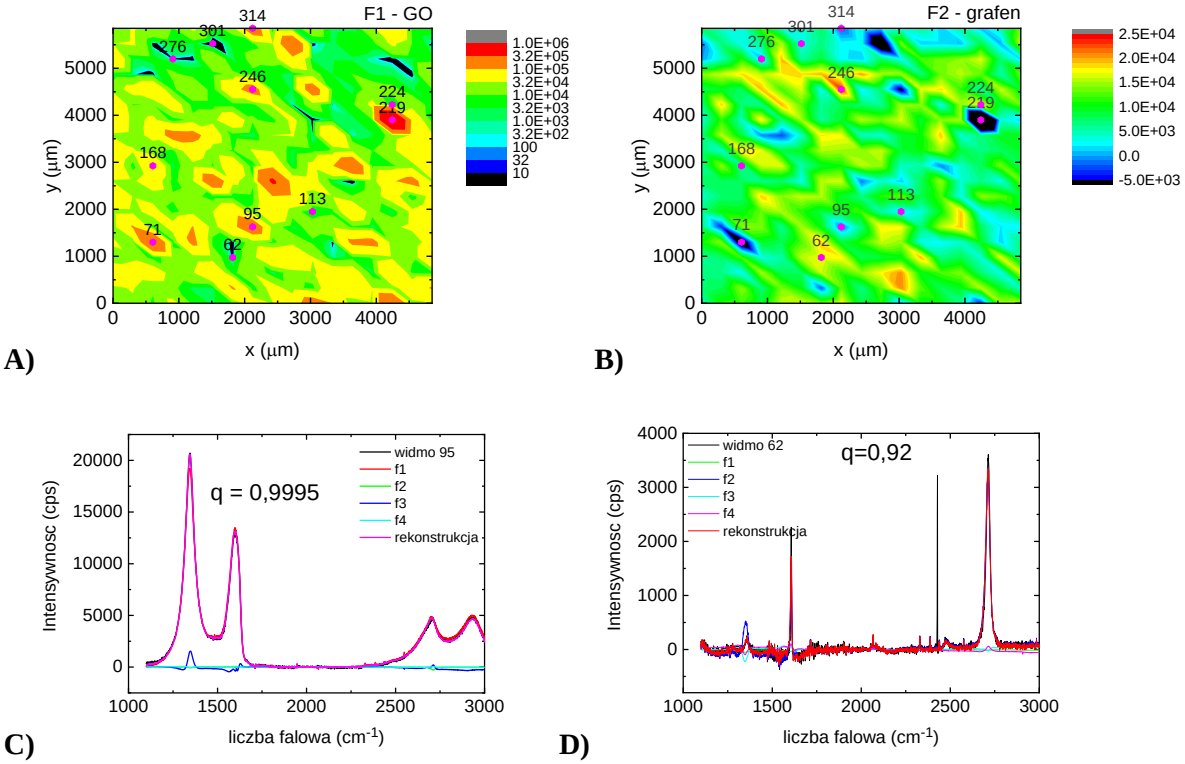


Rys. IV. 149. Porównanie stosunków intensywności I_D/I_G dla kolejnych punktów płytki 2562 G2C1 II **A)** przed i **B)** po procesie utleniania obliczonych z zarejestrowanych widm ramanowskich.; **C)** Porównanie histogramów przedstawiających rozkład stosunku powierzchni pasma D do G, obliczonych z kolejnych zarejestrowanych widm ramanowskich płytki 2562 G2C1 II przed i po utlenianiu.

Dokładną analizę zarejestrowanych map ramanowskich płytki II przed i po inkubacji w warunkach utleniających przeprowadził prof. dr hab. Roman Stępniewski z Zakładu Ciała Stałego Wydziału Fizyki UW, wykonując analizę głównych składowych PCA (ang. *Principal Component Analysis*). Kombinacja liniowa niezależnych od siebie głównych składowych umożliwia rekonstrukcję rejestrowanych widm ramanowskich. Główne składowe są ortogonalne względem siebie i dobrane tak, aby wariancja kolejnych składowych malała. Pierwsza składowa f1 opisuje wybrane widmo utlenionego grafenu GO i ma najwyższą wariancję. Druga składowa f2 odpowiada wybranemu widmu grafenu. Kolejne dwie składowe f3 i f4 reprezentują korekty na przesunięcie maksimów pasm i mają znacznie mniejszy wkład w rekonstrukcję widma (Rys. IV. 150). Analiza PCA wykazała, iż zmiany, które zaszły na powierzchni płytki II po inkubacji w warunkach utleniających nie są jednorodne. Można wyróżnić fragmenty, na których dominuje widmo charakterystyczne dla tlenku grafenu z intensywnym pasmem D oraz fragmenty „grafenowe" (Rys. IV. 151). Zaobserwowano, że intensywności widm GO i grafenu antykorelują ze sobą. W miejscach płytki, w których dominuje widmo GO widmo grafenu jest szczątkowe i odwrotnie.

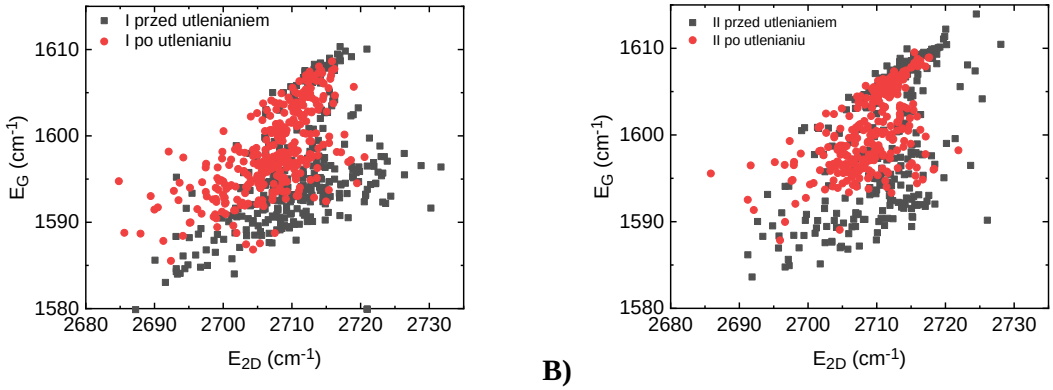


Rys. IV. 150. Główne składowe w analizie PCA mapy ramanowskiej płytki II po inkubacji w warunkach utleniających.



Rys. IV. 151. Wkład składowej GO i grafenu w odtworzenie mapy ramanowskiej płytki II po inkubacji w warunkach utleniających. Parametr q to dokładność rekonstrukcji zawierająca się w przedziale 0 do 1 (idealna rekonstrukcja).

Na podstawie analizy pomiarów map ramanowskich modyfikowanych próbek można stwierdzić, jak zmieniały się jej parametry fizyczne (naprężenia, liczba warstw, koncentracja i ruchliwość nośników). Przesunięcie rozkładu zależności położenia pasma G do 2D w stronę wyższych energii pasma G, co może świadczyć o zmianie koncentracji nośników (Rys. IV. 152).

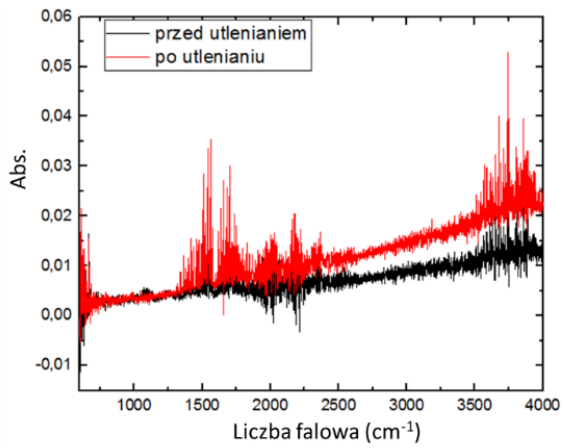


A) **B)**

Rys. IV. 152. Zależność położenia pasma G od pasma 2D na widmie ramanowskim, wyznaczona dla płytki **A)** 2562 G2C1 I i **B)** 2562 G2C1 II przed i po utlenianiu.

Utlenianie nie zachodzi jednorodnie, co powoduje tworzenie się odseparowanych wysp GO – grafen. Taka sytuacja nie jest pożądana w konstrukcji sensora, w którym mierzone byłyby zmiany przepływu prądu elektrycznego wywołane doczepianiem się molekuł. Prąd płynąłby głównie poprzez część grafenową o mniejszym oporze i wpływ zmian w obszarach GO na jego wartość mógłby być niewielki.

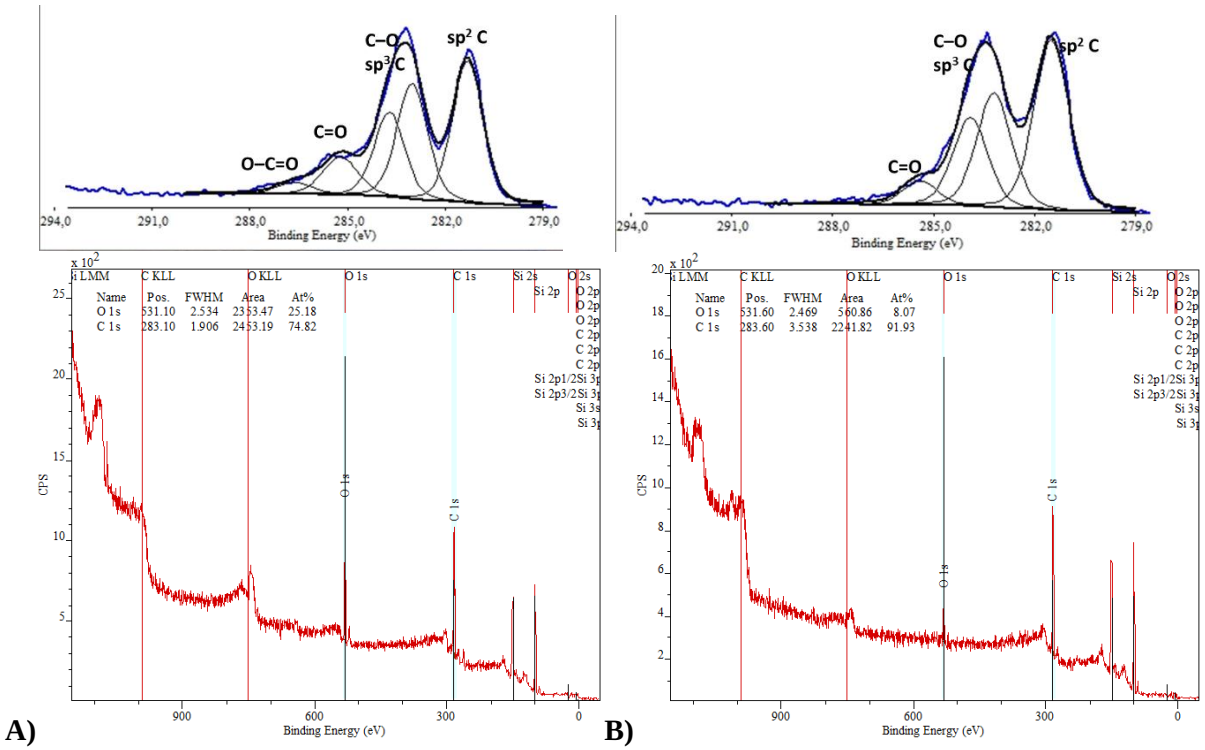
Pomiary ramanowskie nie umożliwiły identyfikacji zmian chemicznych, które zaszły na powierzchni próbki np. pojawienia się nowych grup funkcyjnych, czy też składu pierwiastkowego. Aby scharakteryzować produkt reakcji pod kątem chemicznym podjęto próbę pomiaru widma ATR FTIR powierzchni płytki I przed i po utlenianiu (Rys. IV. 153). Niestety nie udało się zarejestrować informatywnego widma przypuszczalnie ze względu na zbyt dużą warstwę powietrza pomiędzy płytką, a kryształem przystawki ATR.



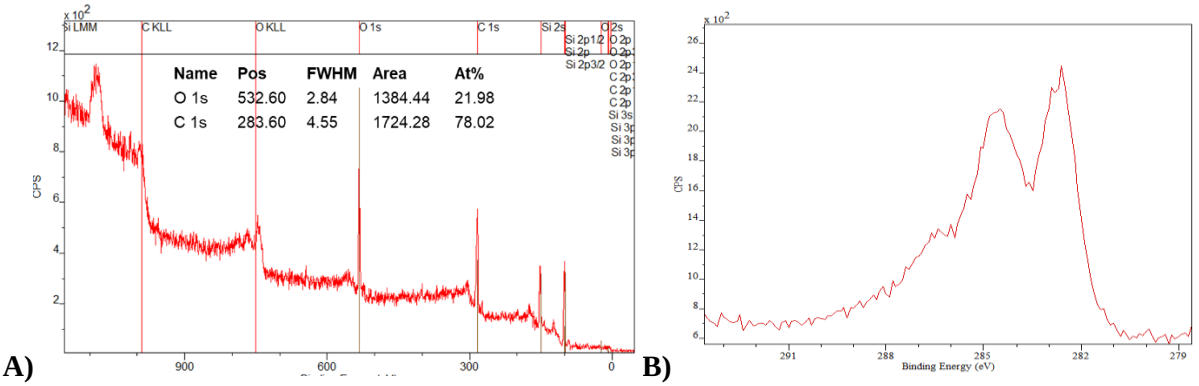
Rys. IV. 153. Widma ATR FTIR płytki 2562 G2C1 I przed i po utlenianiu.

W kolejnym podejściu zastosowano technikę XPS w celu identyfikacji produktu reakcji. Badania wykonał dr Igor Własny, korzystając z aparatury na Uniwersytecie Łódzkim. Na obydwu widmach XPS widoczne są sygnały tlenu, krzemu (podłoże SiC) oraz węgla (grafen plus podłoże SiC). Widmo XPS płytki I po inkubacji w warunkach utleniających posiada bardziej intensywną linię tlenu w porównaniu do kontroli – płytki III. Ponadto kształt sygnału węglowego

także wskazuje na zwiększenie ilości wiązań węgla z tlenem C-O, C=O oraz O-C=O (Rys. IV. 154). Sygnał węglowy jest w tym przypadku trudny do zinterpretowania, gdyż mierzona jest także warstwa buforowa oraz węgle z SiC. Trudno jest, zatem całkowicie odseparować sygnał pochodzący od wiązań węgiel tlen (ok. 284 eV) od węgli sp^3, jednak z całą pewnością intensywność tego sygnału zwiększa się w porównaniu do próbki kontrolnej. Analogiczne zmiany zaobserwowano także na widmie XPS płytki II po inkubacji w warunkach utleniających (Rys. IV. 155). Procentowy skład pierwiastkowy zestawiono w Tabeli IV. 39. Zawartość tlenu po inkubacji płytki I wynosi 25%, natomiast kontroli III 8%. W przypadku płytki II po utlenianiu zawartość tlenu wyniosła 23%, co oznacza, że długość czasu inkubacji (5 min i 1 h) nie miała wpływu na zajście reakcji. Widma XPS ostatecznie potwierdziły zajście utlenienia warstwy grafenowej odłożonej na SiC, natomiast analiza map ramanowskich wykazała, że modyfikacja ta nie zachodzi równomiernie na całej powierzchni płytki.



Rys. IV. 154. Widmo XPS płytki **A)** 2562 G2C1 I po utlenianiu i **B)** kontroli utleniania 2562 G2C1 III. Górne panele przedstawiają zbliżenie na linię węgla C1s wraz z dopasowanymi pasmami składowymi.



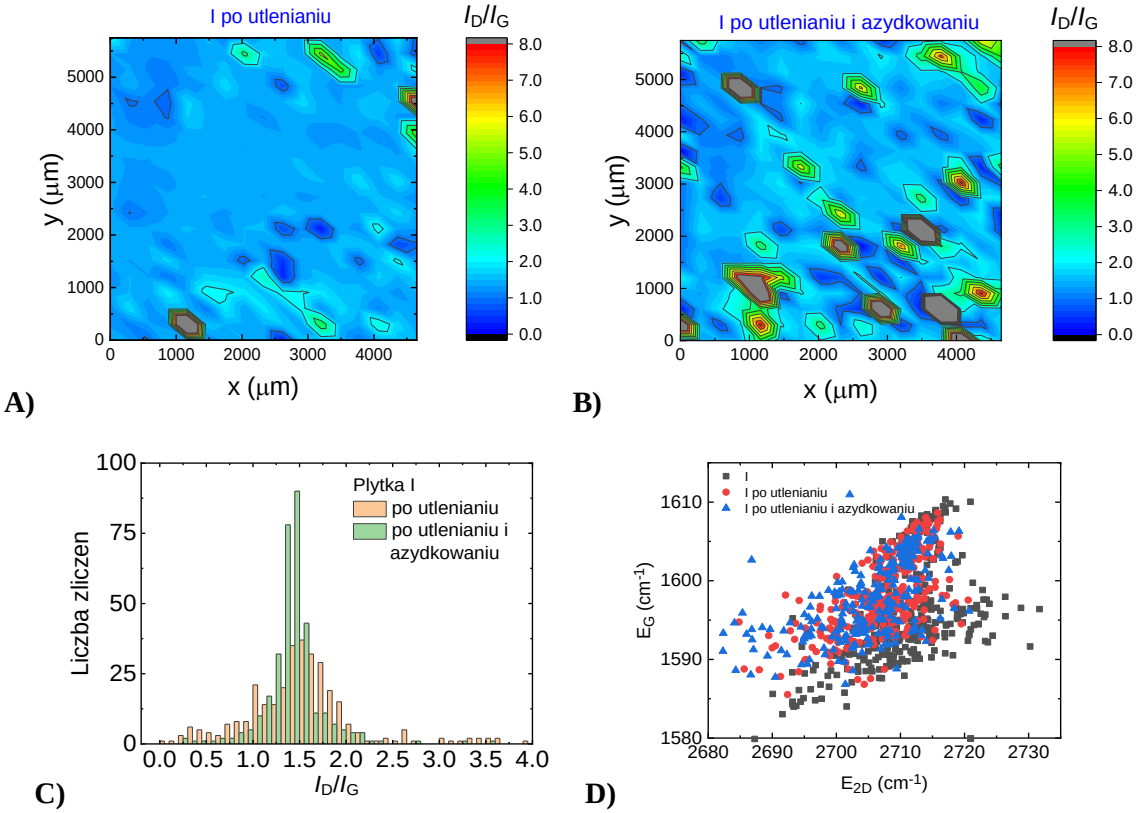
Rys. IV. 155. A) Widmo XPS płytki 2562 G2C1 II po utlenianiu; **B)** Zbliżenie na linię węgla C1s.

Tabela IV.39. Zestawienie zawartości procentowej tlenu i węgla w badanych próbkach. Wartości wyznaczono na podstawie analizy widm XPS.

Próbka	O (%)	C (%)
I utleniana	25	75
II utleniana	22	78
III kontrola	8	92

IV.11.3. Modyfikacje monowarstwy grafenu grupą azydkową

Kolejny etap modyfikacji zakładał wprowadzenie ortogonalnej grupy funkcyjnej umożliwiającej wydajne przyłączenie analogu kapu. Wykorzystano w tym celu reakcję azydkowania na podstawie pracy Eigler et al. 2013.[324] Płytkę 2562 G2C1 I po utlenianiu umieszczono w szklanym naczyniu w wodzie, a następnie dodano azydek sodu NaN_3. Płytkę inkubowano w temperaturze 30°C przez 1 h z prędkością obrotową mieszania 300 rpm. Po godzinie płytkę przemyto wielokrotnie wodą, a po wysuszeniu wykonano pomiar mapy ramanowskiej. Wygląd widm ramanowskich nie uległ znaczącej zmianie – nadal stosunek powierzchni pod pasmem D do G jest wysoki (Rys. IV. 156A–B), a histogram rozkładu I_D/I_G ma podobny przebieg (Rys. IV. 156C). Także zależność położenia pasma G i 2D przed i po procesie azydkowania wyglądają podobnie (Rys. IV.156D). Wszystkie te obserwacje prowadzą do wniosku, że parametry fizyczne warstw grafenowych nie zmieniły się na skutek inkubacji płytki z NaN_3.

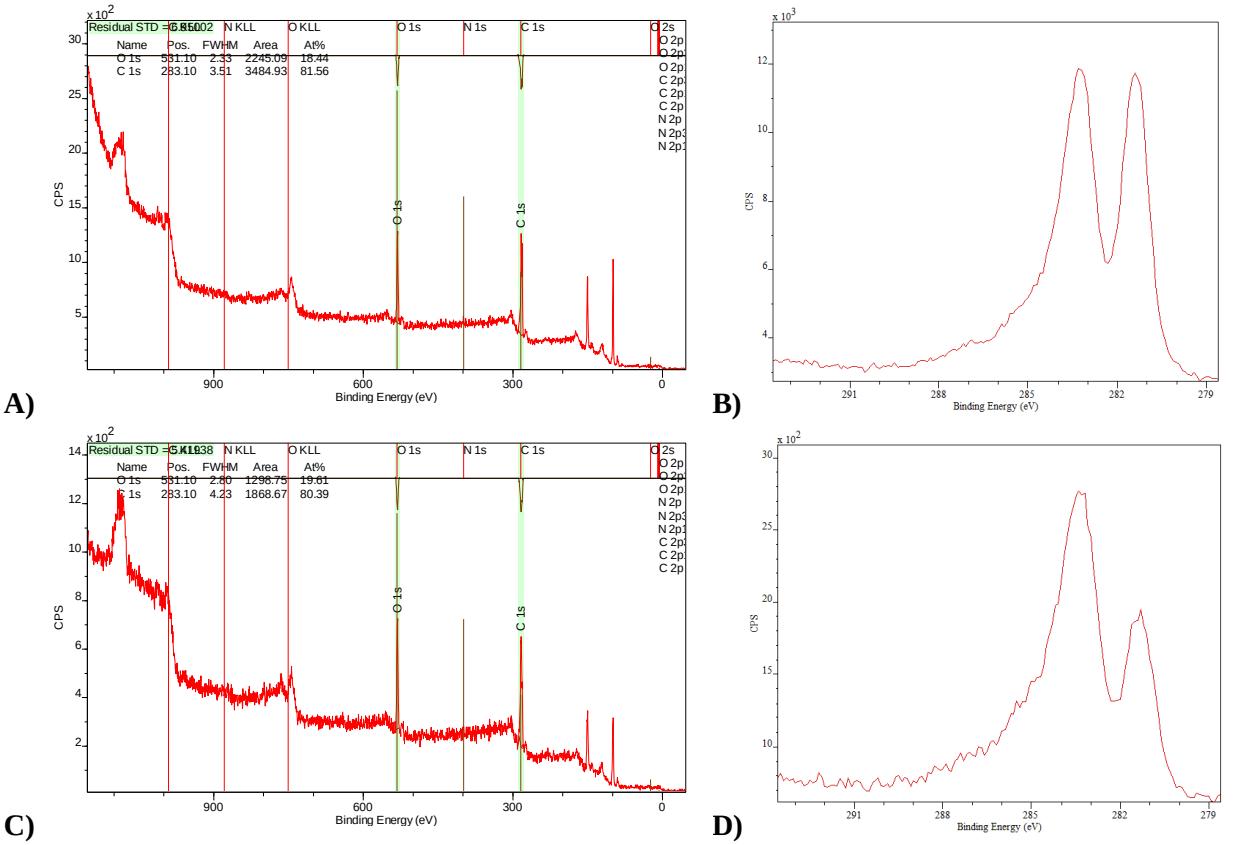


Rys. IV. 156. Porównanie stosunku powierzchni pod pasmem D do powierzchni pod pasmem G dla kolejnych punktów płytki 2562 G2C1 I po utlenianiu oraz **A)** przed i **B)** po procesie azydkowania obliczone z zarejestrowanych widm ramanowskich.; **C)** Porównanie histogramów przedstawiających rozkład stosunku intensywności I_D/I_G, obliczonych dla kolejnych zarejestrowanych widm ramanowskich płytki 2562 G2C1 I przed i po azydkowaniu; **D)** Zależność położenia pasma G od pasma 2D na widmie ramanowskim, wyznaczona dla płytki 2562 G2C1 I przed utlenianiem, po utlenianiu oraz po utlenianiu i azydkowaniu.

W celu zweryfikowania czy reakcja chemiczna zaszła prawidłowo zanalizowano widmo XPS fragmentu płytki I po utlenianiu i azydkowaniu, wykonane przez dr Igora Własnego na Uniwersytecie Łódzkim (Rys. IV. 157A–B). Płytkę ponownie inkubowano w szklanym naczyniu w wodnym roztworze NaN_3, tym razem przez 12 h. Niestety na widmie XPS wysuszonej płytki także nie pojawia się pasmo azotu (Rys. 157C–D). Procentowy skład pierwiastkowy zestawiono w Tabeli IV. 40.

Tabela IV.40. Zestawienie zawartości procentowej tlenu, węgla i azotu w badanych próbkach. Wartości wyznaczono na podstawie analizy widm XPS.

Próbka	O (%)	C (%)	N (%)
I utleniana	25	75	0
I azydkowana 1h	18	82	0
I azydkowana 12 h	20	80	0



Rys. IV. 157. Widmo XPS płytki 2562 G2C1 I po **A)** 1 h oraz **C)** 12 h azydkowania; Panele **B)** i **D)** prezentują zbliżenia linii węgla C1s z widm XPS po 1 h i 12 h azydkowania.

IV.11.4. Podsumowanie

W celu opracowania biosensora do oznaczania stężenia białek oddziałujących z kapem poprzez zmiany parametrów elektrycznych wykonano następujące czynności:

- Scharakteryzowano monowarstwę grafenu odłożoną na SiC poprzez wykonanie map ramanowskich w całości oraz po przecięciu na cztery części. Nie zaobserwowano znaczących zmian na widmie grafenu z widocznie dominującym pasmem G oraz niską intensywnością pasma defektowego D;
- Przeprowadzono utlenianie płytki I oraz II w reakcji trwającej odpowiednio 5 i 60 minut. Jako kontrolę tymi samymi warunkami potraktowano płytkę III bez dodatku utleniacza;

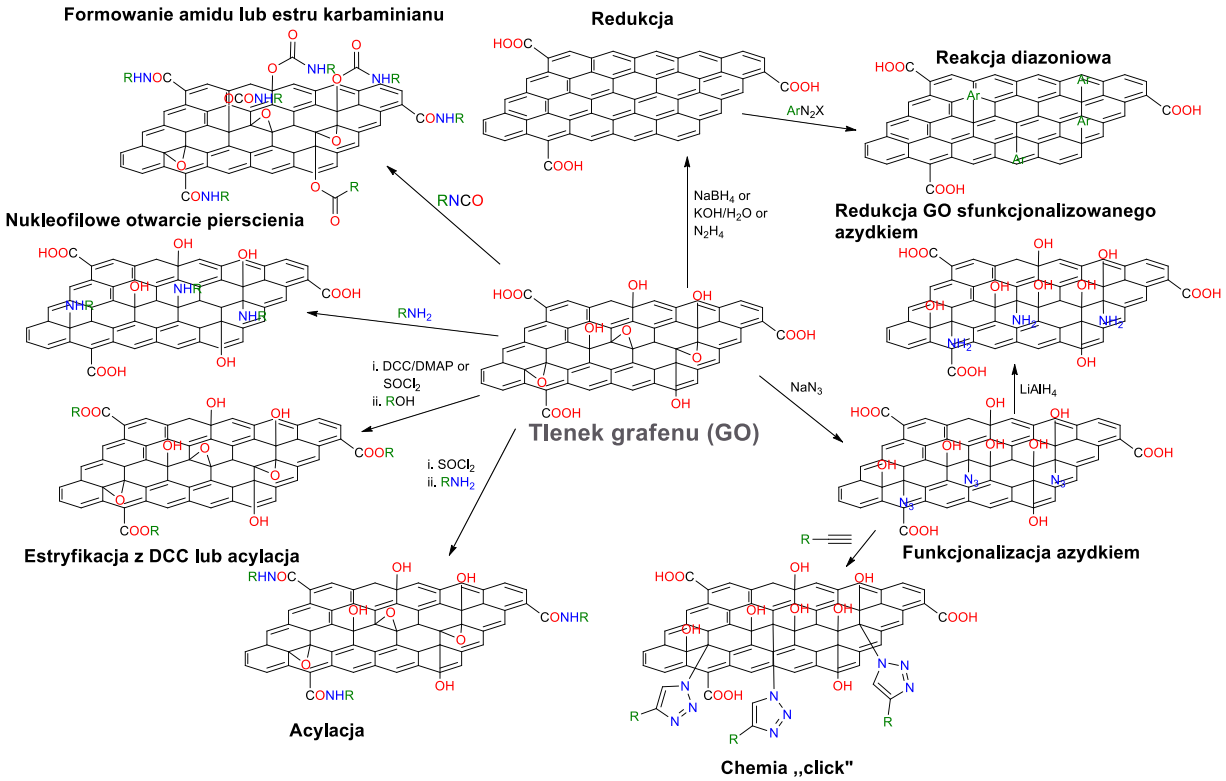
- Płytki I i II zostały z powodzeniem utlenione, co spowodowało zwiększenie intensywności pasma D na widmie ramanowskim oraz pojawieniem się sygnału tlenu na widmie XPS świadczącym o obecności wiązań węgiel–tlen;
- Podjęto próbę dalszej modyfikacji płytki I grupą azydkową jednak pomiar XPS nie potwierdził obecności azotu.

Utlenianie płytki spowodowało ponadto wzrost oporności (drastycznie zmniejszenie przewodności) elektrycznej, co bardzo utrudnia albo praktycznie uniemożliwia zastosowanie tego podejścia do opracowania układu przeznaczonego do oznaczania stężenia białek wiążących kap. Problem ten mogłoby rozwiązać zastąpienie modyfikowanej monowarstwy grafenu dwuwarstwą (Rys. IV. 138ii), jednak trudności z dalszą modyfikacją grupami azydkowymi pozostają. W toku badań zdecydowano skupić się na podejściu polegającym na zaprojektowaniu tranzystora GaN z osadzonym na powierzchni koniugatem grafenu z nukleotydem (Rys. IV 138iii).

IV.12. Synteza koniugatów grafenu z nukleotydami

Modyfikacje chemiczne warstwy grafenu odłożonej na podłożu SiC są trudne w kontrolowaniu oraz zachodzą niejednorodnie w różnych miejscach płytki. Z tego względu w kolejnym podejściu otrzymano serię modyfikowanych analogów grafenu w formie proszku, a ostatecznie także dwa koniugaty z nukleotydami m^7GTP i GTP. W założeniu koniugat następnie ma zostać osadzony na powierzchni tranzystora AlGaN/GaN z dwuwymiarowym gazem elektronowym (Rys. IV. 138iii).

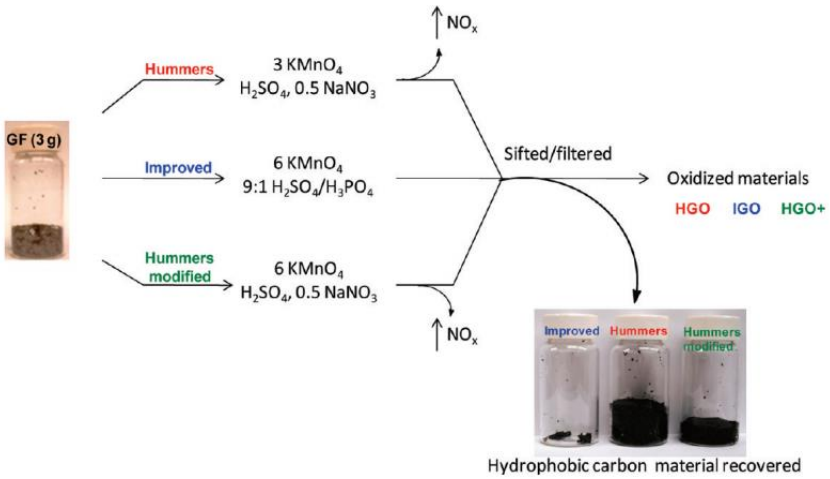
Najbardziej dogodnym podejściem modyfikacji grafenu jest jego utlenienie. Wprowadzone w ten sposób grupy funkcyjne umożliwiają dalsze modyfikacje (Rys. IV 158).



Rys. IV. 158. Wybrane modyfikacje chemiczne utlenionego grafenu GO. Rysunek zaczerpnięty z Loh, et al. 2010.[325]

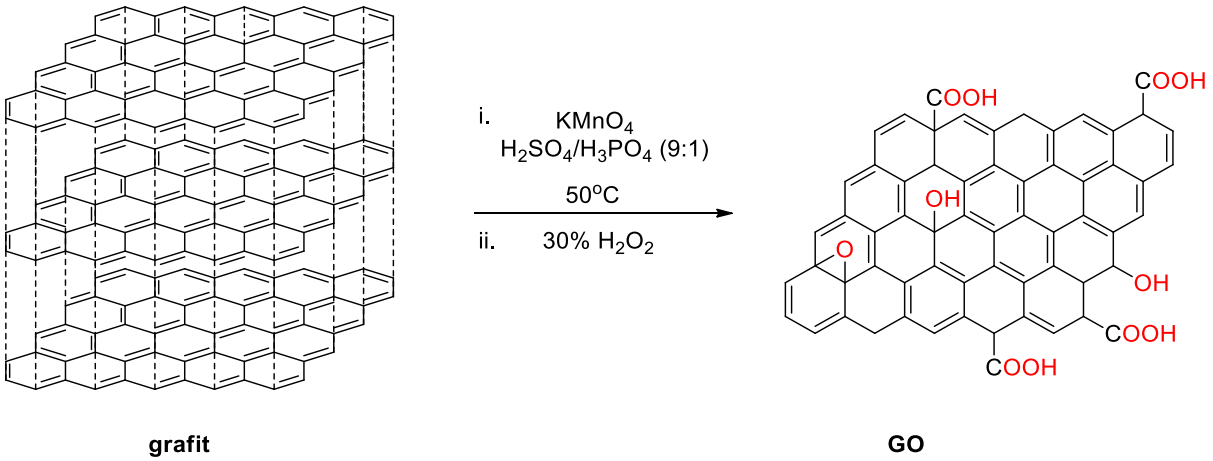
IV.12.1. Synteza tlenku grafenu (GO)

W literaturze opisanych jest wiele sposobów utleniania grafitu. Jedną z najbardziej popularnych metod jest metoda Hummersa, w której grafit utleniany jest w środowisku silnych kwasów w obecności nadmanganianu potasu ($KMnO_4$), jako utleniacza. W niniejszej pracy tlenek grafenu (GO) otrzymano z grafitu stosując ulepszoną metodę Hummersa.[323] W podejściu tym grafit zawieszany jest w mieszaninie kwasu siarkowego (H_2SO_4) oraz fosforowego (H_3PO_4) w stosunku objętościowym 9:1. Ulepszenie metody polega na nie stosowaniu kwasu azotowego (HNO_3) oraz soli azotanowych, dzięki czemu w trakcie reakcji nie powstają toksyczne tlenki azotu (Rys. IV. 159).



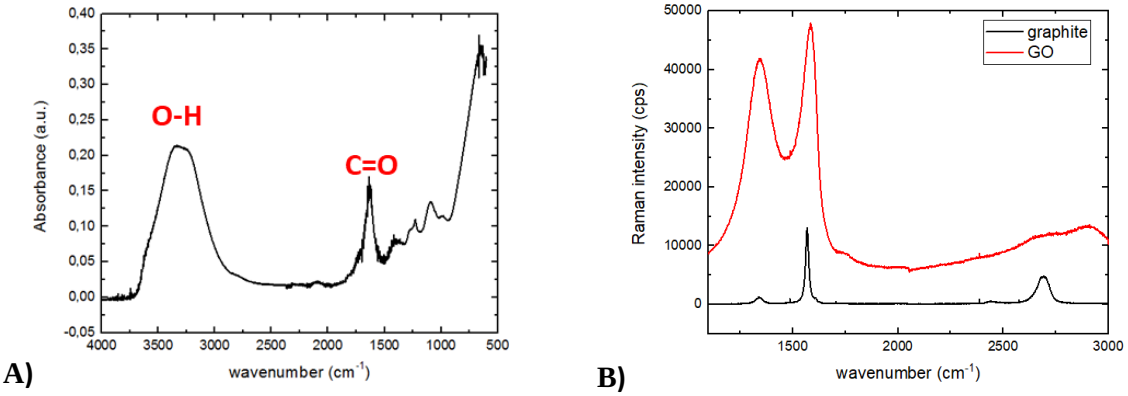
Rys. IV. 159. Porównanie procedur syntezy tlenku grafenu (GO) z grafitu. Rysunek zaczerpnięto z pracy Marcano et al. 2010.[323]

Zgodnie z procedurą grafit w postaci proszku zawieszono w mieszaninie kwasów, a następnie powoli, porcjami dodawano nadmanganian potasu. Mieszaninę inkubowano przez noc w temperaturze 50°C pod chłodnicą zwrotną (Rys. IV. 160). Reakcję zakończono dodając 30% roztwór H_2O_2, a osad odwirowano i przemyto wielokrotnie wodą do pH 7 zawiesiny wodnej. W kolejnym etapie w celu usunięcia nadmiaru soli przeprowadzono dializę otrzymanego produktu. W tym celu wykonano dializę poprzez zawieszenie produktu w wodzie, przeniesienie mieszaniny do woreczka do dializy, który następnie umieszczono w dużym naczyniu z wodą (trzykrotnie wymienianą). Po odwirowaniu osadu, przemyciu kilkukrotnie wodą oraz wysuszeniu otrzymano produkt w postaci brązowego proszku.

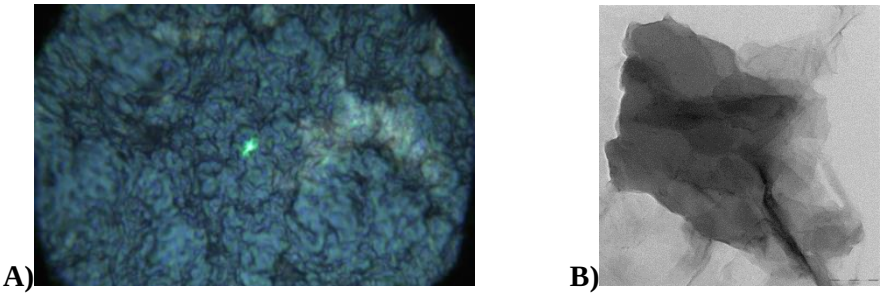


Rys. IV. 160. Schemat syntezy tlenku grafenu (GO) z grafitu w ulepszonej metodzie Hummersa.[323]

Uzyskany proszek scharakteryzowano poprzez wykonanie widm FTIR oraz ramanowskiego. Obydwa widma potwierdziły powstanie tlenku grafenu (GO) na skutek przeprowadzonej reakcji. Na widmie FTIR obecne są charakterystyczne pasma odpowiadające drganiom rozciągającym O-H (3000–3500 cm^{-1}) oraz rozciągającym C=O (1600–1700 cm^{-1}; Rys. IV. 161A). Z kolei pasma D (~1600 cm^{-1}) i G (~1350 cm^{-1}) widoczne na widmie ramanowskim (Rys. IV. 161B) wskazują na pojawienie się defektów w warstwach grafenu. Zgodnie z literaturą zsyntetyzowany w ten sposób GO powinien zawierać w swojej strukturze grupy hydroksylowe i epoksydowe, a także karboksylowe umiejscowione na brzegach płatka. Dodatkowo wykonano zdjęcia otrzymanego GO z użyciem mikroskopu optycznego z powiększeniem 50 x (Rys. IV. 162A) oraz mikroskopu TEM (Rys. IV. 162B). Analiza zdjęć TEM wykazała, że uzyskany GO ma postać nieregularnych płatków o rozmiarach rzędu 1 µm.



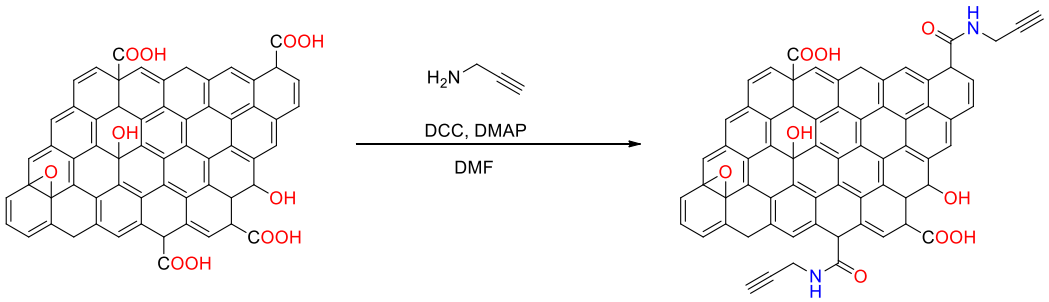
Rys. IV. 161. A) Widmo FTIR tlenku grafenu (GO); **B)** widma ramanowskie grafitu oraz GO.



Rys. IV. 162. Zdjęcie powierzchni GO, wykonane mikroskopem: **A)** optycznym z powiększeniem 50 x oraz **B)** TEM.

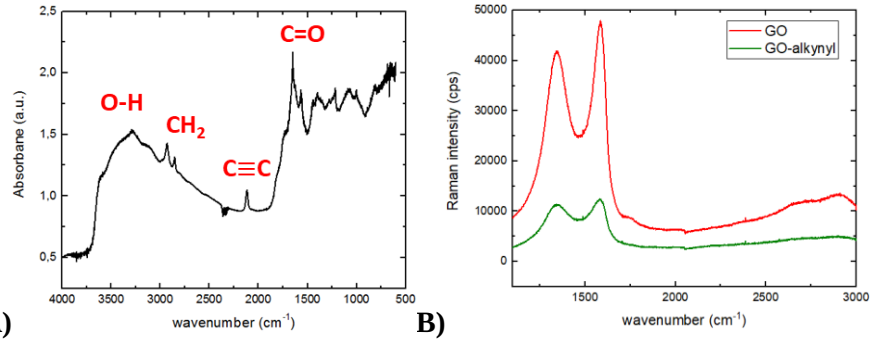
IV.12.2. Synteza GO modyfikowanego grupą alkinową (GO-alkynyl), azydkową wewnątrz (GO-N_3) oraz na krawędzi (GOpN_3)

Tlenek grafenu otrzymany w zmodyfikowanej reakcji Hummersa poddano następnie trzem różnym modyfikacjom, mającym na celu ostatecznie przyłączenie analogu kapu. W pierwszej modyfikacji do struktury GO wprowadzono grupę alkinową stosując modyfikację grup karboksylowych, znajdujących się na brzegach płatka (GO-alkynyl). Wykorzystano w tym celu metodologię literaturową,[281] w której tlenek grafenu modyfikowano propargiloaminą w reakcji amidacji/estryfikacji Steglicha z użyciem DCC (dicyklokarbodiimid – odczynnik sprzęgający) oraz DMAP (4-dimetyloaminopirydyna – katalizator). Reakcję przeprowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym na Rys. IV. 163.



Rys. IV. 163 Schemat reakcji modyfikacji tlenku grafenu GO na brzegach płatka (GO-alkynyl).[281]

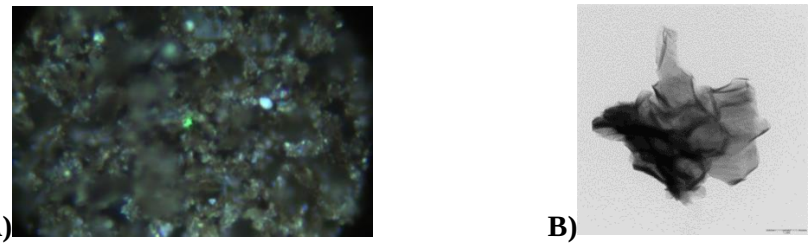
Otrzymany proszek scharakteryzowano poprzez wykonanie widm FTIR oraz ramanowskich. Na widmie IR (Rys. IV. 164A) pojawiają się nowe sygnały odpowiadające drganiom rozciągającym grupy metylenowej –CH_2– (2845 cm^{-1} i 2935 cm^{-1}) oraz drganiom rozciągającym grupy alkinowej –C≡C– (2120 cm^{-1}), pochodzące od przyłączonej propargiloaminy. W tym przypadku widmo ramanowskie nie jest informatywne gdyż kształt oraz położenie pasm są analogiczne do substratu – tlenku grafenu (Rys. IV. 164B).



A) **B)**

Rys. IV. 164. A) Widmo FTIR GO modyfikowanego grupą alkinową (GO-alkynyl); **B)** widma ramanowskie GO oraz GO-alkynyl.

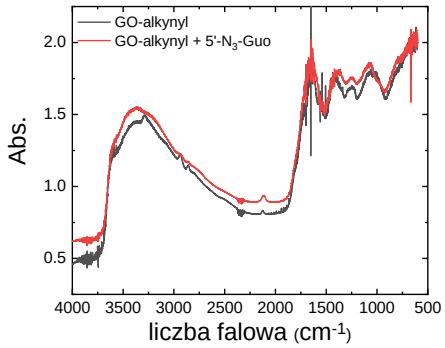
Dodatkową charakterystykę wykonano poprzez wykonanie zdjęć otrzymanego GO-alkynyl z użyciem mikroskopu optycznego z powiększeniem 50 x (Rys. IV. 165A) oraz mikroskopu TEM (Rys. IV. 165B). Analiza zdjęć TEM wykazała, że uzyskany GO-alkynyl ma postać nieregularnych płatków o rozmiarach rzędu 1 μm.



A) **B)**

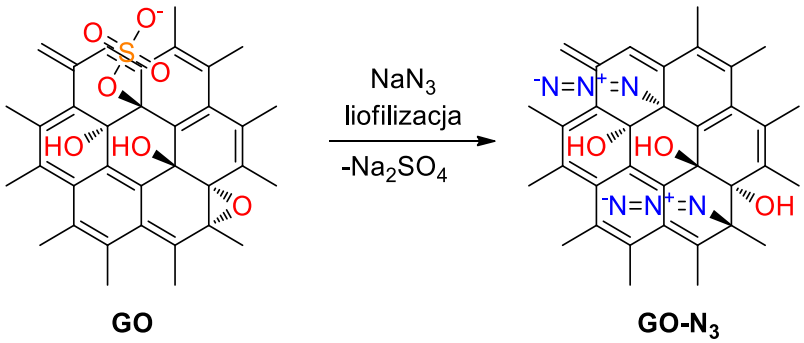
Rys. IV. 165. Zdjęcie powierzchni GO-alkynyl, wykonane mikroskopem: **A)** optycznym z powiększeniem 50 x oraz **B)** TEM.

W kolejnym etapie podjęto próbę przyłączenia testowego nukleozydu – 5'-N_3-guanozyny, z GO-alkynyl w reakcji CuAAC. W tym celu otrzymany GO-alkynyl zawieszono w DMF i poddano sonikacji, po której dodano 5'-N_3-guanozynę, siarczan miedzi (I) oraz askorbinian sodu. Po zakończeniu reakcji uzyskany proszek scharakteryzowano poprzez wykonanie widma FTIR (Rys. IV. 166). Pozytywny przebieg reakcji CuAAC może potwierdzić zanik pasma –C≡C– przy 2120 cm^{-1}. Jednak po reakcji pasmo nadal było widoczne, co oznacza, że reakcja nie zaszła całkowicie lub nie zaszła w ogóle. Wadą wykorzystania pasma drgań grupy alkinowej jest jego niska intensywność, co dodatkowo utrudnia monitorowanie reakcji.



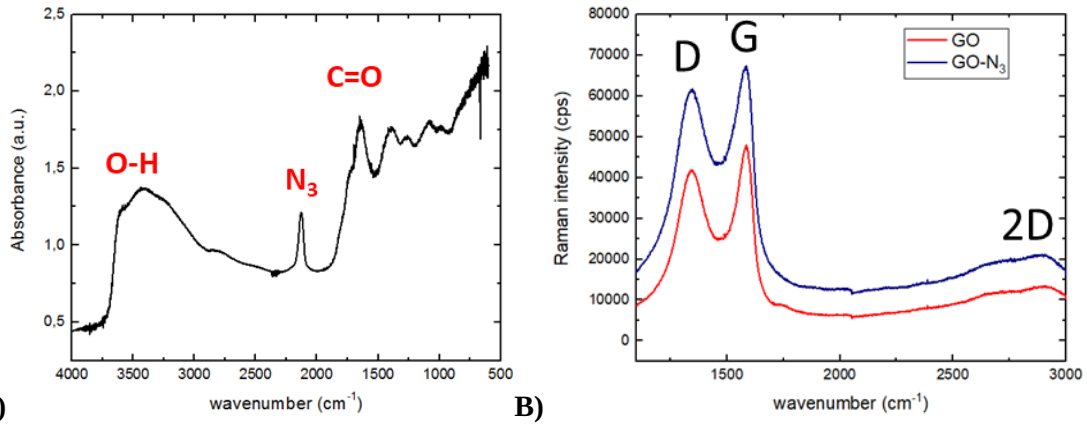
Rys. IV. 166. Widmo FTIR GO-alkynyl oraz GO-alkynyl po reakcji CuAAC z 5'-N_3-guanozyną.

Kolejną testowaną modyfikacją grafenu było przyłączenie grupy azydkowej na powierzchni płatka. Wykorzystano w tym celu procedurę literaturową, w której grupa azydkowa wprowadzana była w reakcji substytucji nukleofilowej grup organosiarczanowych oraz przypuszczalnie epoksydowych (Rys. IV. 167).[324] Grupy organosiarczanowe powstają w syntezie tlenku grafenu metodami Hummersa na skutek stosowania kwasu siarkowego.[326]



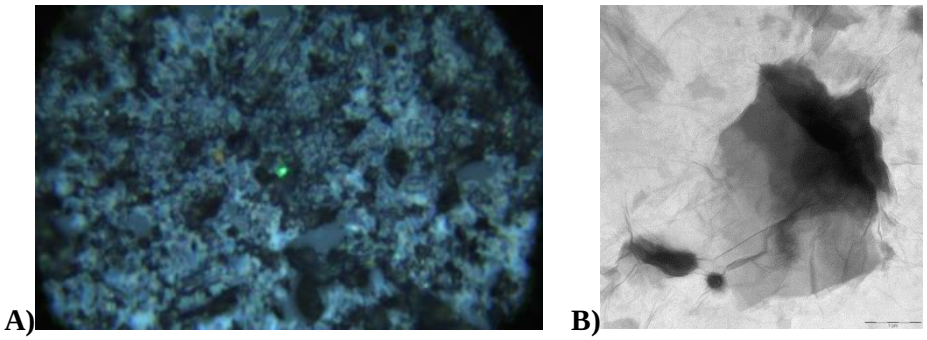
Rys. IV. 167. Schemat syntezy GO modyfikowanego grupą azydkową (GO-N_3).[324]

Tlenek grafenu zawieszono w wodzie, sonikowano, a następnie schłodzono do 10°C, po czym dodano azydek sodu. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną poddano liofilizacji, a następnie przemyto kilkukrotnie wodą, w wyniku, czego uzyskano produkt w postaci czarnego proszku. Produkt reakcji scharakteryzowano poprzez pomiar widm FTIR i ramanowskiego. W wyniku reakcji na widmie FTIR (Rys. IV. 168A) pojawia się intensywne pasmo drgań rozciągających grupy azydkowej $-N_3$ (2128 cm^{-1}). Podobnie, jak w przypadku GO-alkynyl widmo ramanowskie nie jest informatywne gdyż kształt oraz położenie pasm jest analogiczne do substratu – utlenionego grafenu (Rys. IV. 168B).



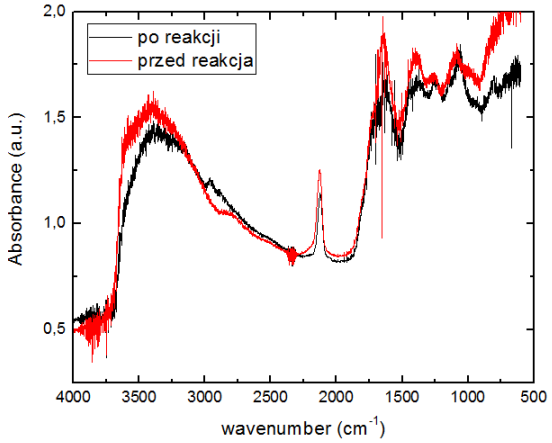
Rys. IV. 168. A) Widmo FTIR GO-N_3; **B)** widma ramanowskie GO i GO-N_3.

Dodatkową charakterystykę wykonano poprzez zarejestrowanie zdjęć otrzymanego GO-N_3 z użyciem mikroskopu optycznego z powiększeniem 50 x (Rys. IV. 169A) oraz mikroskopu TEM (Rys. IV. 169B). Analiza zdjęć TEM wykazała, że uzyskany GO-N_3 ma postać nieregularnych płatków o rozmiarach rzędu 1 μm.



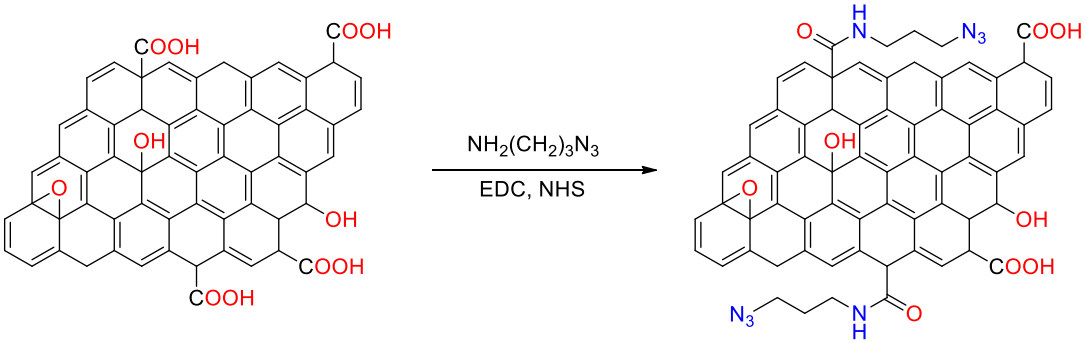
Rys. IV. 169. Zdjęcie powierzchni GO-N_3, wykonane mikroskopem **A)** optycznym z powiększeniem 50 x oraz **B)** TEM.

Następnie podjęto próbę przyłączenia mononukleotydowego analogu kapu zawierającego terminalny 3-butynylo-*C*-fosfonian $m^7Gp_3C_4H_5$ (**A2**). Otrzymany GO-N_3 zawieszono w wodzie, dodano nukleotyd $m^7Gp_3C_4H_5$, a następnie siarczan miedzi (I) oraz askorbinian sodu inkubowane uprzednio z ligandem THPTA. W celu scharakteryzowania produktu reakcji zarejestrowano widmo FTIR otrzymanego proszku. Także w tym przypadku nie zaobserwowano zaniku pasma azydkowego, wynikającego z zajścia reakcji CuAAC i utworzenia pierścienia triazolowego (Rys. IV. 180).



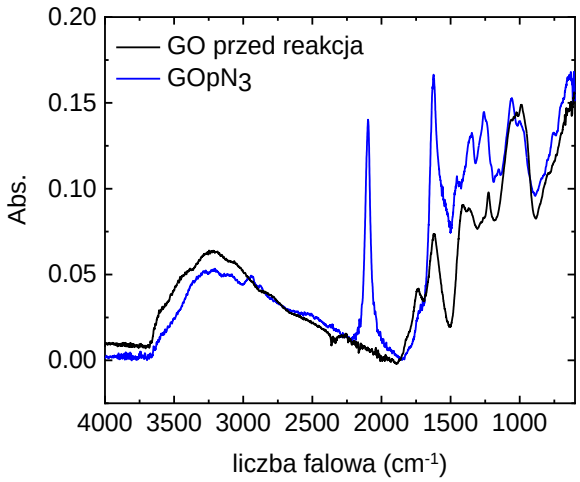
Rys. IV. 180. Widma FTIR GO-N_3 oraz GO-N_3 po reakcji CuAAC z $m^7Gp_3C_4H_5$.

Ostatnią testowaną modyfikacją tlenku grafenu było przeprowadzenie reakcji NHS brzegowych grup karboksylowych z 3-azydopropano-1-aminą w celu wprowadzenia grupy azydkowej. Reakcję przeprowadzono zgodnie z procedurą literaturową (Rys. IV. 181).[271]



Rys. IV. 181. Schemat reakcji GO modyfikowanego 3-azydopropano-1-aminą na brzegach płatka.[271]

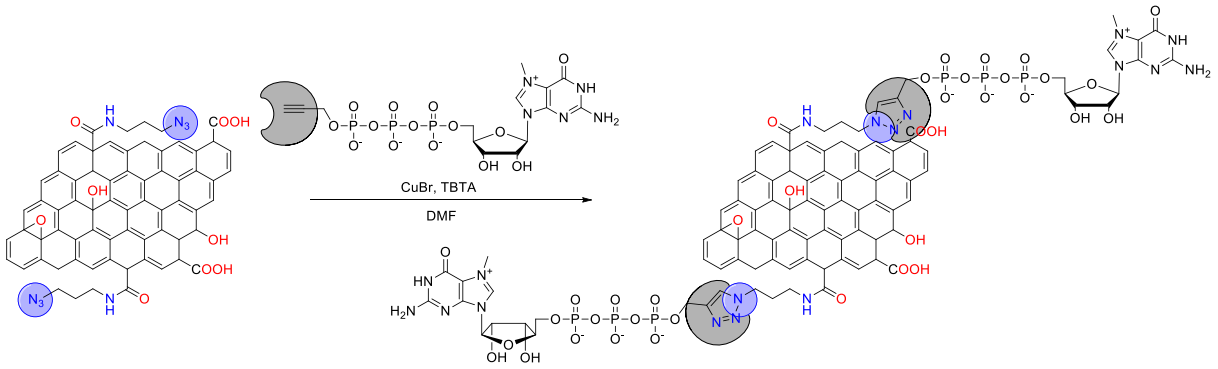
Tlenek grafenu zawieszono w wodzie, a następnie dodano 3-azydopropano-1-aminę, EDC oraz NHS (odczynniki sprzęgające). Po zakończeniu reakcji uzyskano proszek, który następnie scharakteryzowano poprzez rejestrację widm FTIR (Rys. IV. 182). Reakcja przebiegła prawidłowo, co potwierdza pojawienie się silnego pasma odpowiadającego drganiom rozciągającym grupy azydkowej (2096 cm^{-1}).



Rys. IV. 182. Widma FTIR GO przed reakcją oraz po modyfikacji brzegowych grup karboksylowych propargiloaminą ($GOpN_3$).

IV.12.3. Przyłączenie nukleotydu w reakcji CuAAC

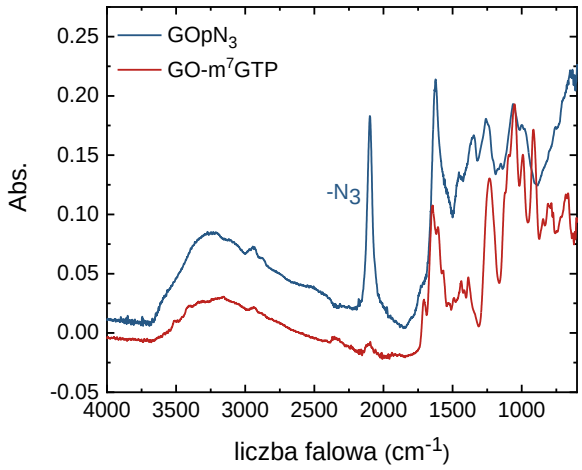
Reakcję CuAAC pomiędzy GO modyfikowanym 3-azydopropano-1-aminą na brzegach płatka $GOpN_3$, a mononukleotydowym analogiem kapu, zawierającym terminalny 2-propargilofosforan ($m^7GTPOC_3H_3$) przeprowadzono zgodnie z procedurą literaturową (Rys. IV. 183).[271]



Rys. IV. 183. Schemat reakcji CuAAC syntezy koniugatu GO z nukleotydem m^7GTP (GO-m^7GTP)

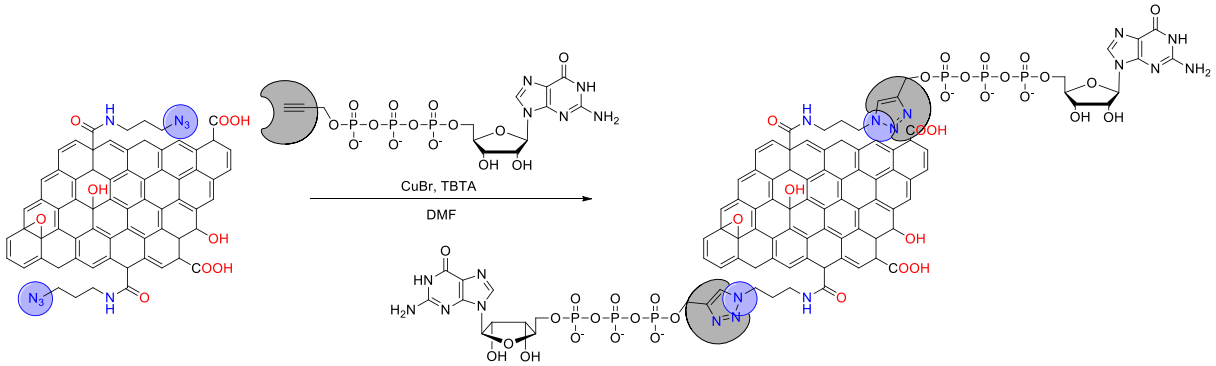
Reakcję CuAAC przeprowadzono z zastosowaniem bromku miedzi (I), będącym źródłem jonów Cu^+, w rozpuszczalniku organicznym DMF oraz w obecności liganda TBTA. Przed dodaniem $GOpN_3$ oraz nukleotydu CuBr i TBTA inkubowano w DMF przez 30 minut. Reakcję prowadzono w temperaturze 60°C. Po zakończeniu reakcji osad odwirowano, a supernatant sprawdzono z użyciem RP HPLC. Chromatogram potwierdził brak $m^7GTPOC_3H_3$ w supernatancie. Osad dodatkowo inkubowano przez noc w DMF w celu pozbycia się resztek soli. Po odwirowaniu i wysuszeniu osad scharakteryzowano poprzez rejestrację widma FTIR (Rys. IV. 184). Zanik pasma drgań rozciągających grupy azydkowej przy 2096 cm^{-1} w odniesieniu do

substratu $GOpN_3$ potwierdził prawidłowy przebieg reakcji CuAAC oraz otrzymanie koniugatu analogu kapu z grafenem – GO-m^7GTP.



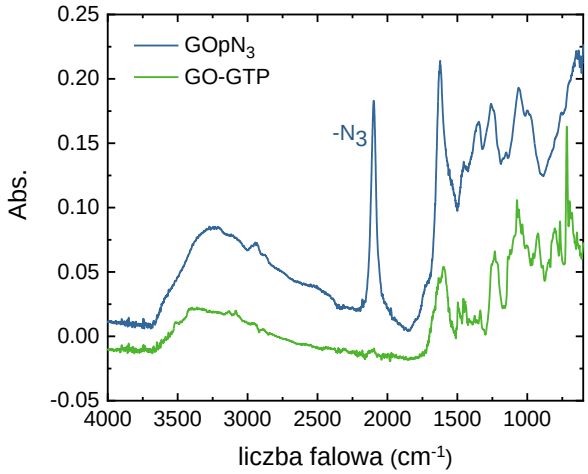
Rys. IV. 184. Widma FTIR przed i po reakcji CuAAC $GOpN_3$ z $m^7GTPOC_3H_3$ (GO-m^7GTP).

W ramach kontroli do badań biologicznych otrzymano także w analogicznych warunkach koniugat grafenu z GTP, który ze względu na brak grupy N7–metylowej nie oddziałuje z białkami specyficznie rozpoznającymi kap (Rys. IV. 185).



Rys. IV. 185. Schemat reakcji CuAAC syntezy koniugatu GO z nukleotydem GTP (GO-GTP).

Prawidłowy przebieg reakcji ponownie potwierdził zanik pasma odpowiadającego drganiom rozciągającym grupy azydkowej na zarejestrowanym widmie FTIR (Rys. IV. 186).



Rys. IV. 186. Widma IR przed i po reakcji CuAAC $GOpN_3$ z $GTPOC_3H_3$ (GO-GTP).

IV.12.4. Podsumowanie

W celu opracowania biosensora do oznaczania stężenia białek oddziałujących z kapem poprzez zmiany parametrów elektrycznych wykorzystującego koniugat kapu z nukleotydem, osadzonym na powierzchni tranzystora wykonano następujące czynności:

- Korzystając ze znanych metod literaturowych zsyntetyzowano utleniony grafen GO w zmodyfikowanej reakcji Hummersa utleniania grafitu;
- Otrzymany GO został zmodyfikowany poprzez przyłączenie propargiloaminy (GO-alkynyl), grupy azydkowej na powierzchni płatka (GO-N_3) oraz przyłączenie 3-azydo-propano-1-aminy przez reszty karboksylowe na brzegach płatka (GOpN_3);
- Jedynie pochodną GOpN_3 udało się zmodyfikować nukleotydami m^7GTP i GTP w reakcji CuAAC;
- Otrzymane koniugaty GO-m^7GTP i GO-GTP mogą następnie posłużyć do testów osadzania na powierzchni przewodzącej (grafen, dwuwymiarowy gaz elektronowy w strukturze tranzystora) oraz pomiarów zmian prądu w obecności białek oddziałujących z kapem.

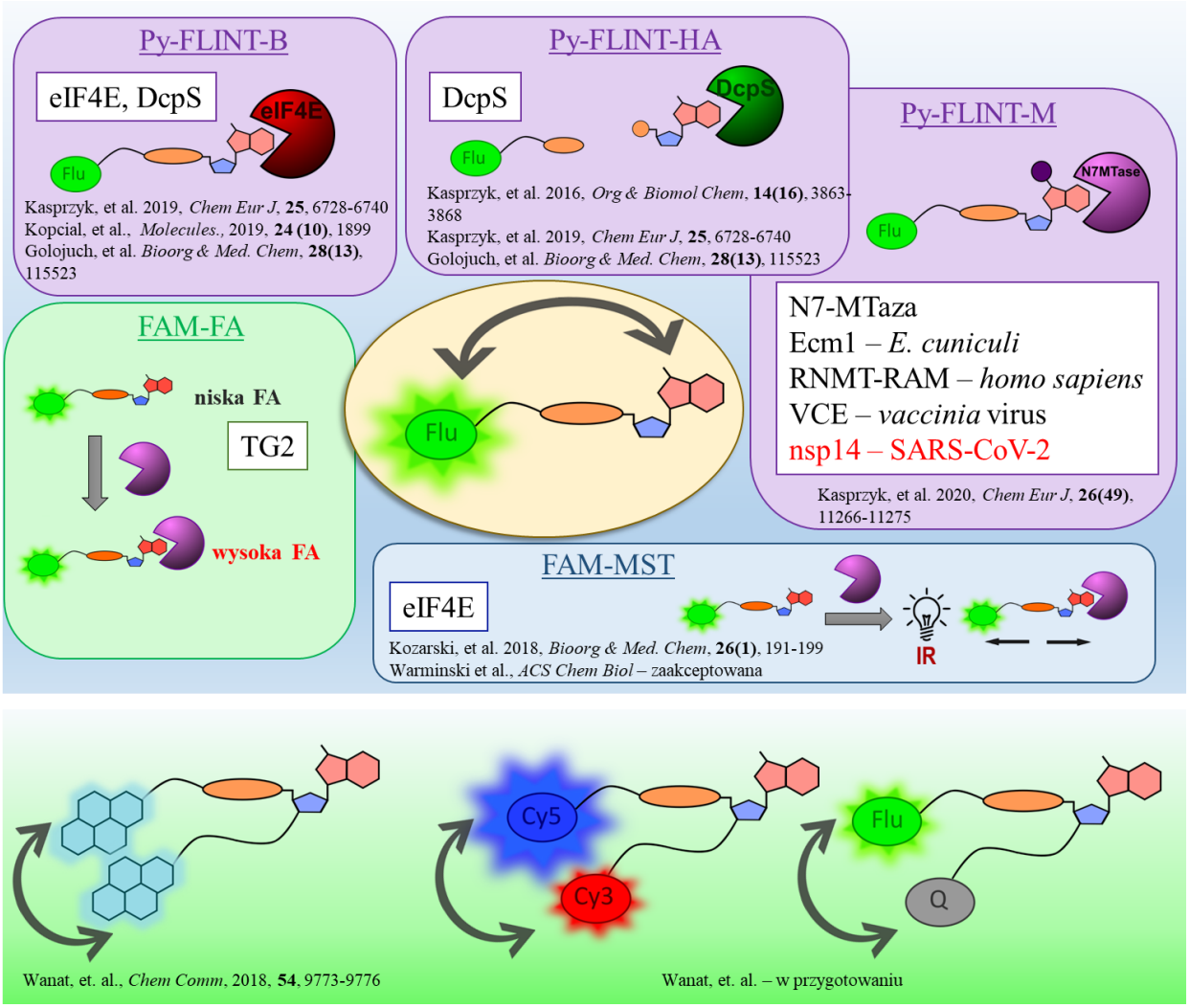
V. Podsumowanie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie uniwersalnych narzędzi w celu opracowania metod biofizycznych umożliwiających wysokoprzepustową charakterystykę białek oddziałujących z końcem 5' mRNA – kapem, pełniących istotne funkcje w komórce oraz posiadających znaczenie terapeutyczne. Głównymi obiektami badań były: eukariotyczny czynnik inicjacji translacji (eIF4E), enzym degradacji kapu (DcpS) oraz RNA kap N7–guanino metylotransferaza (Ecm1, RNMT-RAM, VCE).

W ramach pracy doktorskiej otrzymano około 40 fluorescencyjnie znakowanych nukleotydów (sond molekularnych) stosując wydajne podejścia syntetyczne, w tym reakcję CuAAC. W pierwszej części pracy zsyntetyzowano serię analogów m^7GTP, fluorescencyjnie znakowanych poprzez terminalną grupę fosforanową/*C*-fosfonianową z zastosowaniem popularnych barwników: pirenu i jego pochodnych, BODIPY, fluorescein i cyjanin. Wszystkie otrzymane związki zostały scharakteryzowane spektroskopowo poprzez pomiar ich widm absorpcji i emisji oraz obliczenie wartości wydajności kwantowych. Zweryfikowano także, czy właściwości fluorescencyjne znakowanych nukleotydów ulegają zmianie w trakcie związania z eIF4E lub degradacji katalizowanej przez enzym DcpS. Efektem tych badań było wyselekcjonowanie nukleotydów znakowanych pirenem, jako jedynych, których intensywność fluorescencji ulegała zmianie na skutek oddziaływań z białkami. Zachowanie sond spowodowane było obecnością oddziaływań wygaszających pomiędzy pirenem i zasadą azotową, stąd też zostały nazwane sondami PyFLINT. Ta unikalna właściwość pirenu została wykorzystana do opracowania trzech metod fluorescencyjnych, wykorzystujących zmiany intensywności fluorescencji pirenu w celu monitorowania procesu tworzenia kompleków kap–eIF4E i kap–DcpS (PyFLINT–B) oraz katalizowanej przez DcpS hydrolizy kapu (PyFLINT–HA). Wszystkie opracowane metody poddano walidacji poprzez porównanie uzyskanych danych z literaturą oraz obliczenie parametru z (parametr zależny od wartości średnich i odchyleń standardowych serii pomiarów maksymalnego i minimalnego sygnału fluorescencji). Metody spełniały warunki wysokoprzepustowości ($z > 0{,}5$), z tego względu mogą być z powodzeniem stosowane w eksperymentach HTS, pozwalających na szybkie i wydajne badania przesiewowe całych bibliotek ligandów. Ponadto metoda badania aktywności DcpS działa także w bardziej skomplikowanych mieszaninach biologicznych, jakimi są lizaty komórkowe. Czas wymagany do wyznaczenia powinowactwa ligandów do eIF4E przy pomocy opracowanej metody fluorescencyjnej jest ok. 10-krotnie krótszy w porównaniu do standardowych metod (RP HPLC, tsFQT).

Metodologia pirenowa jest prostym i wszechstronnym narzędziem o szerokim zakresie potencjalnych zastosowań. W ramach grantu NCN Preludium Autorka zaprojektowała nowe dinukleotydowe sondy znakowane pirenem, przeznaczone do badań RNA kap N7–guanino metylotransferazy odpowiedzialnej za selektywną metylację Gppp–RNA w pozycji N7 guanozyny, będącą jednym z etapów biosyntezy kapu. Zsyntetyzowano zestaw fluorescencyjnie znakowanych GpppA i GpppG oraz zbadano je pod kątem monitorowania reakcji N7–metylacji. Przetestowano różne znaczniki fluorescencyjne oraz zoptymalizowano pozycję znakowania i długość linkera przyłączanego znacznika. Ponownie jedynie sonda pirenowa – GpppA znakowane poprzez pozycję 3'-*O* adenozyny, zmieniała intensywność fluorescencji na skutek N7–metylacji. Źródłem zmiany fluorescencji jest silniejsze wygaszanie emisji pirenu przez N7–metyloguanozynę (produkt) niż guanozynę (substrat). Metodę zoptymalizowano i potwierdzono,

że spełnia ona warunki stosowalności w eksperymentach HTS. Użyteczność metody PyFLINT–M zademonstrowano w badaniach inhibicji trzech modelowych N7–MTaz: ludzkiej RNMT-RAM, Ecm1 z pasożyta *E. cuniculi* oraz VCE z wirusa *Vaccinia*. Wykonano badania przesiewowe komercyjnie dostępnej biblioteki związków farmakologicznie czynnych LOPAC®1280 oraz wyselekcjonowano najsilniejsze inhibitory. Wedle najlepszej wiedzy Autorki na chwilę obecną zaprojektowana metoda PyFLINT–M jest pierwszą bezpośrednią metodą HTS, opartą o zmiany fluorescencji małocząsteczkowych sond (zamiast substratów RNA), przeznaczoną do monitorowania procesu N7–metylacji oraz selekcji specyficznych inhibitorów. Obecnie Autorka stosuje metodę PyFLINT-M w badaniach przesiewowych bibliotek związków pod kątem inhibicji N7–MTazy wirusa SARS-CoV-2 (białko nsp14) powodującego chorobę COVID-19. Badania prowadzone są w ramach projektu szybkiej ścieżki „*Maszyneria biosyntezy kapu mRNA wirusa SARS-CoV-2 – badania nad aktywnością metylotransferazy białek nsp14 i nsp16 z użyciem wysokoprzepustowej metody fluorescencyjnej*”, ufundowanego przez Narodowe Centrum Nauki (PI: prof. dr hab. Jacek Jemielity, CeNT UW).



Rys. V. 1. Schematyczne przedstawienie narzędzi badawczych oraz wyników uzyskanych przez Autorkę w ramach niniejszego projektu doktorskiego.

W toku badań zaobserwowano, że fluorescencyjnie znakowane mononukleotydy guanozynowe nie są odpowiednimi substratami dla N7–metylotransferaz. Wykorzystano je jednak w ramach współpracy z grupą dr. Markusa Pietscha z Uniwersytetu w Kolonii. Autorka prowadziła badania nad białkiem oddziałującym z nukleotydami guaninowymi, jakim jest

transglutaminaza II. W ramach pracy doktorskiej Autorka zsyntetyzowała i scharakteryzowała serię analogów GTP znakowanych BDP-FL i karboksyfluoresceiną, a najlepszy z nich zastosowała do opracowania metody anizotropii fluorescencji do badań miejsca wiążącego GTP transglutaminazy II. Opracowaną metodę z powodzeniem zastosowano do charakterystyki przygotowanej w Laboratorium Chemii Bioorganicznej CeNT UW biblioteki modyfikowanych, niefluoryzujących nukleotydów guanozynowych.

Sondy nukleotydowe zawierające inne niż piren znaczniki (np. fluoresceiny, BODIPY, cyjaniny) wciąż mogą znaleźć zastosowanie w takich technikach fluorescencyjnych, jak polaryzacja/anizotropia fluorescencji, czy też termoforeza mikroskalowa. W kolejnej części pracy Autorka przeprowadziła charakterystykę spektroskopową i enzymatyczną szeregu dwuznakowanych sond nukleotydowych (w tym analogów kapu), zawierających pary znaczników tworzące ekscymer, parę FRET lub układ fluorofor–wygaszacz. Sondy wykorzystano w badaniach aktywności fosfodiesterazy PDE-I oraz enzymu dekapującego DcpS. Sondy będące odpowiednimi substratami dla enzymów, generujące czuły sygnał analityczny oraz będące zdolne do penetracji błpny komórkowej mają zostać zastosowane do monitorowania procesu dekapingu w komórce.

Ostatnia część pracy doktorskiej obejmowała zaprojektowanie biosensora do oznaczania stężenia białek specyficznie wiążących kap (np. eIF4E – marker nowotworowy) w oparciu o detekcję zmian parametrów elektrycznych. Częścią sondy odpowiedzialną za powstawanie sygnału były struktury grafenowe odłożene na podłożu SiC lub tranzystorze polowym GaN z dwuwymiarowym gazem elektronowym. Podjęto próbę bezpośredniej modyfikacji warstwy grafenu na SiC z zastosowaniem literaturowych metod utleniania. Zaobserwowano niejednorodną modyfikację warstwy, prowadzącą do utraty właściwości przewodzących grafenu. Z tego względu otrzymano także koniugaty analogu kapu m^7GTP oraz GTP z tlenkiem grafenu przeznaczonych do osadzenia na tranzystorze GaN, w którego strukturze znajduje się warstwa dwuwymiarowego gazu elektronowego.

Podsumowując, jednym z najważniejszych wyników niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie małocząsteczkowych sond fluorescencyjnych, stosowanych w czułych metodach fluorescencjnych, niewymagających dużych ilości białka. Sondy tego typu stanowią uniwersalne narzędzie możliwe do zaadaptowania nie tylko do badań białek wiążących kap, ale także innych oddziaływań nukleotyd–białko. Charakterystyka wpływu zasady azotowej na intensywność fluorescencji powszechnie stosowanych barwników może także przyczynić się do rowoju fluorescencyjnych sond molekularnych, wykorzystujących różne rodzaje oddziaływań. Opracowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej metody fluorescencyjne są obecnie stosowane w Laboratorium Chemii Bioorganicznej do rutynowej charakterystyki analogów kapu zawierających nowe modyfikacje chemiczne.

VI. Część eksperymentalna

VI.1. Synteza modyfikowanych nukleotydów

VI.1.1. Informacje ogólne

Zsyntetyzowane nieznakowane fluorescencyjnie nukleotydy oczyszczano z użyciem chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex A-25 (forma HCO_3^-). Na złoże umieszczone w kolumnie wprowadzano mieszaninę reakcyjną, a następnie przemywano je nadmiarem wody w celu usunięcia kompleksów metalu (II)/EDTA. Do elucji nukleotydów stosowano gradient liniowy wodorowęglanu trietyloamoniowego (TEAB) w wodzie dejonizowanej. Po odparowaniu rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem wraz z kilkukrotnym przemyciem etanolem w celu rozłożenia TEAB, związki wyizolowano w postaci soli trietyloamoniowych (TEA). Wydajności reakcji obliczano na podstawie masy próbki lub (preferencyjnie) jednostek optycznych (mOD) produktu. Pomiary jednostek optycznych wykonywano w 0,1 M buforze fosforanowym pH 6 przy 260 nm (analogi kapu) lub pH 7 (pozostałe).
Analizę RP HPLC prowadzono na urządzeniu Agilent Tech Series 1200 z użyciem kolumny (RP)Supelcosil LC-18-T (25 cm x 4,6 mm, przepływ 1,3 ml/min) z zastosowaniem różnych gradientów liniowych metanolu lub acetonitrylu w 0,05 M buforze octanu amonu (pH 5,9). Detekcję absorpcji wykonywano przy 260 nm oraz w maksimum absorpcji znacznika, a fluorescencji przy 360 nm (dla nieznakowanych nukleotydów m^7G) lub w maksimum emisji znacznika. Semi-preparatywne RP HPLC przeprowadzano na tym samym aparacie, wyposażonym w kolumnę Discovery RP Amide C-16 (25 cm x 21,2 mm, 5 µm, przepływ 5,0 ml/min) lub Grace Vision HT C18 HL (25 cm x 22 mm, 10 µm, przepływ 5 ml/min) z zastosowaniem różnych gradientów liniowych acetonitrylu w 0,05 M buforze octanu amonu (pH 5,9) lub elucji izokratycznej ich mieszanin. Detekcję absorpcji wykonywano przy 260 nm oraz w maksimum absorpcji znacznika, a fluorescencji przy 360 nm (dla nieznakowanych nukleotydów m^7G) lub maksimum emisji znacznika.
Strukturę i czystość produktów ostatecznych potwierdzano z użyciem technik RP HPLC oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas HR MS (ESI-). Produkty pośrednie charakteryzowano przy pomocy niskorozdzielczej MS (ESI-) oraz spektroskopii ^1H NMR, ^1H-^1H COSY i ^{31}P NMR. Widma masowe rejestrowano na spektrometrach Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos (wysoka rozdzielczość) i Sciex QTRAP 3200 (niska rozdzielczość). Widma ^1H NMR, ^1H-^1H COSY i ^{31}P NMR rejestrowano w czystym D_2O (d6-DMSO dla znaczników fluoresceinowych) w 25°C i stężeniu związku 1–5 mM na spektrometrze Bruker AVANCE III w 500,24 MHz (^1H, ^1H-^1H COSY) i 202,5 MHz (^{31}P) lub Varian INOVA 400 MHz w 399,94 (^1H, ^1H-^1H COSY) i 161,90 (^{31}P). Przesunięcia chemiczne ^1H wyznaczano w odniesieniu do zewnętrznego wzorca 3-trimetylosililo-[2,2,3,3-$^2H_4$]-propionianu (TSP), a ^{31}P w odniesieniu do zewnętrznego wzorca 20% H_3PO_4.

VI.1.2. Podstawowe syntezy

Wszystkie rozpuszczalniki i reagenty wykorzystane w syntezie zostały zakupione z Sigma Aldrich i wykorzystane bez obróbki wstępnej. Znaczniki fluorescencyjne do reakcji CuAAC: piren, perylen, BDP-FL, cyjaninę 3 i cyjaninę 5 zawierające linker PEG i grupę azydkową zakupiono w Lumiprobe. Piren z dłuższym linkerem (Py3) zawierający grupę azydkową zakupiono w APExBIO. Amid 5-N-(2-azydoetylo)-fluoresceiny ((5)FAM2-N_3) i 6-N-(2-azydoetylo)-fluoresceiny ((6)FAM2-N_3) zsyntyzowano zgodnie z opisaną wcześniej procedurą.[171] Guanozynę, 5'-monofosforan guanozyny (sól sodowa) i 5'-monofosforan adenozyny w formie kwasowej zakupiono w Sigma Aldrich.

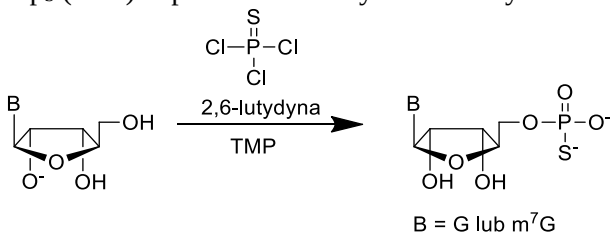
VI.1.2.1. Wymiana soli

Ze względu na słabą rozpuszczalność soli sodowej GMP i kwasowej formy AMP w rozpuszczalnikach organicznych przed ich użyciem w reakcji chemicznej wykonywano wymianę kationów. W tym celu stosowano chromatografię jonowymienną na złożu Dowex® 50WX8 mesh 100–200 (kationit). Na złoże nanoszono roztwór trietyloaminy, a następnie przemywano je wodą do pH ~7. Następnie wprowadzano związek w roztworze wodnym o stężeniu 5 g/100 ml i przemywano kolumnę wodą w celu elucji związku. Związek zbierano od momentu nanoszenia na złoże, a jego obecność w eluacie sprawdzano za pomocą $AgNO_3$ (brak wytrącania osadu soli po dodaniu do próbki $AgNO_3$ oznacza brak związku). Roztwór

związku w postaci soli $TEAH^+$ odparowywano do stałej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. W celu regeneracji złoża przemywano je kolejno 1 M roztworem NaOH, wodą do pH 7, 5% roztworem HCl i wodą do pH ~6. W przypadku fosforanu cyjanoetylowego (sól baru) związek nanoszono na zregenerowaną kolumnę i eluowano wodą do kolby zawierającej roztwór TEA (0,023 g/ml).
Do wymiany soli amonowej (NH_4^+) na trietyloamoniową ($TEAH^+$) wykorzystywano wyparkę rotacyjną. Roztwór wodny związku w soli NH_4^+ mieszano z trietyloaminą w etanolu (w stosunku ilość kationów amonowych w molekule nukleotydu plus jeden). Następnie odparowywano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a osad przemywano etanolem. Po odparowaniu osadu do suchej masy otrzymywano nukleotyd w postaci soli trietyloamoniowej.

VI.1.2.2. Tiofosforylacja

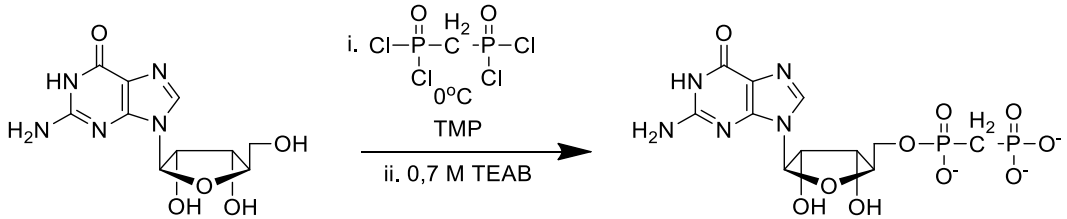
Tiofosforylację guanozyny i 7-metyloguanozyny przeprowadzono zgodnie z opisaną w literaturze procedurą (Rys. VI.1).[165] Guanozynę lub 7-metyloguanozynę suszono przez noc w eksykatorze próżniowym nad P_4O_{10}. Następnie substrat (1 eq) umieszano w kolbie i rozpuszczano w fosforanie trimetylu TMP (ang. *trimethyl phosphate*) w ilości 30 mg związku na 1 ml i umieszczano w łaźni lodowej. Po osiągnięciu 0°C do mieszaniny reakcyjnej dodawano świeżo destylowany $PSCl_3$ (4 eq) i 2,6-lutydynę (4,5 eq). Reakcję prowadzono przez 3–4 h do zaniku substratu, monitorując jej postęp poprzez rejestrację profili RP HPLC. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 0,7 M buforu TEAB (pH = 7) w objętości równej objętości mieszaniny reakcyjnej. Następnie przeprowadzano trzykrotną ekstrakcję octanem etylu, a produkt oczyszczano przy pomocy chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex. Produkty wyizolowano poprzez odparowanie buforu, a następnie kilkukrotne przemycie osadu etanolem i acetonitrylem oraz wysuszenie do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oczyszczaniu otrzymano Gp_S (60%) i m^7Gp_S (40%) w postaci soli trietyloamoniowych.



Rys. VI.1. Schemat reakcji tiofosforylacji guanozyny i 7-metyloguanozyny.

VI.1.2.3. Synteza metylenobisfosfonianu guanozyny

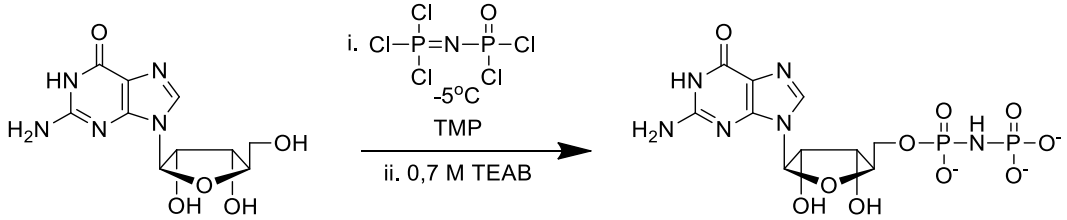
Metylenobisfosfonian guanozyny ($GpCH_2p$) otrzymywano zgodnie z opisaną w literaturze procedurą (Rys. VI.2).[168] Guanozynę suszono przez noc w eksykatorze próżniowym nad P_4O_{10}. Następnie suchy substrat (1 eq) umieszano w kolbie, rozpuszczano w fosforanie trimetylu (TMP) w ilości 10 mg związku na 1,5 ml TMP i umieszczano w łaźni lodowej. Po osiągnięciu 0°C do mieszaniny reakcyjnej dodawano tetrachlorek metylenobisfosfonianu (2 eq). Reakcję prowadzono przez 2–3 h do zaniku substratu, monitorując jej postęp poprzez rejestrację profili RP HPLC. Reakcję zatrzymano poprzez dziesięciokrotne rozcieńczenie wodą oraz doprowadzenie pH do 7 przy pomocy $NaHCO_3$. Następnie wykonano oczyszczanie za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex. Produkty wyizolowano poprzez odparowanie buforu, a następnie kilkukrotne przemycie osadu etanolem i acetonitrylem oraz wysuszenie do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oczyszczaniu otrzymano $GpCH_2p$ (55%) w postaci soli trietyloamoniowej.



Rys. VI.2. Schemat reakcji otrzymywania metylenobisfosfonianu guanozyny ($GpCH_2p$).

VI.1.2.4. Synteza imidodifosforanu guanozyny

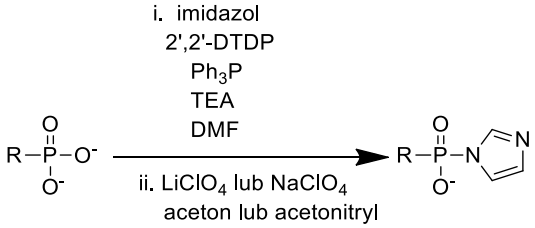
Imidodifosforan guanozyny (GpNHp) otrzymano zgodnie z opisaną w literaturze procedurą (Rys. VI.3).[169] Guanozynę suszono przez noc w eksykatorze próżniowym nad P_4O_{10}. Następnie suchy substrat (1 eq) umieszano w kolbie i rozpuszczano w fosforanie trimetylu (TMP) w ilości 32 mg związku na 1,25 ml TMP i umieszczano w łaźni lodowej z domieszką chlorku sodu. Po osiągnięciu temperatury -5°C do mieszaniny reakcyjnej dodano trichlorek dichlorofosforylofosforoimidolu ($PCl_3NP(O)Cl_2$) w fazie ciekłej (1 ml na 32 mg związku). Reakcję prowadzono przez 3 h do zaniku substratu, monitorując jej postęp poprzez rejestrację profili RP HPLC. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie 0,7 M buforu TEAB (pH = 7). Następnie wykonano oczyszczanie za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex. Produkty wyizolowano poprzez odparowanie buforu, a następnie kilkukrotne przemycie osadu etanolem i acetonitrylem oraz wysuszenie do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oczyszczaniu otrzymano GpNHp (34%) w postaci soli trietyloamoniowej.



Rys. VI.3. Schemat reakcji otrzymywania imidodifosforanu guanozyny (GpNHp).

VI.1.2.5. Synteza *P*-imidazolidów

Nukleotydy lub podjednostki fosforanowe/fosfonianowe aktywowano poprzez syntezę ich *P*-imidazolidów w reakcji Mukaiyamy-Hashimoto zgodnie z opisaną w literaturze procedurą (Rys. IV.4).[315, 327] Substrat – nukleotyd, fosforan lub fosfonian (1 eq) rozpuszczano w DMF lub DMSO (w zależności od rozpuszczalności) w ilości 1,5 ml na 100 mg związku. Następnie do mieszaniny dodawano imidazol (20 eq), 2,2'-ditiodipirydynę (6 eq), trietyloaminę (8 eq) oraz trifenylofosfinę (6 eq). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej do zaniku substratu, monitorując jej postęp poprzez rejestrację profili RP HPLC (od kilku godzin do kilku dni). Reakcję zatrzymywano poprzez dziesięciokrotne rozcieńczenie acetonem oraz dodanie $NaClO_4$ lub $LiClO_4$ (10 eq), a następnie chłodzono do około 4°C. W przypadku produktów trudnych do wytrącenia (np. niektóre *P*-imidazolidy fosfonianów) zamiast acetonu stosowano acetonitryl. Wytrącony osad *P*-imidazolidu odwirowywano i przemywano kilkukrotnie acetonem lub acetonitrylem do zaniku żółtej barwy. Ostatecznie otrzymany produkt poddawano suszeniu eksykatorze próżniowym nad P_4O_{10}. Po oczyszczaniu otrzymano *P*-imidazolid nukleotydu, fosforanu lub fosfonianu w postaci soli sodowej lub litowej, w zależności od zastosowanej soli nadchloranu (60–90%).

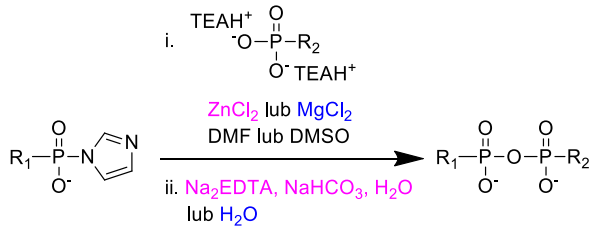


Rys. VI.4. Schemat reakcji otrzymywania *P*-imidazolidów nukleotydów i podjednostek fosforanowych/fosfonianowych.

VI.1.2.6. Wydłużanie łańcucha fosforanowego i synteza dinukleotydów

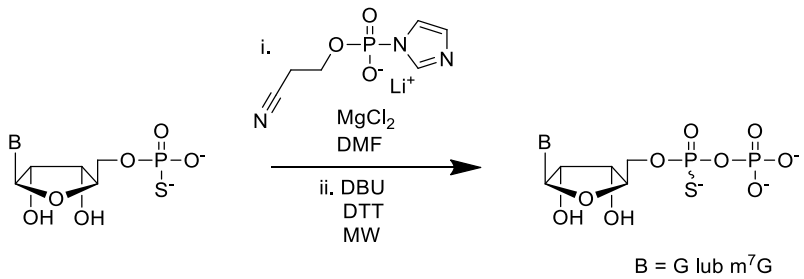
W celu włączania kolejnych pojednostek fosforanowych do mononukleotydu, bądź połączenia dwóch mononukleotydów stosowano reakcję sprzęgania, według znanych procedur (Rys. VI.5).[166] Jeden z reagentów poddawano uprzednio aktywacji poprzez otrzymanie jego *P*-imidazolidu (podrozdział VI.1.2.5). Odpowiedni *P*-imidazolid nukleotydu, fosforanu lub fosfonianu (1 eq) w postaci soli sodowej lub litowej rozpuszczano z drugim substratem nukleotydowym, fosforanem lub fosfonianem w postaci soli trietyloamoniowej (2eq) oraz katalizatorem $ZnCl_2$ lub $MgCl_2$ (~10 eq) w rozpuszczalniku – DMF, DMSO lub ich mieszaniny. Układ rozpuszczalników oraz ich ilości zależały od rozpuszczalności obydwu substratów. Sole amonowe nukleotydów słabo rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych,

dlatego w reakcji sprzęgania istotne jest stosowanie soli trietyloamoniowych. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej lub nieco podwyższonej (maksymalnie do 37°C) do zaniku substratu użytego w niedomiarze, monitorując jej postęp poprzez rejestrację profili RP HPLC (od kilku godzin do kilku dni). W celu zakończenia reakcji mieszaninę rozcieńczano dziesięciokrotnie wodą, a w przypadku stosowania jonów cynku także dodawano równomolową ilość Na_2EDTA i $NaHCO_3$ do doprowadzenia pH do 7. Oczyszczanie przeprowadzano z użyciem chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex. Produkty w postaci soli trietyloamoniowej izolowano poprzez odparowanie buforu, a następnie kilkukrotne przemycie osadu etanolem i acetonitrylem oraz wysuszenie do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. Finalne związki oczyszczano dodatkowo z użyciem semi-preparatywnego RP HPLC wydzielając je w postaci soli amonowych. Wydajności reakcji zwykle wynosiły 40–90%.



Rys. VI.5. Schemat ogólny reakcji sprzęgania nukleotydów/fosforanów z aktywowanymi nukleotydami/fosforanami.

Przyłączenie grupy fosforanowej do mononukleotydów, zawierających modyfikację tiofosforanową wymaga innego podejścia syntetycznego, zgodnie z opisaną w literaturze procedurą (Rys. VI.6).[165] Nukleotyd – Gp_S lub m^7Gp_S (1 eq) rozpuszczono w DMF (3 ml na 0,3 mmol związku), a następnie do mieszaniny dodano *P*-imidazolid fosforanu cyjanoetylu (4 eq) w postaci soli litowej oraz $MgCl_2$ (8 eq). Reakcję prowadzono przez 30 minut w reaktorze mikrofalowym (parametry: P_{max} = 10 W, T_{max} = 45°C ± 1°C). Następnie dodano kolejną porcję *P*-imidazolidu fosforanu cyjanoetylu (1,5–2,5 eq) i powtórzono cykl. Postęp reakcji monitorowano z użyciem RP HPLC. Grupy cyjanoetylowe zostały usunięte w środowisku zasadowym poprzez dodanie DBU (1,1 ml na 0,3 mmol substratu) i DTT (4 eq) oraz dwukrotne rozcieńczenie w DMF. Mieszaninę reakcyjną ponownie ogrzewano w reaktorze mikrofalowym w dwóch cyklach po 30 min każdy (parametry: P_{max} = 10 W, T_{max} = 45°C ± 1°C). Reakcję zakończono poprzez dziesięciokrotne rozcieńczenie wodą, doprowadzenie pH do 7 przy pomocy roztworu kwasu octowego oraz trzykrotną ekstrakcję octanem etylu. Następnie wykonano oczyszczanie za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex. Produkty w postaci mieszaniny izomerów nazwanych D1 i D2 od kolejności elucji na RP HPLC (odpowiednio izomery S_P i R_P)[174] wyizolowano poprzez odparowanie buforu, a następnie kilkukrotne przemycie osadu etanolem i acetonitrylem oraz wysuszenie do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oczyszczaniu otrzymano Gp_Sp D1/D2 (20%) i m^7Gp_Sp D1/D2 (32%) w postaci soli trietyloamoniowych.

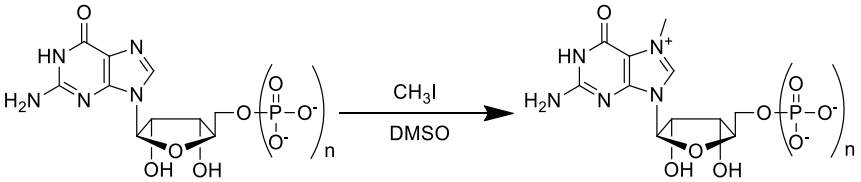


Rys. VI.6. Schemat reakcji wydłużania łańcucha fosforanowego nukleotydów zawierających grupę tiofosforanową (Gp_Sp i m^7Gp_Sp).

VI.1.2.7. Synteza analogów kapu – selektywne metylowanie pozycji N7

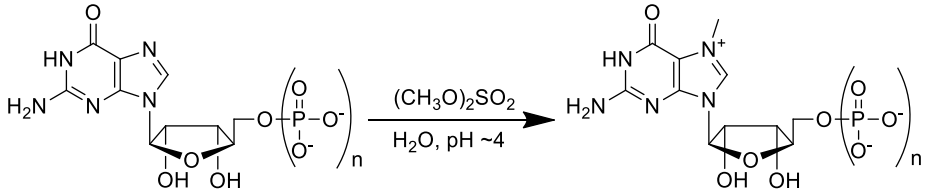
Analogi kapu otrzymywano poprzez selektywne metylowanie pozycji N7 nukleotydu guanozynowego. W zależności od tego, w postaci jakiej soli był substrat nukleotydowy stosowano dwa odczynniki do alkilowania – jodek metylu (CH_3I) lub siarczan dimetylu ($(CH_3O)_2SO_2$). W pierwszym podejściu (Rys. VI.7) nukleotyd guanozynowy w postaci soli trietyloamoniowej (1 eq) rozpuszczano w DMSO (1,5 ml na 100 mg), a następnie dodawano CH_3I (8 eq). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej do zaniku

substratu, monitorując jej postęp poprzez rejestrację profili RP HPLC (kilka godzin). Zbyt długie prowadzenie reakcji prowadzi do metylowania grup fosforanowych. Reakcję kończono poprzez dziesięciokrotne rozcieńczenie wodą i kilkukrotne przemycie eterem dietylowym. Oczyszczanie przeprowadzano z użyciem chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex. Produkty w postaci soli trietyloamoniowej izolowano poprzez odparowanie buforu, a następnie kilkukrotne przemycie osadu etanolem i acetonitrylem oraz wysuszenie do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajności reakcji zwykle wynosiły 50–80%.



Rys. VI.7. Schemat reakcji metylowania nukleotydów guanozynowych w pozycji N7 z wykorzystaniem jodku metylu (CH_3I).

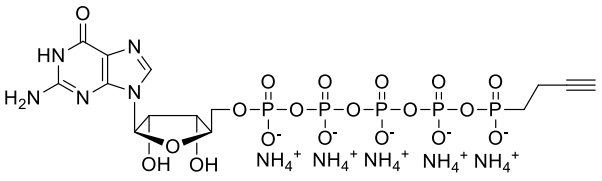
Nukleotydy guanozynowe w soli amonowej metylowano w środowisku wodnym z zastosowaniem siarczanu dimetylu (Rys. VI.8). Nukleotyd (1 eq) rozpuszczano w wodzie do stężenia 0,1–0,2 M i doprowadzano do pH 4 za pomocą 30% kwasu octowego. Siarczan dimetylu dodawano porcjami po 1 eq, co 5 minut, aż do 10 eq. W trakcie reakcji monitorowano pH i doprowadzano je do ~4 z użyciem 10% KOH. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej do zaniku substratu, a jej postęp monitorowano rejestrując profile RP HPLC od momentu dodania ostatniej porcji siarczanu dimetylu. W celu zakończenia reakcji (zwykle 1–2 h) mieszaninę rozcieńczano dziesięciokrotnie wodą, doprowadzano do pH 7 i trzykrotnie przemywano eterem dietylowym. Produkt reakcji oczyszczano z użyciem semi-preparatywnego RP HPLC iolując go w postaci soli amonowej. Ze względu na straty w trakcie oczyszczania wydajność tego podejścia zazwyczaj była niższa niż metylowanie jodkiem metylu (do 50%).



Rys. VI.8. Schemat reakcji metylowania nukleotydów guanozynowych w pozycji N7 z wykorzystaniem siarczanu dimetylu ($(CH_3O)_2SO_2$).

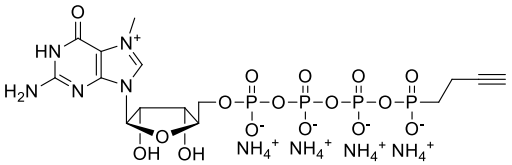
VI.1.3. Analogi nukleotydów modyfikowane grupą alkinową

VI.1.3.1. Pentafosforan ε-*C*-(3-butynylo) guanozyny w postaci soli amonowej ($Gp_5C_4H_5$)



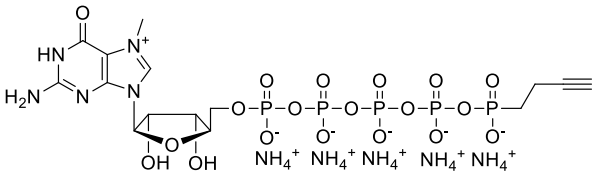
Sól trietyloamoniową Gp_4 (50 mg, 0,041 mmol) zmieszano z solą litową $PO_3C_4H_5$-Im (21 mg, 0,088 mmol) i $ZnCl_2$ (81 mg, 0,600 mmol) w DMSO (0,75 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (240 mg, 0,645 mmol) i $NaHCO_3$ (444 mg, 5,286 mmol) w 8 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–15% w czasie 0–480 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 18,5 mg (0,023 mmol) $Gp_5C_4H_5$ w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 81%. Wydajność po oczyszczaniu: 56%. HRMS (-)ESI zmierzone *m/z*: 717,9551, obliczone dla $C_{14}H_{21}N_5O_{19}P_5^-$: 717,9524; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 5,84 (1H, d, J = 6,6 Hz), 4,78 (1H, dd, J_1 = 6,6 Hz, J_2 = 5,3 Hz), 4,51 (1H, dd, J_1 = 5,3 Hz, J_2 = 2,8 Hz), 4,29 (1H, m), 4,21 (1H, ddd, J_1 = 11,3 Hz, J_2 = 6,0 Hz, J_3 = 3,5 Hz), 4,13 (1H, ddd, J_1 = 11,3 Hz, J_2 = 6,0 Hz, J_3 = 3,5 Hz), 2,41 (2H, m), 2,24 (1H, t, J = 2,7 Hz), 1,97 (2H, m); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 15,62 (1P, d, J = 21,4 Hz), -12,69 (1P, d, J = 17,3 Hz), -24,42 (3P, m).

VI.1.3.2. Tetrafosforan δ-*C*-(3-butynylo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7Gp_4C_4H_5$; **A3**)



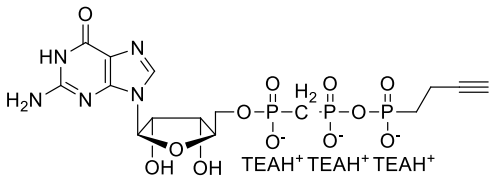
Sól sodową m^7GTP-Im (65 mg, 0,100 mmol) zmieszano z solą trietyloamoniową $PO_3C_4H_5$ (96 mg, 50% czystości, 0,361 mmol) i $MgCl_2$ (110 mg, 1,158 mmol) w DMF (1,12 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 h i zatrzymano poprzez dodanie 12 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej z uzyskaniem 473 mOD związku **A3**, zawierającego 36% m^7GTP (0,027 mmol). Dalsze oczyszczanie przeprowadzono z użyciem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforem octanu amonu pH 5,9; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 3 mg (4,6 µmol) $m^7Gp_4C_4H_5$ (**A3**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 39%. Wydajność po pierwszym oczyszczaniu: 27%. Wydajność po drugim oczyszczaniu: 5%. HRMS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 652,0025, obliczone dla $C_{15}H_{22}N_6O_{16}P_4^-$: 652,0017; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 6,10 (1H, d, J = 3,9 Hz), 4,64 (1H, dd, J_1 = 4,7 Hz, J_2 = 3,9 Hz), 4,49 (1H, t, J = 4,7 Hz), 4,34 (1H, m), 4,28 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 4,5 Hz, J_3 = 2,2 Hz), 4,2 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 4,5 Hz, J_3 = 2,2 Hz), 4,06 (3H, s), 2,41 (2H, m), 2,25 (1H, t, J = 2,8 Hz), 1,96 (2H, m); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 17,56 (1P, m), -10,56 (1P, d, J = 15,0 Hz), -22,36 (2P, m).

VI.1.3.3. Pentafosforan ε-*C*-(3-butynylo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7Gp_5C_4H_5$; **A4**)



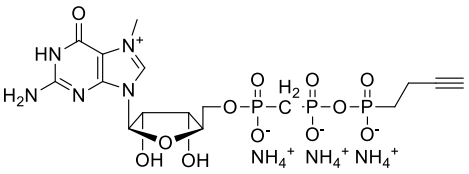
Sól amonową $Gp_5C_4H_5$ (25,0 mg, 0,035 mmol) rozpuszczono w 0,14 ml H_2O do stężenia ~0,22 M, a roztwór doprowadzono do pH 4 30% kwasem octowym. Następnie dodano 10 porcji $(CH_3O)_2SO_2$ (0,6 eq), co 5 min każdą, do mieszaniny reakcyjnej z mieszaniem. W razie konieczności dodawano 10% KOH, aby utrzymać pH na poziomie 4. Reakcję zatrzymano po 1 h poprzez dodanie 1 ml H_2O. Związki rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych usunięto poprzez trzykrotną ekstrakcję eterem dietylowym. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–15% w czasie 0–480 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 5,2 mg (6,3 µmol) $m^7Gp_5C_4H_5$ (**A4**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 77%. Wydajność po oczyszczaniu: 20%. HRMS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 731,9699 obliczone dla $C_{15}H_{23}N_5O_{19}P_5^-$: 731,9681; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 6,00 (1H, d, J = 4,5 Hz), 4,66 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,50 (1H, t, J = 4,5Hz), 4,35 (1H, m), 4,27 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 5,3 Hz, J_3 = 2,3 Hz), 4,21 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 5,3 Hz, J_3 = 2,3 Hz), 4,07 (3H, s), 2,42 (2H, m), 2,26 (1H, t, J = 2,6 Hz), 1,96 (2H, m), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 15,57 (1P, m), -12,72 (1P, m), -24,37 (3P, m).

VI.1.3.4. Trifosforan γ-*C*-(3-butynylo) α-β-metyleno guanozyny w postaci soli trietyloamoniowej ($GpCH_2ppC_4H_5$)



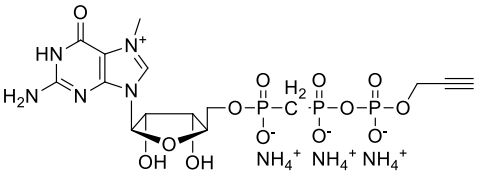
Sól sodową $GpCH_2p$-Im (80 mg, 0,150 mmol) zmieszano z solą trietyloamoniową $PO_3C_4H_5$ (130 mg, 0,955 mmol) i $MgCl_2$ (290 mg, 3,053 mmol) w DMF (2,25 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 h i zatrzymano poprzez dodanie 44,5 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej. Otrzymano 95 mg związku $GpCH_2ppC_4H_5$ (0,045 mmol, 40%). Wydajność HPLC: 42%. Wydajność po oczyszczaniu: 30%. HRMS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 556,0405, obliczone dla $C_{15}H_{21}N_5O_{12}P_3^-$: 556,0405; ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ = 8,16 (1H, s), 5,88 (1H, d, J = 5,3 Hz), 4,69 (1H, t, J = 5,3 Hz), 4,48 (1H, t, J = 4,7 Hz), 4,28 (1H, m), 4,13 (2H, m), 2,36 (3H, m), 2,29 (1H, m), 2,25 (1H, q, J = 2,2 Hz), 1,89 (3H, m), ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): δ = 18,76 (1P, m), 17,66 (1P, m), 9,83 (1P, m).

VI.1.3.5. Trifosforan γ-*C*-(3-butynylo) α-β-metyleno N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpCH_2ppC_4H_5$; **B1**)



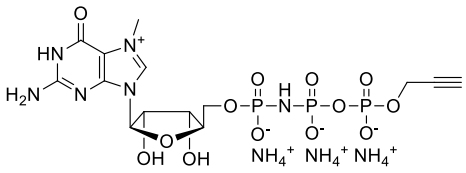
Sól trietyloamoniową $GpCH_2ppC_4H_5$ (85 mg 40% czystego z 60% H-fosfonianu $GpCH_2pp$, 0,050 mmol) zmieszano z jodometanem (56 µl, 0,900 mmol) w 1,3 ml DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3,5 h i zatrzymano poprzez dodanie 13 ml H_2O. Związki rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych usunięto poprzez trzykrotną ekstrakcję eterem dietylowym. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 14 mg (15,8 µmol, 70% czysty) związku $m^7GpCH_2ppC_4H_5$ (**B1**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 50%. Wydajność po oczyszczaniu: 32%. HRMS (-)ESI zmierzone *m/z*: 570,0566, obliczone dla $C_{16}H_{23}N_5O_{12}P_3^-$: 570,0562; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 6,07 (1H, d, J = 3,7 Hz), 4,71 (1H, dd, J_1 = 4,9 Hz, J_2 = 3,7 Hz), 4,57 (1H, t, J = 4,9 Hz), 4,39 (1H, dt, J_1 = 4,2 Hz, J_2 = 2,5 Hz), 4,33 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 5,1 Hz, J_3 = 2,5 Hz), 4,20 (1H, ddd, J = 11,9, 5,1, 2,2 Hz, 1H), 4,14, (3H, s), 2,46 (3H, m), 2,39 (1H, s), 2,34 (1H, t, J = 2,7 Hz), 1,98 (2H, m), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 18,42 (1P, m), 17,05 (1P, m), 7,61 (1P, m).

VI.1.3.6. Trifosforan γ-*O*-(2-propargilo) α-β-metyleno N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpCH_2ppOC_3H_3$; **B2**)



Sól amonową m^7GpCH_2p (4,3 mg, 8,8 µmol) zmieszano z solą litową $PO_3C_3H_3$-Im (5,5 mg, 0,028 mmol) i $ZnCl_2$ (12 mg, 0,088 mmol) w DMSO (80 µl). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 5 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (37,2 mg, 0,100 mmol) oraz doprowadzenie do pH 6 5 M roztworem KOH. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforem octanu amonu pH 5,9; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,7 mg (2,7 µmol) związku $m^7GpCH_2ppOC_3H_3$ (**B2**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 70%. Wydajność po oczyszczaniu: 31%. HRMS (-)ESI zmierzone *m/z*: 572,0360, obliczone dla $C_{15}H_{21}N_5O_{13}P_3^-$: 572,0354; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 9.37 (1H, s), 6.00 (1H, d, J = 3.8 Hz), 4.64 (1H, dd, J_1 = 4.6 Hz, J_2 = 3.8 Hz), 4.51 (2H, dd, J_1 = 9.2 Hz, J_2 = 2.4 Hz), 4.49 (1H, t, J = 5.1 Hz), 4.32 (1H, m), 4.25 (1H, ddd, J_1 = 11.9 Hz, J_2 = 5.0 Hz, J_3 = 2.3 Hz), 4.13 (1H, ddd, J_1 = 11.9 Hz, J_2 = 5.0 Hz, J_3 = 2.3 Hz), 4.07 (3H, s), 2.81 (1H, t, J = 2.4 Hz), 2.33 (2H, t, J = 20.4 Hz), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 18.22 (1P, m), 8.00 (1P, dtd, J_1 = 26.2 Hz, J_2 = 20.9 Hz, J_3 = 9.9 Hz), -10.39 (1P, dt, J_1 = 26.2 Hz, 9.2 Hz), ^{31}PCPD NMR (202 MHz, D_2O): δ = 18.22 (1P, d, J = 9.9 Hz), 8.00 (1P, dd, J_1 = 26.2 Hz, J_3 = 9.9 Hz), -10.39 (1P, dt, J_1 = 26.2 Hz).

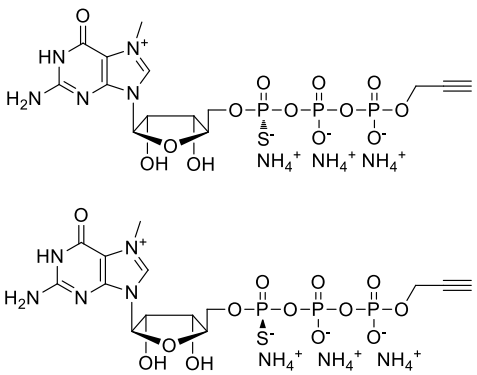
VI.1.3.7. Trifosforan γ-*O*-(2-propargilo) α-β-imido N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpNHppOC_3H_3$; **B3**)



Sól trietyloamoniową m^7GpNHp (14 mg, 0,022 mmol) zmieszano z solą litową $PO_3C_3H_3$-Im (55 mg, 0,286 mmol) $MgCl_2$ (18 mg, 0,189 mmol) i $ZnCl_2$ (18 mg, 0,132 mmol) w DMSO (1,3 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (120 mg, 0,322 mmol) w 11 ml H_2O oraz doprowadzenie do pH 7 przez $NaHCO_3$. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforem octanu amonu pH 5,9; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 5 mg (8,0 µmol) związku $m^7GpNHppOC_3H_3$ (**B3**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 78%. Wydajność po oczyszczaniu: 37%. HRMS (-)ESI zmierzone *m/z*: 573,0313, obliczone dla $C_{14}H_{20}N_6O_{13}P_3^-$: 573,0307; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 7,39 (1H, s), 6,01 (1H, d, J = 3,7 Hz), 4,63 (1H, d, J = 4,3 Hz), 4,52 (2H, dd, J_1 = 8,9 Hz, J_2 = 2,4 Hz), 4,48 (1H, t, J = 4,9 Hz), 4,34 (1H, dt, J_1 = 4,9 Hz, J_2 = 2,4 Hz), 4,21 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 5,3 Hz, J_3 =

2,0 Hz), 4,10 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 5,3 Hz, J_3 = 2,0 Hz), 4,07 (3H, s), 2,80 (1H, t, J = 2,4 Hz), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 0,18 (1P, s), -10,28 (1P, m), -10,70 (1P, m).

VI.1.3.8. α-*S*-tritiofosforan γ-*O*-(2-propargilo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpSppOC_3H_3$ D1; **B4**), α-*R*-tritiofosforan γ-*O*-(2-propargilo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GpSppOC_3H_3$ D2; **B5**)

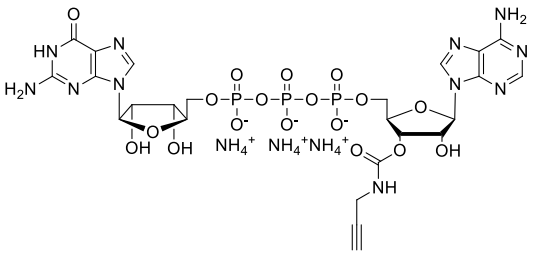


Sól trietyloamoniową m^7GpSp D1/D2 (40,0 mg, 0,059 mmol, zawierającego 45% D1 i 55% D2) zmieszano z solą litową $PO_3C_3H_3$-Im (45,0 mg, 0,234 mmol) i $MgCl_2$ (57,0 mg, 0,600 mmol) w DMF (0,6 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 h i zatrzymano poprzez dodanie 6 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 8,7 mg (13,5 µmol) związku **B4** i 12,0 (18,7 µmol) związku **B5** w postaci białych proszków. Wydajność HPLC: D1 – 80%, D2 – 81%. Wydajność po oczyszczaniu: D1 – 51%, D2 – 57%.

D1: HRMS (-)ESI zmierzone *m/z*: 589,9925, obliczone dla $C_{14}H_{19}N_5O_{13}P_3S^-$: 589,9918; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 6,10 (1H, d, J = 3,7 Hz), 4,73 (1H, dd, J_1 = 3,7 Hz, J_2 = 4,6 Hz), 4,63 (2H, dd, J_1 = 9,2 Hz, J_2 = 2,4 Hz), 4,58 (1H, t, J = 4,6 Hz), 4,44 (1H, m), 4,40 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 5,5 Hz, J_3 = 2,2 Hz), 4,34 (1H, ddd, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 5,5 Hz, J_3 = 2,2 Hz), 4,18 (3H, s), 2,88 (1H, t, J = 2,4 Hz), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 44,09 (1P, d, J = 27,4 Hz), -10,79 (1P, dt, J_1 = 19,9 Hz, J_2 = 9,2 Hz), -23,30 (1P, dd, J_1 = 27,4 Hz, J_2 = 19,9 Hz).

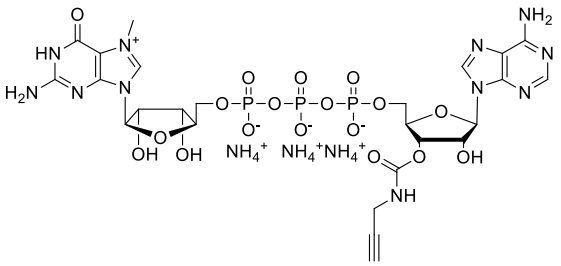
D2: HRMS (-)ESI zmierzone *m/z*: 589,9925, obliczone dla $C_{14}H_{19}N_5O_{13}P_3S^-$: 589,9918; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 9,23 (1H, s), 6,08 (1H, d, J = 3,7 Hz), 4,72 (1H, dd, J_1 = 4,8 Hz, J_2 =3,7 Hz), 4,62 (2H, dt, J_1 = 9,0 Hz, J_2 = 2,2 Hz), 4,55 (1H, t, J = 4,8 Hz), 4,44 (2H, m), 4,32 (1H, ddd, J_1 = 12,5 Hz, J_2 = 6,5 Hz, J_2 = 2,4 Hz), 4,17 (1H, s), 2,88 (1H, t, J = 2,2 Hz), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 43,93 (1P, d, J = 26,9 Hz), -10,82 (1P, dt, J_1 = 19,5 Hz, J_2 = 9,0 Hz), -23,29 (1P, dd, J_1 = 26,9 Hz, J_2 = 19,5 Hz).

VI.1.3.9. Trifosforan P^1-5'-guanozyno-P^3-5'-(N-propargilo-3')- karbamoiloadenozyny w postaci soli amonowej (Gp_3A-3'-*O*-cp; **C1**)



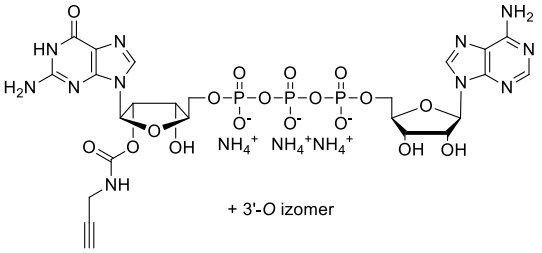
Sól trietyloamoniową GMP (70,0 mg, 0,15 mmol) zmieszano z solą litową cpADP-Im (41,0 mg, 0,072 mmol) i $MgCl_2$ (95,0 mg, 1 mmol) w DMF (1 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 17,5 h i zatrzymano poprzez dodanie 10 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 16,5 mg (0,018 mmol) związku Gp_3A-3'-*O*-cp (**C1**) i 11 mg (0,012 mmol) izomeru 2'-*O* w postaci białych proszków. Wydajność HPLC: 100%. Wydajność po oczyszczaniu: 42% (25% dla samego izomeru 3'-*O*). HR MS (-) ESI zmierzone *m/z*: 852,0919, obliczone dla $C_{24}H_{29}N_{11}O_{18}P_3^-$: 852,0910; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8,49 (1H, s, H_{C2}-Ado), 8,24 (1H, s, H_{C8}-Ado), 8,03 (1H, s, H_{C8}-Guo), 6,04 (1H, d, J = 6,9 Hz, $H_{1'}$-Ado), 5,78 (1H, d, J = 5,5 Hz, $H_{1'}$-Guo), 5,34 (1H, m, $H_{3'}$-Ado), 4,89 (1H, t, J = 5,9, $H_{2'}$-Ado), 4,67 (1H, t, J = 5,5, $H_{2'}$-Guo), 4,50 (2H, m), 4,28 (5H, m), 3,95 (2H, s, $H_{propargyl\ 3'\text{-}O}$), 2,63 (1H, s, $H_{propargyl\ 3'\text{-}O}$), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = -10,42 (2P, m, P_α, P_γ), -22,09 (1P, t, J = 19,2 Hz, P_β).

VI.1.3.10. Trifosforan P^1-5'-(7-metylo)guanozyno-P^3-5'-(N-propargilo-3')-karbamoiloadenozyny w postaci soli amonowej (m^7Gp_3A-3'-*O*-cp; **C2**)



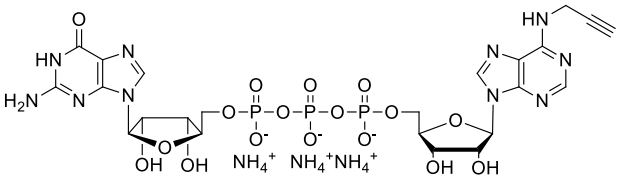
Sól amonową 3'-*O*-Gp_3Acp (**C1**) (1,0 mg, 1,1 µmol) rozpuszczono w 60 µl H_2O do stężenia 0,18 M, i doprowadzono pH do 4 przy pomocy 30% kwasu octowego. Następnie dodano 10 porcji (10 eq) $(CH_3O)_2SO_2$ – 1 porcja do reakcji z mieszaniem co 5 min. W razie konieczności do reakcji dodawano 10% KOH w celu utrzymania pH na wartości 4. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4,5 h i zatrzymano poprzez dodanie 0,8 ml H_2O. Związki rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych usunięto poprzez trzykrotną ekstrakcję eterem dietylowym. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,5 mg (0,54 µmol) związku m^7Gp_3A-3'-*O*-cp (**C2**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 93%. Wydajność po oczyszczaniu: 49%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 866,1070, obliczone dla $C_{25}H_{31}N_{11}O_{18}P_3^-$: 866,1067; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8,45 (1H, s, H_{C2}-Ado), 8,16 (1H, s, H_{C8}-Guo), 6,02 (1H, d, J = 6,0 Hz, $H_{1'}$-Ado), 5,84 (1H, d, J = 3,6 Hz, $H_{1'}$-Guo), 5,34 (1H, m, $H_{3'}$-Ado), 4,88 (1H, t, J = 6,0 Hz, $H_{2'}$-Ado), 4,46 (1H, dd, J_1 = 4,5 Hz, J_2 = 3,6 Hz, $H_{2'}$-Guo), 4,39 (2H, m), 4,37-4,33 (2H, m), 4,29-4,26 (3H, m), 4,00 (3H, s, -CH_3(N7)), 3,95 (2H, m, $H_{propargyl\,3'\text{-}O}$), 2,63 (1H, m, $H_{propargyl\,3'\text{-}O}$); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = -10,67 (2P, m, P_α, P_γ), -22,19 (1P, t, J = 19,3 Hz, P_β).

VI.1.3.11. Trifosforan P^1-5'-((N-propargilo)-2'(3')-karbamoilo)guanozyno-P^3-5'-adenozyny w postaci soli amonowej (2'-*O*/3'-*O*-cp-Gp_3A; **C3**)



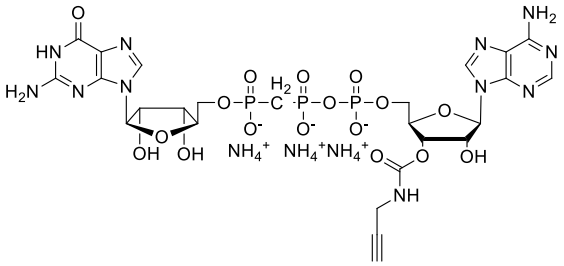
Sól trietyloamoniową AMP (38 mg, 0,085 mol) zmieszano z solą litową 2'-*O*/3'-*O*-cp-GDP-Im (18,8 mg, 0,031 mmol) i $MgCl_2$ (46 mg, 0,484 mmol) w DMSO (0,5 ml) i DMF (0,1 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 6 h i zatrzymano poprzez dodanie 4 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C–16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 10 mg (0,011 mmol) związku 2'-*O*/3'-*O*-cp-Gp_3A (**C3**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 100%. Wydajność po oczyszczaniu: 35%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 852,0924, obliczone dla $C_{24}H_{29}N_{11}O_{18}P_3^-$: 852,0910; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.41 (1H, s, H_{C2}-Ado (2'-*O* izomer)), 8,40 (1H, s, H_{C2}-Ado (3'-*O* izomer)), 8,18 (1H, s, H_{C8}-Ado (3'-*O* izomer)), 8,18 (1H, s, H_{C8}-Ado (2'-*O* izomer)), 8,02 (1H, s, H_{C8}-Guo (3'-*O* izomer)), 7,92 (1H, s, H_{C8}-Guo (2'-*O* izomer)), 6,03 (1H, d, J = 4,7 Hz, $H_{1'}$-Ado (2'-*O* izomer)), 6,02 (1H, d, J = 5,1 Hz, $H_{1'}$-Ado (3'-*O* izomer)), 5,88 (1H, d, J = 3,0 Hz, $H_{1'}$-Guo (2'-*O* izomer), 5,78 (1H, d, J = 7,2 Hz, $H_{1'}$-Guo (3'-*O* izomer), 5,34 (1H, m, $H_{2'}$-Guo (2'-*O* izomer)), 5,31 (1H, m, $H_{3'}$-Guo (3'-*O* izomer)), 4,91 (1H, m, $H_{2'}$-Guo (3'-*O* izomer)), 4,65 (3H, m, $H_{2'}$-Ado (3'O izomer), $H_{3'}$-Guo (2'O izomer), dodatwkoy H z izomeru 2'-*O*), 4,52 (2H, m), 4,42 (1J, m, $H_{4'}$-Guo (3'-*O* izomer), 4,35-4,26 (11H, m), 3,93 (1H, s, $H_{propargyl}$ (3'-*O* izomer)), 3,88 (1H, m, $H_{propargyl}$ (2'-*O* izomer), 2,63 (1H, s, $H_{propargyl}$ (3'-*O* izomer)), 2,59 (1H, t, J = 2,4 Hz, $H_{propargyl}$ (2'-*O* izomer), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = -10,42 (2P, m, P_α, P_γ), -22,04 (1P, t, J = 18,6 Hz, P_β),

VI.1.3.12. Trifosforan P^1-5'-guanozyno-P^3-5'-N6-propargiloadenozyny w postaci soli amonowej ($Gp_3A(N6)prop$; **C4**)



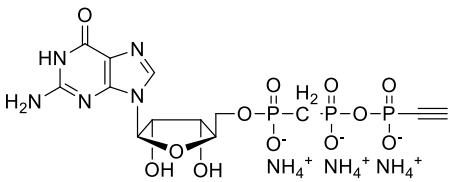
Sól trietyloamoniową AMP(N6)prop (45,0 mg, 0,093 mol) zmieszano z solą sodową GDP-Im (23,0 mg, 0,043 mmol) i $ZnCl_2$ (40,0 mg, 0,295 mmol) w DMF (0,5 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 22 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (110,0 mg, 0,295 mmol) w 10 ml H_2O. pH roztworu doprowadzono do wartości 7 przy pomocy $NaHCO_3$. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–60 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 5,4 mg (6,3 µmol) związku $Gp_3A(N6)prop$ (**C4**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 77%. Wydajność po oczyszczaniu: 15%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 809,0862, obliczone dla $C_{23}H_{28}N_{10}O_{17}P_3^-$: 809,0852; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8,38 (1H, s, H_{C2}-Ado), 8,23 (1H, s, H_{C8}-Ado), 8,02 (1H, s, H_{C8}-Guo), 6,06 (1H, d, J = 4,7 Hz, $H_{1'}$-Ado), 5,78 (1H, d, J = 5,0 Hz, $H_{1'}$-Guo), 4,65 (1H, t, J = 4,7 Hz, $H_{2'}$-Ado), 4,61 (1H, t, J = 5,0, $H_{2'}$-Guo), 4,51 (1H, t, J = 5,0, $H_{3'}$-Guo), 4,47 (1H, t, J = 4,7 Hz, $H_{3'}$-Ado), 4,36-4,24 (8H, m, $H_{4',5',5''}$-Ado, $H_{4',5',5''}$-Guo, $H_{propargyl\ N6}$), 2,00 (1H, s, $H_{propargyl\ N6}$), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = -10,49 (2P, m, P_α, P_γ), -22,09 (1P, t, J = 18,4 Hz, P_β).

VI.1.3.13. Trifosforan P^1-5'-(β-γ-metyleno)guanozyno-P^3-5'-(N-propargilo-3')-P^3-5'-adenozyny w postaci soli amonowej ($GpCH_2ppA$-3'-*O*-cp; **C6**)



Sól trietyloamoniową $GpCH_2p$ (50,0 mg, 0,113 mol) zmieszano z solą litową cpAMP-Im (135,0 mg, 0,279 mmol) i $ZnCl_2$ (270,0 mg, 1,98 mmol) w DMF (1,25 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (740,0 mg, 1,98 mmol) w 20 ml H_2O. pH roztworu doprowadzono do wartości 7 przy pomocy $NaHCO_3$. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex w postaci soli trietyloamonowej (22,0 mg, 0,019 mmol) mieszaniny izomerów 2'-*O* i 3'-*O*. Wydajność HPLC: 60%. Wydajność po oczyszczaniu: 17%. Izomery rozdzielono korzystając z semi-preparatywnego HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 2,2 mg (2,4 µmol) związku $GpCH_2ppA$-3'-*O*-cp (**C6**) i 0,8 mg (0,7 µmol) izomeru 2'-*O* w postaci białych proszków. Wydajność po drugim oczyszczaniu: 3% (2% dla samego izomeru 3'-*O*. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 850,1123, obliczone dla $C_{25}H_{31}N_{11}O_{17}P_3^-$: 850,1118; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8,54 (1H, s, H_{C2}-Ado), 8,27 (1H, s, H_{C8}-Ado), 8,15 (1H, s, H_{C8}-Guo), 6,07 (1H, d, J = 6,9 Hz, $H_{1'}$-Ado), 5,80 (1H, d, J = 5,6 Hz, $H_{1'}$-Guo), 5,34 (1H, m, $H_{3'}$-Ado), 4,93 (1H, t, J = 6,9, $H_{2'}$-Ado), 4,74 (1H, t, J = 5,6, $H_{2'}$-Guo), 4,51 (2H, m), 4,29 (3H, m), 4,23 (1H, m), 4,17 (1H, m), 3,96 (2H, s, $H_{propargyl}$), 2,64 (1H, s, $H_{propargyl}$), ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 18,23 (1P, d, J = 8,5 Hz, P_α), 8,44 (1P, dd, J_1 = 25,7 Hz, J_2 = 8,5 Hz, P_β), -10,12 (1P, d, J = 25,7 Hz, P_γ).

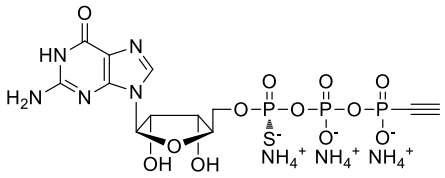
VI.1.3.14. Trifosforan (2-etynylo) α-β-metyleno guanozyny w postaci soli amonowej ($GpCH_2ppC_2H$; **D7**)



Sól sodową $GpCH_2p$-Im (40,0 mg, 75 µmol) zmieszano z solą trietyloamoniową 1-etynylo-*C*-fosfonianu (PO_3C_2H; 33,0 mg, 311 µmol) i $MgCl_2$ (78,0 mg, 821 µmol) w DMF (0,8 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 h i zatrzymano poprzez dodanie 7 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został

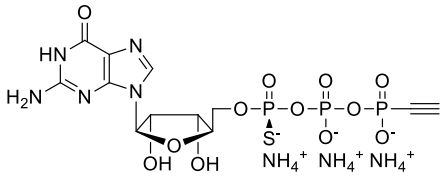
kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 14,5 mg (25 µmol) związku $GpCH_2ppC_2H$ (**D7**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 90%. Wydajność po oczyszczaniu: 33%. HRMS (-)ESI zmierzone *m/z*: 528,0087, obliczone dla $C_{13}H_{17}N_5O_{12}P_3^-$: 528,0090; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8,69 (1H, s, NH), 8,21 (1H, s, H(C8)), 5,94 (1H, d, J = 5,7 Hz, H1'), 4,78 (1H,m, H2'), 4,56 (1H, dd, J_1 = 4,8 Hz, J_2 = 4,2 Hz, H3'), 4,35 (1H, m, H4'), 4,21-4,16 (2H, m, H5', H5"), 3,19 (1H, m, CH), 2,40 (2H, dt, J_1 = 13,9 Hz, J_2 = 3,4 Hz, CH_2); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 16,46 (1P, m), 8,33 (1P, m), -21,56 (1P, m).

VI.1.3.15. α-*S*-tritiofosforan γ-*O*-(2-etynylo) metyloguanozyny w postaci soli amonowej (Gp_SppC_2H D1; **D8**)



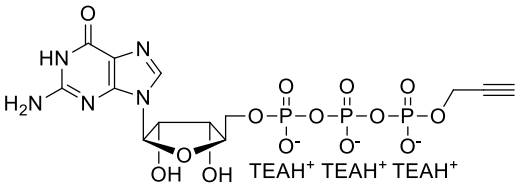
Sól trietyloamoniową Gp_Sp D1 (20 mg, 30 µmol) zmieszano z solą litową *P*-imidazolidu 1-etynylo-*C*-fosfonianu (PO_3C_2H-Im; 16 mg, 100 µmol) i $MgCl_2$ (38 mg, 400 µmol) w DMF (0,3 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 dni i zatrzymano poprzez dodanie 1,5 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforu octanu amonu pH 5,9/30% ACN; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1 mg (1,7 µmol) związku Gp_SppC_2H D1 (**D8**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 26%. Wydajność po oczyszczaniu: 5,5%. MS (-) ESI zmierzone *m/z*: 545,8, obliczone dla $C_{12}H_{15}N_5O_{12}P_3S^-$: 545,9656;

VI.1.3.16. α-*R*-tritiofosforan γ-*O*-(2-etynylo) metyloguanozyny w postaci soli amonowej (Gp_SppC_2H D2; **D9**)



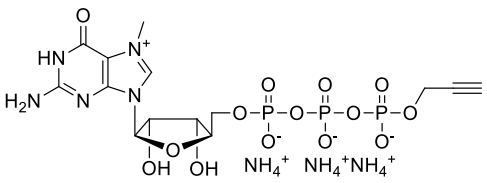
Sól trietyloamoniową Gp_Sp D2 (20 mg, 30 µmol) zmieszano z solą litową *P*-imidazolidu 1-etynylo-*C*-fosfonianu (PO_3C_2H-Im; 16 mg, 100 µmol) i $MgCl_2$ (38 mg, 400 µmol) w DMF (0,3 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 dni i zatrzymano poprzez dodanie 1,5 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforu octanu amonu pH 5,9/30% ACN; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 4 mg (6,7 µmol) związku Gp_SppC_2H D2 (**D9**) w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 58%. Wydajność po oczyszczaniu: 22%.HR MS (-) ESI zmierzone *m/z*: 545,9648 obliczone dla $C_{12}H_{15}N_5O_{12}P_3S^-$: 545,9656; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.20 (1H, s, H(C8)), 5.94 (1H, d, J = 6.4 Hz, H1'), 4.84 (1H, m, H2'), 4.59 (1H, dd, J_1 = 5.1 Hz, J_2 = 3.1 Hz, H3'), 4.40 (1H, m, H4'), 4.31 (2H, dd, J_1 = 6.6 Hz, J_2 = 3.1 Hz, H5', H5"), 3.18 (1H, d, J = 13.0 Hz, CH); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 43.25 (1P, d, J = 27.9 Hz, P_α), -21.89 (1P, t, P_γ), -24.92 (1P, dd, J_1 = 27.9 Hz, J_2 = 20.0 Hz, P_β).

VI.1.3.17. Trifosforan γ-*O*-(3-propargilo) guanozyny w postaci soli trietyloamoniowej ($GTPOC_3H_3$)



Sól sodową GDP-Im (70 mg, 0,13 mmol) zmieszano z solą cykloheksyloamoniową fosforanu propargilu $PO_4C_3H_3$ (120 mg, 0,39 mmol) i $MgCl_2$ (135 mg, 1,42 mmol) w DMF (0,8 ml) i DMSO (1,2 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 4 h i zatrzymano poprzez dodanie 250 mg Na_2EDTA (0,67 mmol) i 20 ml H_2O. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex w postaci soli trietyloamonowej (23 mg, 0,004 mmol). Wydajność HPLC: nie można określić, ze względu na nakładanie się sygnałów produktu ($GTPOC_3H_3$) i substratu (GDP-Im). Wydajność po oczyszczaniu: 31%. MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 560,1, obliczone dla $C_{13}H_{17}N_5O_{14}P_3^-$: 559,9990.

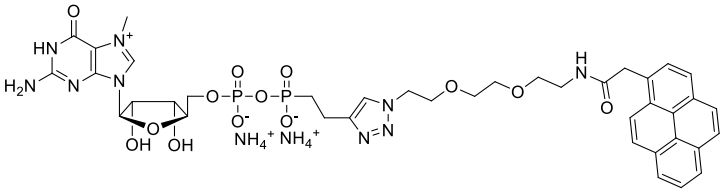
VI.1.3.18. Trifosforan γ-*O*-(3-propargilo) N7–metyloguanozyny w postaci soli amonowej ($m^7GTPOC_3H_3$)



Sól trietyloamoniową $GTPOC_3H_3$ (20,0 mg, 0,023 mmol) zmieszano z jodkiem metylu CH_3I (18,5 µl, 42,0 mg, 0,29 mmol) w DMSO (0,3 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 h i zakończono poprzez dodanie 3,5 ml H_2O i trzykrotne przemycie eterem dietylowym. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforem octanu amonu pH 5,9; kolumna Grace Vision HT C18). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 3,3 mg (5,3 µmol) związku $m^7GTPOC_3H_3$ w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 66%. Wydajność po oczyszczaniu: 23%. MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 574,1, obliczone dla $C_{14}H_{19}N_5O_{14}P_3^-$: 574,0147.

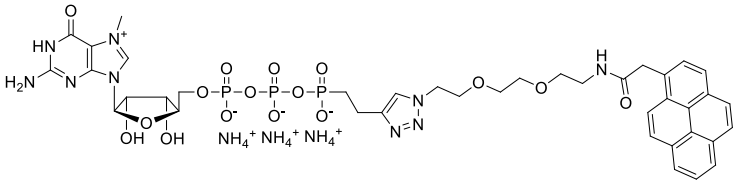
VI.1.4. Fluorescencyjnie znakowane nukleotydy

VI.1.4.1. $m^7Gp_2C_4Py$ (**A1-1**)



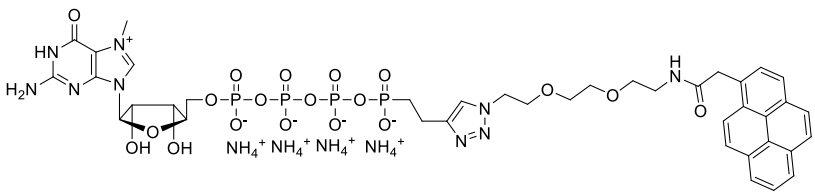
Roztwór wodny $m^7Gp_2C_4H_5$ (**A1**) w postaci soli amonowej (5,0 mg, 9,5 µmol, 0,95 M) zmieszano z Py-N_3 (5,9 mg, 14,2 µmol, 0,71 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (1,2 mg, 4,7 µmol, 3,8 µl, 0,78 M) i askorbinianu sodu (1,8 mg, 9,5 µmol, 7,6 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 40 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 h 45 min i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,7 mg, 4,7 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 2,4 mg (2,5 µmol) związku **A1-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 83%. Wydajność po oczyszczaniu: 27%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 908,2567, obliczone dla $C_{39}H_{44}N_9O_{13}P_2^-$: 908,2539.

VI.1.4.2. $m^7Gp_3C_4Py$ (**A2-1**)



Roztwór wodny $m^7Gp_3C_4H_5$(**A2**) w postaci soli trietyloamonowej (3,8 mg, 6,6 µmol, 0,31 M) zmieszano z Py-N_3 (4,1 mg, 9,8 µmol, 1,0 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (2,5 mg, 10,2 µmol, 6,3 µl, 1,62 M) i askorbinianu sodu (2,5 mg, 12,8 µmol, 9,6 µl, 1,33 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 160 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 20 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (2,2 mg, 6,0 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 4,0 mg (3,8 µmol) związku **A2-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 62%. Wydajność po oczyszczaniu: 58%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 988,2218, obliczone dla $C_{39}H_{45}N_9O_{16}P_3^-$: 988,2203.

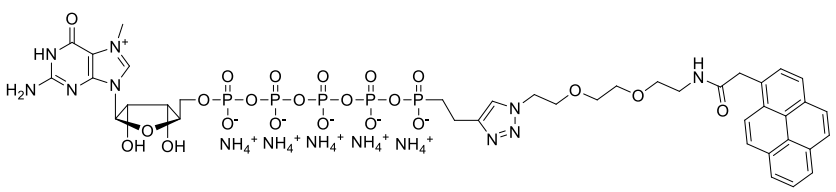
VI.1.4.3. $m^7Gp_4C_4Py$ (**A3-1**)



Roztwór wodny $m^7Gp_4C_4H_5$ (**A3**) w postaci soli trietyloamonowej (4,7 mg, 4,4 µmol, 0,17 M) zmieszano z Py-N_3 (6,0 mg, 14,4 µmol, 1,2 M) w DMSO, a następnie dodano wodne

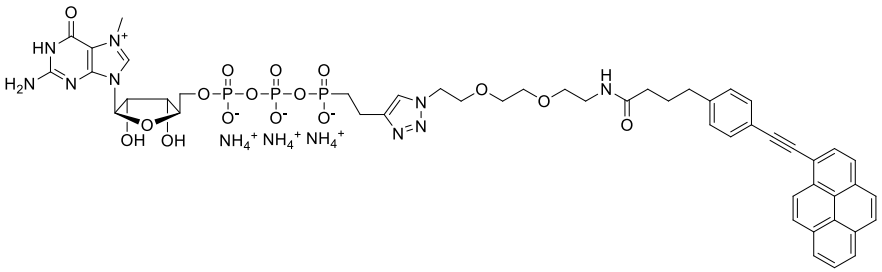
roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,3 mg, 5,2 µmol, 4,2 µl, 1,23 M) i askorbinianu sodu (1,7 mg, 8,4 µmol, 8,4 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 30 µl DMSO i 10 µl H_2O. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 h 10 min i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (2,0 mg, 5,5 µmol) i 300 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,2 mg (1,1 µmol) związku **A3-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 75%. Wydajność po oczyszczaniu: 24%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1068,1880, obliczone dla $C_{39}H_{46}N_9O_{19}P_4^-$: 1068,1866.

VI.1.4.4. $m^7Gp_5C_4Py$ (**A4-1**)



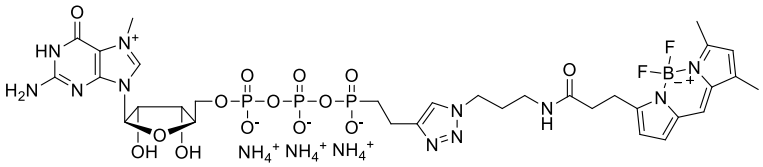
Roztwór wodny $m^7Gp_5C_4H_5$ (**A4**) w postaci soli amonowej (1,60 mg, 2,0 µmol, 0,20 M) zmieszano z Py-N_3 (3,50 mg, 8,4 µmol, 0,42 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,29 mg, 1,5 µmol, 1,5 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (0,60 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 20 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,12 mg, 3,0 µmol) i 300 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,45 mg (0,4 µmol) związku **A4-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 80%. Wydajność po oczyszczaniu: 18%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1148,1562, obliczone dla $C_{39}H_{47}N_9O_{22}P_5^-$: 1148,1529.

VI.1.4.5. $m^7Gp_3C_4PEP$ (**A2-2**)



Roztwór wodny $m^7Gp_3C_4H_5$ (**A2**) w postaci soli trietyloamonowej (1,00 mg, 1,1 µmol, 0,23 M) zmieszano z PEP-N_3 (2,70 mg, 4,6 µmol, 0,23 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,50 mg, 2,0 µmol, 2,0 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (2,60 mg, 13,1 µmol, 12,0 µl, 1,1 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 110 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,86 mg, 5,0 µmol) i 700 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika PEP-N_3 został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,06 mg (0,06 µmol) związku **A2-2** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 36%. Wydajność po oczyszczaniu: 5%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1116,2843 obliczone dla $C_{49}H_{53}N_9O_{16}P_3^-$: 1116,2829.

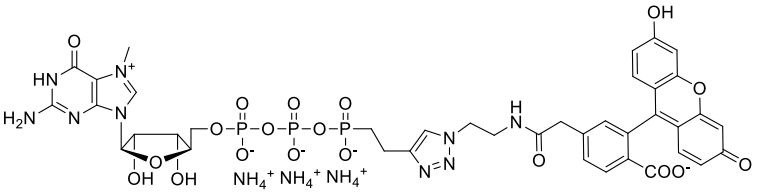
VI.1.4.6. $m^7Gp_3C_4BDP\text{-}FL$ (**A2-3**)



Roztwór wodny $m^7Gp_3C_4H_5$ (**A2**) w postaci soli trietyloamonowej (4,3 mg, 4,9 µmol, 0,07 M) zmieszano z BDP-FL-N_3 (4,6 mg, 12,3 µmol, 0,31 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 75 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (3,72 mg, 10,0 µmol) i 400 µl H_2O.

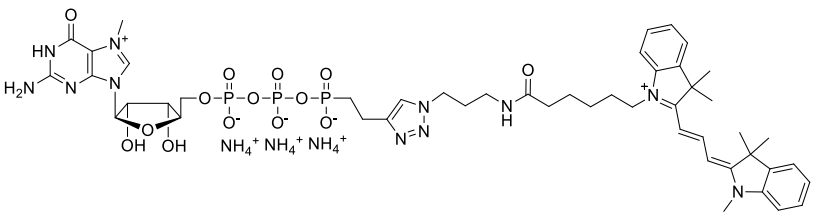
Wytrącony nadmiar barwnika BDP-FL-N_3 został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,8 mg (1,8 µmol) związku **A2-3** w postaci pomarańczowego proszku. Wydajność HPLC: 52%. Wydajność po oczyszczaniu: 37%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 946,2213 obliczone dla $C_{32}H_{42}BF_2N_{11}O_{14}P_3^-$: 946,2192.

VI.1.4.7. $m^7Gp_3C_4$(6)FAM2 (**A2-4**)



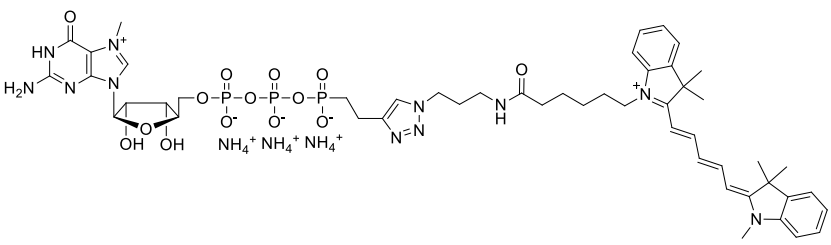
Roztwór wodny $m^7Gp_3C_4H_5$ (**A2**) w postaci soli amonowej (3,7 mg, 8,4 µmol, 0,40 M) zmieszano z (6)FAM2-N_3 (2,5 mg, 5,6 µmol, 0,28 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,68 mg, 2,7 µmol, 2,7 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,1 mg, 5,6 µmol, 5,6 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 30 µl DMSO 30 µl H_2O. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 16 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,0 mg, 2,7 µmol) i 500 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika (6)FAM-N_3 został odwirowany, a supernatant dodatkowo przemyto octanem etylu. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–60 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 2,7 mg (2,5 µmol) związku **A2-4** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 96%. Wydajność po oczyszczaniu: 43%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1016,1433 obliczone dla $C_{38}H_{37}N_9O_{19}P_3^-$: 1016,1424; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 9,10 (1H, s), 7,97 (2H, m), 7,83 (1H, s), 7,56 (1H, s), 7,12 (2H, ddd, J_1 = 9,1 Hz, J_2 = 4,3 Hz, J_3 = 1,8 Hz), 6,75 (4H, m), 5,85 (1H, d, J = 3,3 Hz), 4,61 (1H, t, J = 5,5 Hz), 4,55 (1H, t, J = 3,8 Hz), 4,46 (1H, t, J = 5,2 Hz), 4,31 (2H, m), 4,18 (1H, m), 3,95 (3H, s), 3,86 (2H, m), 2,84 (2H, m), 2,03 (2H, m); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 17,96 (1P, m), -10,60 (1P, d, J = 19,5 Hz), -21,74 (1P, dd, J_1 = 24,5 Hz, J_2 = 19,5 Hz).

VI.1.4.8. $m^7Gp_3C_4$Cy3 (**A2-5**)



Roztwór wodny $m^7Gp_3C_4H_5$ (**A2**) w postaci soli amonowej (1,80 mg, 2,1 µmol, 0,14 M) zmieszano z Cy3-N_3 (1,40 mg, 2,4 µmol, 0,52 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,00 mg, 4,0 µmol, 3,2 µl, 1,24 M) i askorbinianu sodu (1,60 mg, 8,1 µmol, 6,4 µl, 1,26 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 60 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 41 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,49 mg, 4,0 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika Cy3-N_3 został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,37 mg (0,32 µmol) związku **A2-5** w postaci czerwonego proszku. Wydajność HPLC: 40%. Wydajność po oczyszczaniu: 15%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1110,3800 obliczone dla $C_{48}H_{63}N_{11}O_{14}P_3^-$: 1110,3774.

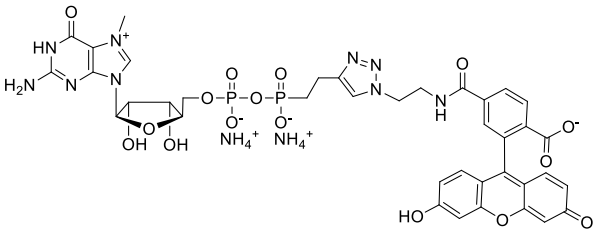
VI.1.4.9. $m^7Gp_3C_4$Cy5 (**A2-6**)



Roztwór wodny $m^7Gp_3C_4H_5$ (**A2**) w postaci soli amonowej (2,20 mg, 2,6 µmol, 0,16 M) zmieszano z Cy5-N_3 (2,10 mg, 3,5 µmol, 1,0 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,10 mg, 4,5 µmol, 3,6 µl, 1,24 M)

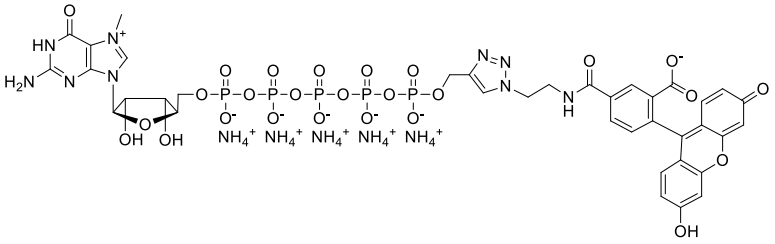
i askorbinianu sodu (3,50 mg, 17,6 µmol, 14,0 µl, 1,26 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 50 µl DMSO 10 µl H_2O. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 28 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,30 mg, 3,5 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika Cy5-N_3 został odwirowany, a supernatant poddano dodatkowo ekstrakcji octanem etylu. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,15 mg (0,13 µmol) związku **A2-6** w postaci niebieskiego proszku. Wydajność HPLC: 40%. Wydajność po oczyszczaniu: 5%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1136,3950 obliczone dla $C_{50}H_{65}N_{11}O_{14}P_3^-$: 1136,3931.

VI.1.4.10. $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2



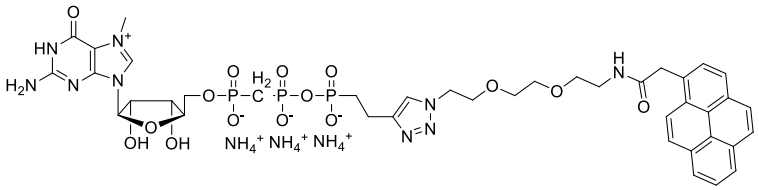
Roztwór wodny $m^7Gp_2C_4H_5$ (**A1**) w postaci soli amonowej (3,0 mg, 5,7 µmol, 0,56 M) zmieszano z (6)FAM2-N_3 (2,2 mg, 5,0 µmol, 0,25 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,7 mg, 2,7 µmol, 2,7 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,1 mg, 5,6 µmol, 5,6 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 30 µl H_2O. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 h 45 min i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,0 mg, 2,7 µmol) i 200 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika (6)FAM2-N_3 został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–60 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,8 mg (0,82 µmol) związku $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2 w postaci pomarańczowego proszku. Wydajność HPLC: 83%. Wydajność po oczyszczaniu: 16%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 936,1786 obliczone dla $C_{38}H_{36}N_9O_{16}P_2^-$: 936,1761; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 9,10 (1H, s), 8,05 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,93 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,78 (1H, s), 7,38 (1H, s), 6,96–6,93 (2H, m), 6,82 (1H, d, J = 2,1 Hz), 6,76 (1H, d, J = 2,1 Hz), 6,70–6,66 (2H, m), 5,92 (1H, d, J = 3,0 Hz), 4,70 (1H, dd, J_1 = 4,9 Hz, J_2 = 3,0 Hz), 4,58–4,53 (2H, m), 4,51 (1H, t, J = 5,5 Hz), 4,36 (1H, dd, J_1 = 5,8 Hz, J_2 = 2,4 Hz), 4,32–4,27 (1H, m), 4,25–4,20 (1H, m), 3,89 (3H, s), 3,82–3,77 (2H, m), 2,86–2,81 (2H, m), 2,02–1,95 (2H, m); ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 17,00–16,74 (1P, m, P_β), -11,49 (1P, d, J = 27,4 Hz, P_α).

VI.1.4.11. $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2



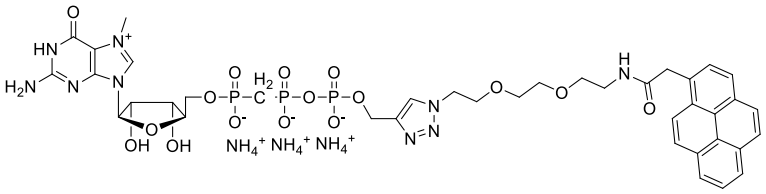
Roztwór wodny $m^7Gp_5OC_3H_3$ w postaci soli amonowej (0,65 mg, 0,80 µmol, 0,08 M) zmieszano z (5)FAM2-N_3 (0,38 mg, 0,85 µmol, 0,06 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,19 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 20 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 6 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (5,58 mg, 15,0 µmol) i 850 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika (5)FAM2-N_3 został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,54 mg (0,42 µmol) związku $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2 w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 70%. Wydajność po oczyszczaniu: 53%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1178,0561, obliczone dla $C_{37}H_{37}N_9O_{26}P_5^-$: 1178,0543.

VI.1.4.12. $m^7GpCH_2ppC_4Py$ (**B1-1**)



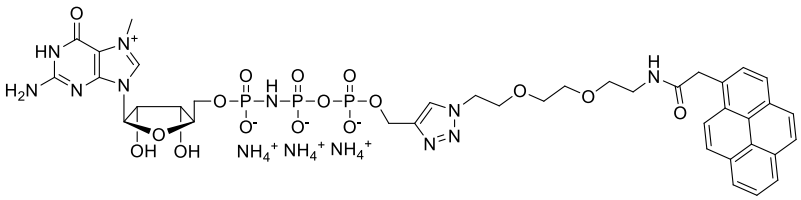
Roztwór wodny $m^7GpCH_2ppC_4H_5$ (**B1**) w postaci soli amonowej (3,6 mg, 5,7 µmol, 0,7 M) zmieszano z Py-N_3 (3,1 mg, 7,5 µmol, 1,4 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,0 mg, 5,2 µmol, 3,2 µl, 1,23 M) i askorbinianu sodu (1,3 mg, 8,4 µmol, 6,5 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 40 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,9 mg, 5,2 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,5 mg (1,5 µmol) związku **B1-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 81%. Wydajność po oczyszczaniu: 31%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 986,2436, obliczone dla $C_{40}H_{47}N_9O_{15}P_3^-$: 986,2410.

VI.1.4.13. $m^7GpCH_2ppOC_3Py$ (**B2-1**)



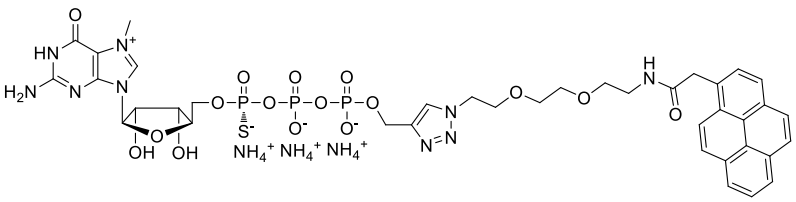
Roztwór wodny $m^7GpCH_2ppOC_3H_3$ (**B2**) w postaci soli amonowej (2,5 mg, 4,0 µmol, 0,4 M) zmieszano z Py-N_3 (3,0 mg, 7,2 µmol, 0,36 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,6 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,0 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 60 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 14 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,5 mg, 4,0 µmol) i 1 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,9 mg (0,9 µmol) związku **B2-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 82%. Wydajność po oczyszczaniu: 22%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 988,2197, obliczone dla $C_{39}H_{45}N_9O_{16}P_3^-$: 988,2203.

VI.1.4.14. $m^7GpNHppOC_3Py$ (**B3-1**)



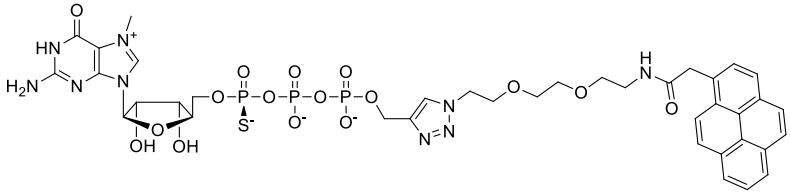
Roztwór wodny $m^7GpNHppOC_3H_3$ (**B3**) w postaci soli amonowej (1,3 mg, 2,1 µmol, 0,2 M) zmieszano z Py-N_3 (2,0 mg, 4,8 µmol, 0,10 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,3 mg, 1,5 µmol, 1,5 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (0,6 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,9 mg, 5,0 µmol) i 700 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,8 mg (0,8 µmol) związku **B3-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 80%. Wydajność po oczyszczaniu: 37%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 989,2171, obliczone dla $C_{38}H_{44}N_{10}O_{16}P_3^-$: 989,2155.

VI.1.4.15. $m^7GpSppOC_3Py$ D1 (**B4-1**)



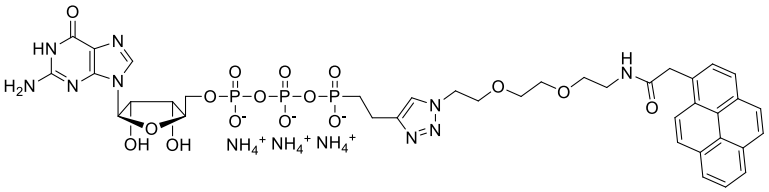
Roztwór wodny $m^7GpSppOC_3H_3$ D1 (**B4**) w postaci soli amonowej (1,60 mg, 2,5 µmol, 0,25 M) zmieszano z Py-N_3 (2,80 mg, 6,7 µmol, 0,17 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,29 mg, 1,5 µmol, 1,5 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (0,60 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,86 mg, 5,0 µmol) i 700 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,95 mg (0,9 µmol) związku **B4-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 88%. Wydajność po oczyszczaniu: 36%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1006,1781, obliczone dla $C_{38}H_{43}N_9O_{16}P_3S^-$: 1006,1767.

VI.1.4.16. $m^7GpSppOC_3Py$ D2 (**B5-1**)



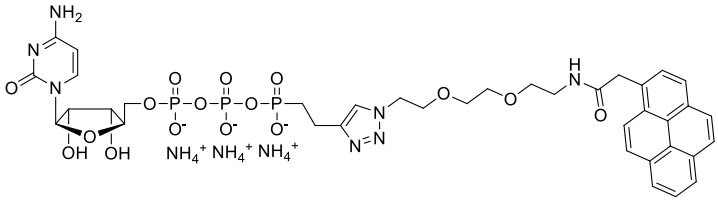
Roztwór wodny $m^7GpSppC_3H_3$ D2 (**B5**) w postaci soli amonowej (2,2 mg, 3,4 µmol, 0,34 M) zmieszano z Py-N_3 (3,0 mg, 7,2 µmol, 0,18 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,3 mg, 1,5 µmol, 1,5 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (0,6 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,9 mg, 5,0 µmol) i 700 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,8 mg (0,8 µmol) związku **B5-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 79%. Wydajność po oczyszczaniu: 24%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1006,1781, obliczone dla $C_{38}H_{43}N_9O_{16}P_3S^-$: 1006,1767.

VI.1.4.17. $GTPC_4Py$



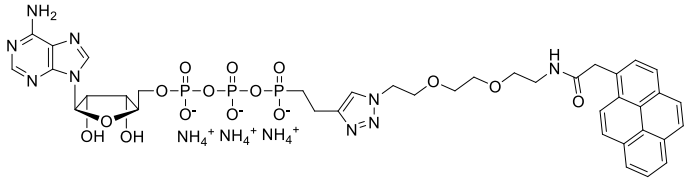
$GTPC_4H_5$ w postaci soli amonowej (2,0 mg, 3,3 µmol) zmieszano z Py-N_3 (2,1 mg, 5,0 µmol, 0,20 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,5 mg, 2,2 µmol, 1,5 µl, 1,4 M), askorbinianu sodu (1,3 mg, 6,6 µmol, 6,0 µl, 1,1 M) oraz liganda THPTA (1,4 mg, 3,2 µmol, 3,5 µl, 0,9 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (3,7 mg, 10,0 µmol) i 100 µl H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,9 mg (1,8 µmol) związku $GTPC_4Py$ w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 91%. Wydajność po oczyszczaniu: 56%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 974,2058, obliczone dla $C_{38}H_{43}N_9O_{16}P_3^-$: 974,2046.

VI.1.4.18. CTPC$_4$Py



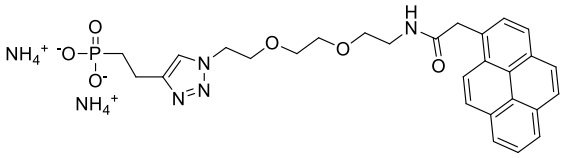
Roztwór wodny CTPC$_4$H$_5$ w postaci soli amonowej (3,6 mg, 6,3 µmol, 0,21 M) zmieszano z Py-N$_3$ (4,2 mg, 10,1 µmol, 0,25 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory CuSO$_4$·5H$_2$O (0,8 mg, 3,3 µmol, 3,3 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,3 mg, 6,6 µmol, 6,6 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C przez 18 h i zatrzymano poprzez dodanie Na$_2$EDTA (11,2 mg, 30,0 µmol) i 400 µl H$_2$O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,4 mg (1,4 µmol) związku CTPC$_4$Py w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 90%. Wydajność po oczyszczaniu: 22%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 934,2001, obliczone dla $C_{37}H_{43}N_7O_{16}P_3^-$: 934,1985.

VI.1.4.19. ATPC$_4$Py



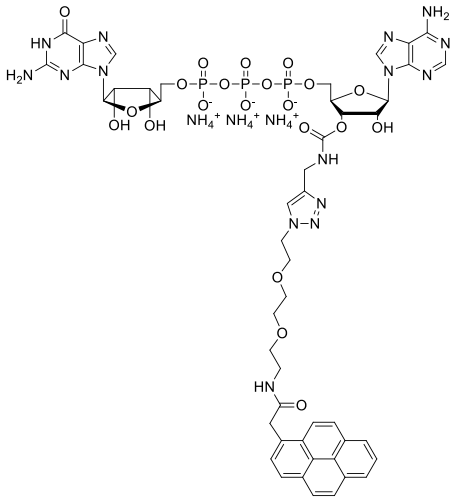
Roztwór wodny ATPC$_4$H$_5$ w postaci soli amonowej (3,8 mg, 6,4 µmol, 0,43 M) zmieszano z Py-N$_3$ (4,0 mg, 9,6 µmol, 0,24 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory CuSO$_4$·5H$_2$O (0,6 mg, 2,3 µmol, 2,3 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 5,9 µmol, 5,9 µl, 1,00 M). Do uzyskanej mieszaniny dodano 20 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C przez 20 h i zatrzymano poprzez dodanie Na$_2$EDTA (7,44 mg, 20,0 µmol) i 500 µl H$_2$O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,6 mg (1,6 µmol) związku ATPC$_4$Py w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 89%. Wydajność po oczyszczaniu: 25%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 958,2112, obliczone dla $C_{38}H_{43}N_9O_{15}P_3^-$: 958,2097.

VI.1.4.20. pC$_4$Py



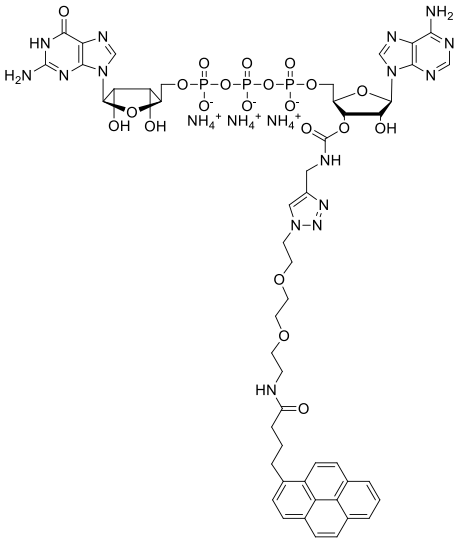
Roztwór wodny pC$_4$H$_5$ w postaci soli trietyloamoniowej (5,0 mg 50% czystego, 1,9 µmol, 0,54 M) zmieszano z Py-N$_3$ (2,1 mg, 5,0 µmol, 0,06 M) w DMSO, a następnie dodano wodne roztwory CuSO$_4$·5H$_2$O (0,90 mg, 3,6 µmol, 3,6 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,9 mg, 9,7 µmol, 9,7 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 8 dni i zatrzymano poprzez dodanie Na$_2$EDTA (3,7 mg, 10,0 µmol) i 700 µl H$_2$O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,2 mg (0,3 µmol) związku pC$_4$Py w postaci białego proszku. Wydajność po oczyszczaniu: 18%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 549,1913, obliczone dla $C_{28}H_{30}N_4O_6P^-$: 549,1908.

VI.1.4.21. Gp_3A-3'-*O*-Py (**C1-1**)



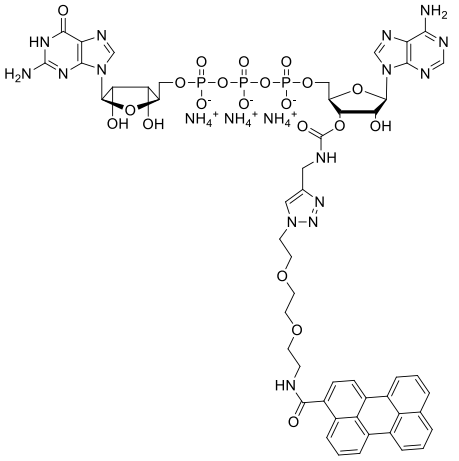
Roztwór wodny Gp_3A-3'-*O*-cp (**C1**) w postaci soli amonowej (1,0 mg, 1,1 µmol, 40 µl, 0,027 M) zmieszano z Py-N_3 (1,8 mg, 4,6 µmol, 0,087 M) w 50 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4,5 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (3,7 mg, 10 µmol) w 0,9 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,5 mg (0,38 µmol) związku **C1-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 89%. Wydajność po oczyszczaniu: 34%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1268,2778, obliczone dla $C_{48}H_{53}N_{15}O_{21}P_3^-$: 1268,2759.

VI.1.4.22. Gp_3A-3'-*O*-Py3 (**C1-2**)



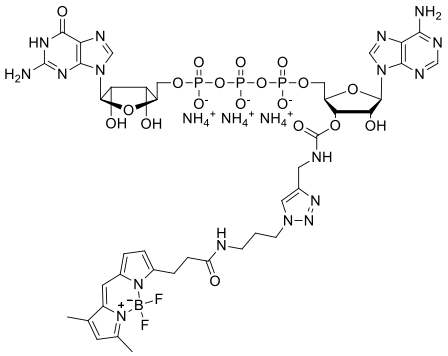
Roztwór wodny Gp_3A-3'-*O*-cp (**C1**) w postaci soli amonowej (2,2 mg, 2,4 µmol, 6 µl, 0,40 M) zmieszano z Py3-N_3 (2,0 mg, 4,5 µmol, 0,09 M) w 50 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 5,5 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol) w 0,7 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 2,0 mg (1,4 µmol) związku **C1-2** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 94%. Wydajność po oczyszczaniu: 61%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1296,3072, obliczone dla $C_{50}H_{57}N_{15}O_{21}P_3^-$: 1296,3072.

VI.1.4.23. Gp_3A-3'-*O*-Pe (**C1-3**)



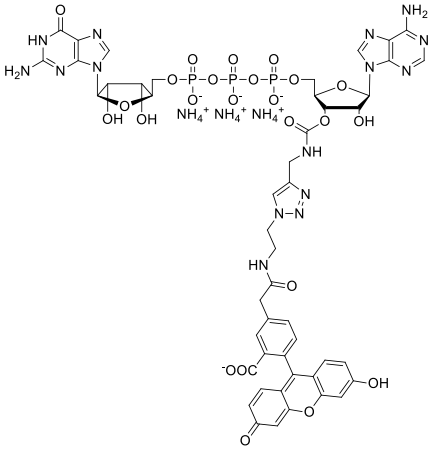
Gp_3A-3'-*O*-cp (**C1**) w postaci soli amonowej (0,7 mg, 0,77 µmol) zmieszano z Pe-N_3 (1,3 mg, 2,9 µmol, 0,057 M) w 50 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 22 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol) w 0,4 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika perylenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,1 mg (0,08 µmol) związku **C1-3** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 85%. Wydajność po oczyszczaniu: 10,5%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1304,2762, obliczone dla $C_{51}H_{53}N_{15}O_{21}P_3^-$: 1304,2759.

VI.1.4.24. Gp$_3$A-3'*O*-BDP-FL (**C1-4**)



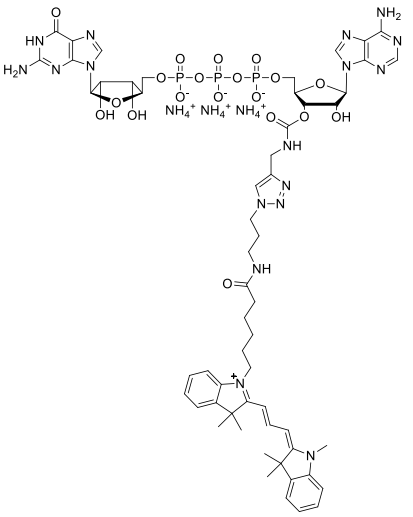
Roztwór wodny Gp$_3$A-3'-*O*-cp (**C1**) w postaci soli amonowej (1,00 mg, 1,1 µmol, 40 µl, 0,03 M) zmieszano z BDP-FL-N$_3$ (2,00 mg, 5,3 µmol, 0,11 M) w 50 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,20 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 7,5 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (5,6 mg, 15 µmol) w 0,95 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika BDP-FL-N$_3$ został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,75 mg (0,59 µmol) związku **C1-4** w postaci pomarańczowego proszku. Wydajność HPLC: 93%. Wydajność po oczyszczaniu: 53%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 1226,2768, obliczone dla $C_{41}H_{50}BF_2N_{17}O_{19}P_3^-$: 1226,2748.

VI.1.4.25. Gp$_3$A-3'*O*-(5)FAM2 (**C1-5**)



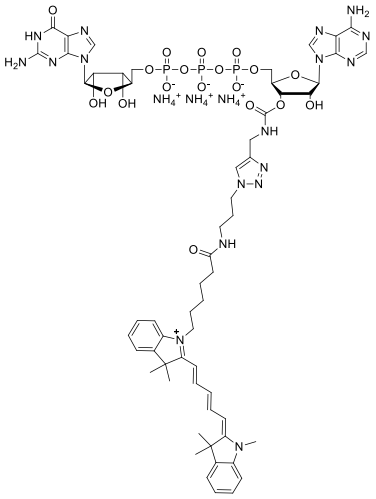
Gp$_3$A-3'-*O*-cp (**C1**) w postaci soli amonowej (0,70 mg, 0,77 µmol) zmieszano z (5)FAM2-N$_3$ (0,70 mg, 1,58 µmol, 0,05 M) w 30 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,20 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,54 mg (0,4 µmol) związku **C1-5** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 83%. Wydajność po oczyszczaniu: 52%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 1296,1993, obliczone dla $C_{47}H_{45}N_{15}O_{24}P_3^-$: 1296,1980.

VI.1.4.26. Gp$_3$A-3'*O*-Cy3 (**C1-6**)



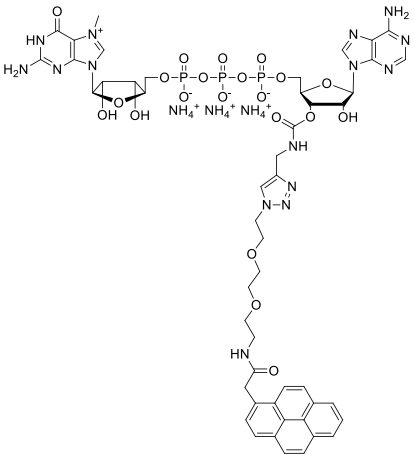
Roztwór wodny Gp$_3$A-3'-*O*-cp (**C1**) w postaci soli amonowej (0,85 mg, 0,94 µmol, 10 µl, 0,09 M) zmieszano z Cy3-N$_3$ (1,20 mg, 2,1 µmol, 0,05 M) w 40 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,20 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 21 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol) w 0,7 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika cyjaninowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,12 mg (0,08 µmol) związku **C1-6** w postaci czerwonego proszku. Wydajność HPLC: 79%. Wydajność po oczyszczaniu: 9%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 1390,4354, obliczone dla $C_{57}H_{71}N_{17}O_{19}P_3^-$: 1390,4330.

VI.1.4.27. Gp_3A-3'-*O*-Cy5 (**C1-7**)



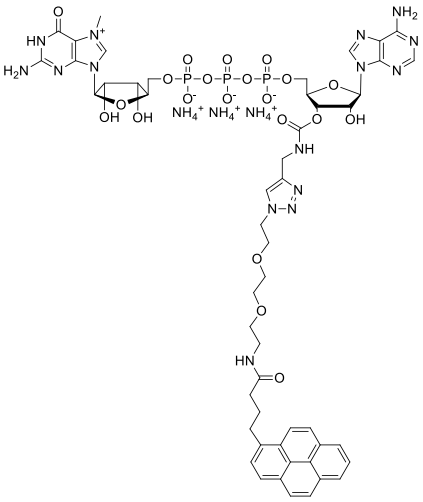
Gp_3A-3'-*O*-cp (**C1**) w postaci soli amonowej (1,1 mg, 1,21 µmol) zmieszano z Cy5-N_3 (2,5 mg, 4,16 µmol, 0,08 M) w 50 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,8 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol) w 0,4 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika cyjaninowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,2 mg (0,12 µmol) związku **C1-7** w postaci niebieskiego proszku. Wydajność HPLC: 72%. Wydajność po oczyszczaniu: 10%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1416,4506, obliczone dla $C_{59}H_{73}N_{17}O_{19}P_3^-$: 1416,4487.

VI.1.4.28. m^7Gp_3A-3'-*O*-Py (**C2-1**)



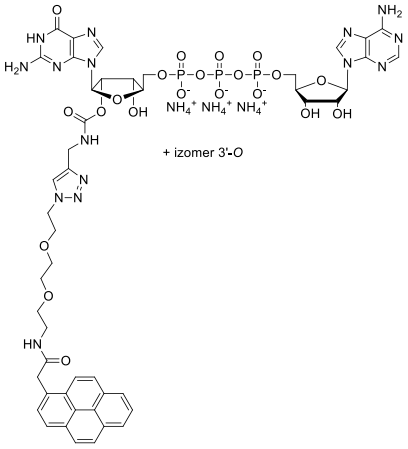
Roztwór wodny m^7Gp_3A-3'-*O*-cp (**C2**) w postaci soli amonowej (0,50 mg, 0,54 µmol, 10 µl, 0,54 M) zmieszano z Py-N_3 (2,00 mg, 4,8 µmol, 0,07 M) w 70 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,20 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4,5 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (5,6 mg, 15 µmol) w 0,95 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,48 mg (0,31 µmol) związku **C2-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 65%. Wydajność po oczyszczaniu: 43%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1282,2929, obliczone dla $C_{49}H_{55}N_{15}O_{21}P_3^-$: 1282,2915.

VI.1.4.29. m^7Gp_3A-3'-*O*-Py3 (**C2-2**)



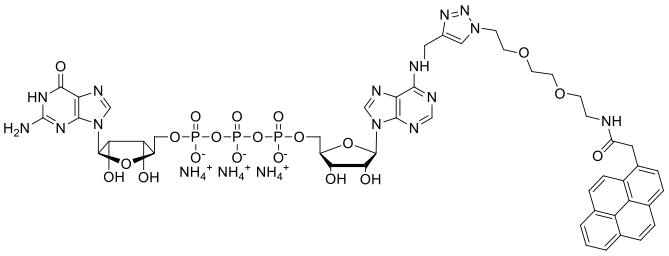
Roztwór wodny m^7Gp_3A-3'-*O*-cp (**C2**) w postaci soli amonowej (0,3 mg, 0,36 µmol, 0,07 M) zmieszano z Py3-N_3 (0,6 mg, 1,4 µmol, 0,03 M) w 50 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,8 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol) w 0,7 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,2 mg (0,15 µmol) związku **C2-2** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 88%. Wydajność po oczyszczaniu: 41%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1311,3257, obliczone dla $C_{52}H_{61}N_{15}O_{20}P_3^-$: 1311,3301.

VI.1.4.30. 2'-*O*/3'-*O*-Py-Gp$_3$A (**C3-1**)



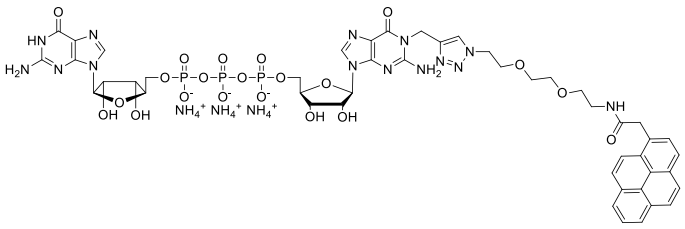
2'-*O*/3'-*O*-cp-Gp$_3$A (**C3**) w postaci soli amonowej (0,5 mg, 0,55 µmol) zmieszano z Py-N$_3$ (1,5 mg, 3,6 µmol, 0,07 M) w 50 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,8 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 20 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol) w 0,7 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,2 mg (0,16 µmol) związku **C3-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 92%. Wydajność po oczyszczaniu: 28%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1268,2759, obliczone dla $C_{48}H_{53}N_{15}O_{21}P_3^-$: 1268,2759.

VI.1.4.31. Gp$_3$A(N6)-Py (**C4-1**)



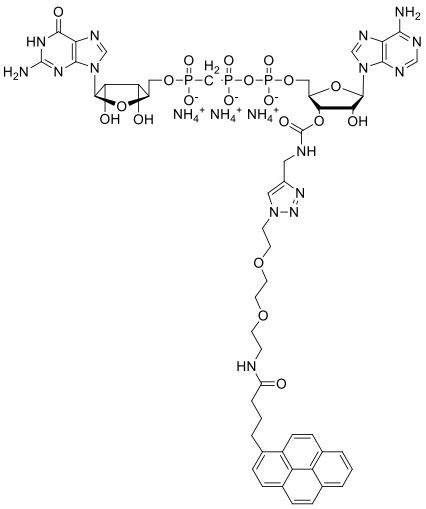
Roztwór wodny Gp$_3$A(N6)prop (**C4**) w postaci soli amonowej (1,50 mg, 1,8 µmol, 0,06 M) zmieszano z Py-N$_3$ (1,20 mg, 2,9 µmol, 0,10 M) w 30 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,38 mg, 1,5 µmol, 1,5 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (0,60 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol) w 0,7 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,82 mg (0,64 µmol) związku **C4-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 96%. Wydajność po oczyszczaniu: 37%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1225,2700, obliczone dla $C_{47}H_{52}N_{14}O_{20}P_3^-$: 1225,2701.

VI.1.4.32. Gp$_3$G(N1)-Py (**C5-1**)



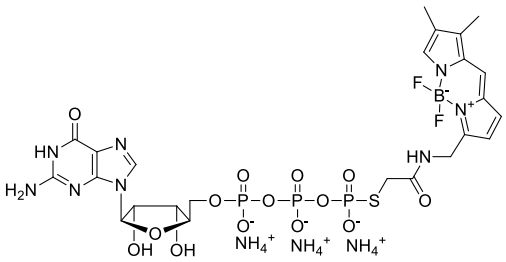
Roztwór wodny Gp$_3$G(N1)prop (**C5**) w postaci soli trietyloamonowej (1,70 mg, 1,9 µmol, 0,04 M) zmieszano z Py-N$_3$ (1,80 mg, 4,3 µmol, 0,10 M) w 45 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,38 mg, 1,5 µmol, 1,5 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (0,60 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (7,40 mg, 20,0 µmol) w 0,7 ml H_2O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,05 mg (0,82 µmol) związku **C5-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 92%. Wydajność po oczyszczaniu: 42%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1241,2653, obliczone dla $C_{47}H_{52}N_{14}O_{21}P_3^-$: 1241,2650.

VI.1.4.33. GpCH$_2$ppA-3'-*O*-Py3 (**C6-1**)



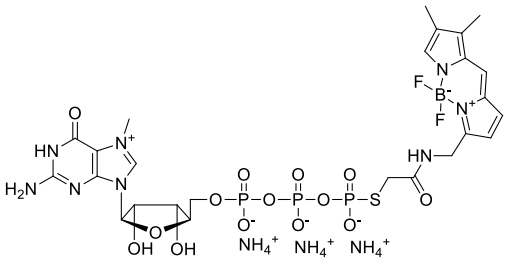
GpCH$_2$ppA-3'-*O*-cp (**C6**) w postaci soli amonowej (0,70 mg, 0,78 µmol) zmieszano z Py3-N$_3$ (1,8 mg, 4,3 µmol, 0,10 M) w 45 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory CuSO$_4$·5H$_2$O (0,38 mg, 1,5 µmol, 1,5 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (0,60 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 h i zatrzymano poprzez dodanie Na$_2$EDTA (7,40 mg, 20,0 µmol) w 0,7 ml H$_2$O. Wytrącony nadmiar barwnika pirenowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,82 mg (0,61 µmol) związku **C6-1** w postaci białego proszku. Wydajność HPLC: 92%. Wydajność po oczyszczaniu: 78%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 1294,3286, obliczone dla $C_{51}H_{59}N_{15}O_{20}P_3^-$: 1294,3279.

VI.1.4.34. GTP$_\gamma$SBDP-FL (**D1-1**)



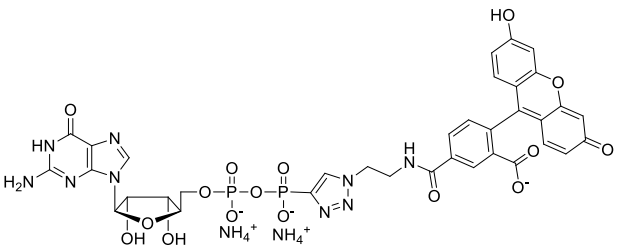
GTP$_\gamma$S (**D1**) w postaci soli trietyloamonowej (7,5 mg, 8,9 µmol) zmieszano z jodoacetamidem BDP-FL (1,0 mg, 2,4 µmol) w 113 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 h 15 min i zatrzymano poprzez dodanie 1 ml H$_2$O. Wytrącone pozostałości barwnika zostały odwirowane. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,5 mg (1,7 µmol) związku **D1-1** w postaci pomarańczowego proszku. Wydajność HPLC: 100%. Wydajność po oczyszczaniu: 71%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 827,0821, obliczone dla $C_{24}H_{29}BF_2N_8O_{13}P_3S^-$: 827,0803.

VI.1.4.35. m^{7}GTP$_\gamma$SBDP-FL (**D2-1**)



m^{7}GTP$_\gamma$S (**D2**) w postaci soli trietyloamonowej (7,5 mg, 8,8 µmol) zmieszano z jodoacetamidem BDP-FL (1,0 mg, 2,4 µmol) w 113 µl DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 h i zatrzymano poprzez dodanie 0,85 ml H$_2$O. Wytrącone pozostałości barwnika zostały odwirowane. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,5 mg (0,6 µmol) związku **D2-1** w postaci pomarańczowego proszku. Wydajność HPLC: 58%. Wydajność po oczyszczaniu: 25%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 841,0976, obliczone dla $C_{25}H_{31}BF_2N_8O_{14}P_3S^-$: 841,0960.

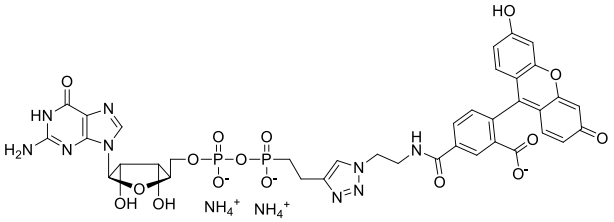
VI.1.4.36. Gp$_2$C$_2$(5)FAM2 (**D3-1**)



Roztwór wodny Gp$_2$C$_2$H (**D3**) w postaci soli trietyloamonowej (3,0 mg, 4,6 µmol, 0,17 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoetylo)-fluoresceiny (5)FAM2-N$_3$ (2,8 mg, 6,3 µmol, 0,18 M) w 35 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory CuSO$_4$·5H$_2$O (0,6 mg, 2,4 µmol, 2,4 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (0,9

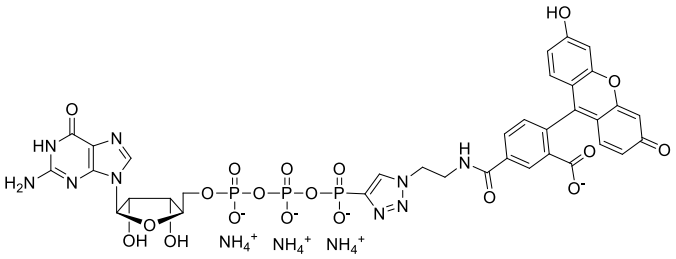
mg, 4,6 µmol, 4,6 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (0,85 mg, 2,3 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,2 mg (1,3 µmol) związku **D3-1** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 77%. Wydajność po oczyszczaniu: 28%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 849,1303, obliczone dla $C_{35}H_{30}N_9O_{16}P_2^-$: 849,1291.

VI.1.4.37. Gp_2C_4(5)FAM2 (**D4-1**)



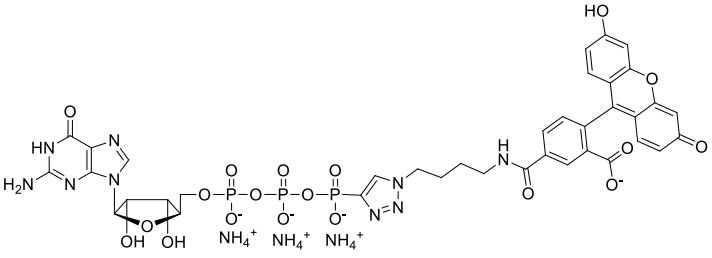
Roztwór wodny $Gp_2C_4H_5$ (**D4**) w postaci soli trietyloamonowej (4,7 mg, 6,6 µmol, 0,20 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoetylo)-fluoresceiny (5)FAM2-N_3 (3,2 mg, 7,2 µmol, 0,09 M) w 80 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,6 mg, 6,4 µmol, 6,4 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (2,8 mg, 14,1 µmol, 14,1 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2,5 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (2,4 mg, 6,4 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 2,1 mg (2,2 µmol) związku **D4-1** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 69%. Wydajność po oczyszczaniu: 32%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 922,1620, obliczone dla $C_{37}H_{34}N_9O_{16}P_2^-$: 922,1604.

VI.1.4.38. Gp_3C_2(5)FAM2 (**D5-1**)



Roztwór wodny Gp_3C_2H (**D5**) w postaci soli trietyloamonowej (4,1 mg, 4,9 µmol, 0,27 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoetylo)-fluoresceiny (5)FAM2-N_3 (3,3 mg, 7,4 µmol, 0,3 M) w 25 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,6 mg, 2,3 µmol, 2,3 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,0 mg, 5,0 µmol, 5,0 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (0,85 mg, 2,3 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,1 mg (1,1 µmol) związku **D5-1** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 87%. Wydajność po oczyszczaniu: 22%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 974,0970, obliczone dla $C_{35}H_{31}N_9O_{19}P_3^-$: 974,0955.

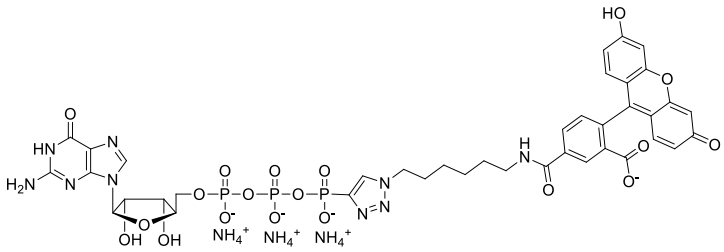
VI.1.4.39. Gp_3C_2(5)FAM4 (**D5-2**)



Roztwór wodny Gp_3C_2H (**D5**) w postaci soli trietyloamonowej (1,1 mg, 1,3 µmol, 0,14 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydobutylo)-fluoresceiny (5)FAM4-N_3 (0,7 mg, 1,5 µmol, 0,05 M) w 30 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 5 h i zatrzymano poprzez dodanie 400µl wodnego roztworu Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-

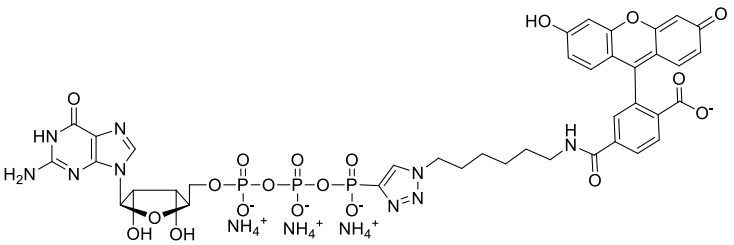
preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–60 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,2 mg (0,2 µmol) związku **D5-2** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 91%. Wydajność po oczyszczaniu: 16%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 500,5591 (z = 2), obliczone dla $C_{37}H_{35}N_9O_{19}P_3^{2-}$: 500,5597 (z = 2).

VI.1.4.40. Gp_3C_2(5)FAM6 (**D5-3**)



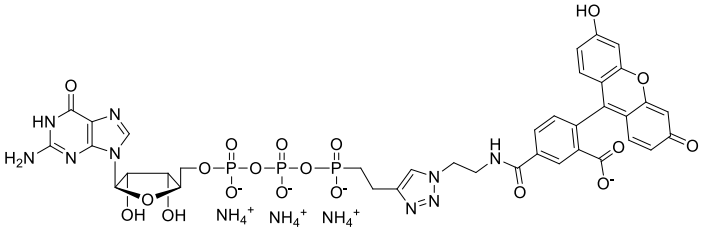
Roztwór wodny Gp_3C_2H (**D5**) w postaci soli trietyloamonowej (1,1 mg, 1,3 µmol, 0,14 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoheksylo)-fluoresceiny (5)FAM6-N_3 (0,9 mg, 1,8 µmol, 0,05 M) w 35 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (0,8 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 5 h i zatrzymano poprzez dodanie 400µl wodnego roztworu Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–60 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,1 mg (0,1 µmol) związku **D5-3** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 51%. Wydajność po oczyszczaniu: 7%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 514,5747 (z = 2), obliczone dla $C_{39}H_{39}N_9O_{19}P_3^{2-}$: 514,5754 (z = 2).

VI.1.4.41. Gp_3C_2(6)FAM6 (**D5-4**)



Roztwór wodny Gp_3C_2H (**D5**) w postaci soli trietyloamonowej (1,0 mg, 1,2 µmol, 0,13 M) zmieszano z amidem 6-*N*-(2-azydoheksylo)-fluoresceiny (6)FAM6-N_3 (1,2 mg, 2,4 µmol, 0,07 M) w 35 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (0,8 mg, 3,0 µmol, 3,0 µl, 1,00 M) i askorbinianu sodu (1,2 mg, 6,0 µmol, 6,0 µl, 1,00 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 5 h i zatrzymano poprzez dodanie 400µl wodnego roztworu Na_2EDTA (7,4 mg, 20 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–60 min; kolumna Grace Vision HT C18 HL). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,1 mg (0,1 µmol) związku **D5-4** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 40%. Wydajność po oczyszczaniu: 8%. HR MS (-)ESI zmierzone *m*/*z*: 514,5747 (z = 2), obliczone dla $C_{39}H_{39}N_9O_{19}P_3^{2-}$: 514,5754 (z = 2).

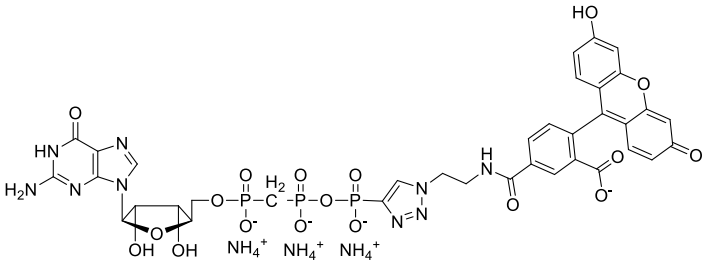
VI.1.4.42. Gp_3C_4(5)FAM2 (**D6-1**)



Roztwór wodny $Gp_3C_4H_5$ (**D6**) w postaci soli trietyloamonowej (4,6 mg, 5,4 µmol, 0,3 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoetylo)-fluoresceiny (5)FAM2-N_3 (3,6 mg, 7,9 µmol, 0,3 M) w 26 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (0,7 mg, 2,8 µmol, 2,8 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,1 mg, 5,6 µmol, 5,6 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 h i zatrzymano poprzez dodanie Na_2EDTA (1,0 mg, 2,8 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: 70% eluentu A/30% ACN; gradient liniowy 0–50% w czasie 0–240 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat

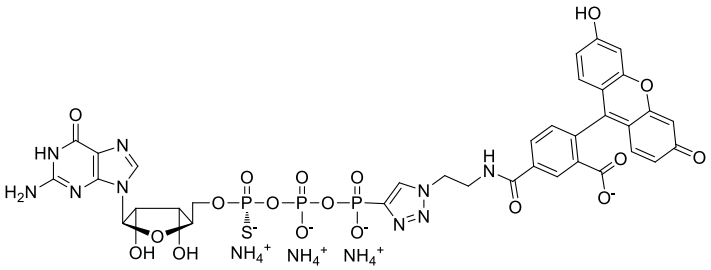
został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,9 mg (1,8 µmol) związku **D6-1** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 98%. Wydajność po oczyszczaniu: 34%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 1002,1281, obliczone dla $C_{37}H_{35}N_9O_{19}P_3^-$: 1002,1268.

VI.1.4.43. GpCH$_2$ppC$_2$(5)FAM2 (**D7-1**)



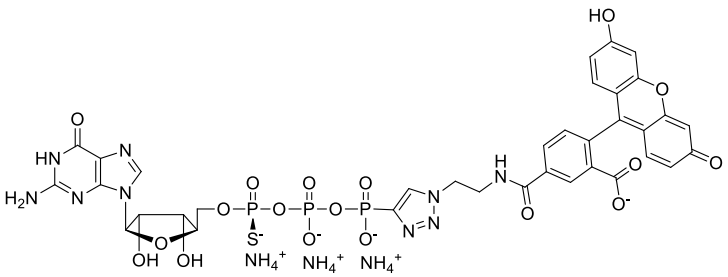
Roztwór wodny GpCH$_2$ppC$_2$H (**D7**) w postaci soli amonowej (4,0 mg, 6,9 µmol, 0,2 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoetylo)-fluoresceiny (5)FAM2-N$_3$ (2,1 mg, 4,7 µmol, 0,3 M) w 40 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,8 mg, 7,2 µmol, 7,2 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (2,9 mg, 14,5 µmol, 14,5 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 7 h i zatrzymano poprzez dodanie Na$_2$EDTA (3,7 mg, 10,0 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem semi-preparatywnego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: ACN; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–120 min; kolumna Discovery RP Amide C-16). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 1,0 mg (1,0 µmol) związku **D7-1** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 62%. Wydajność po oczyszczaniu: 21%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 972,1159, obliczone dla $C_{36}H_{33}N_9O_{18}P_3^-$: 972,1162.

VI.1.4.44. Gp$_S$ppC$_2$(5)FAM2 D1 (**D8-1**)



Roztwór wodny Gp$_S$ppC$_2$H D1 (**D8**) w postaci soli amonowej (1,5 mg, 2,5 µmol, 0,1 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoetylo)-fluoresceiny (5)FAM2-N$_3$ (1,2 mg, 2,8 µmol, 0,5 M) w 5,4 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,2 mg, 0,9 µmol, 0,9 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (0,4 mg, 1,8 µmol, 1,8 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h i zatrzymano poprzez dodanie Na$_2$EDTA (0,3 mg, 0,9 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: MeOH; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,2 mg (0,2 µmol) związku **D8-1** w postaci żółtego proszku. Wydajność HPLC: 41%. Wydajność po oczyszczaniu: 9%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 494,5320 (z = 2), obliczone dla $C_{35}H_{30}N_9O_{18}P_3S^{2-}$: 494,5327 (z = 2).

VI.1.4.45. Gp$_S$ppC$_2$(5)FAM2 D2 (**D9-1**)

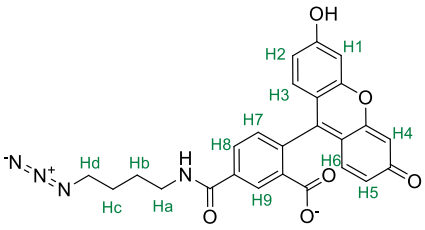


Roztwór wodny Gp$_S$ppC$_2$H D2 (**D9**) w postaci soli amonowej (2,8 mg, 4,7 µmol, 0,2 M) zmieszano z amidem 5-*N*-(2-azydoetylo)-fluoresceiny (5)FAM2-N$_3$ (1,8 mg, 4,0 µmol, 0,9 M) w 4,5 µl DMSO, a następnie dodano wodne roztwory $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,0 mg, 4,0 µmol, 4,0 µl, 1,0 M) i askorbinianu sodu (1,6 mg, 8,0 µmol, 8,0 µl, 1,0 M). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 h i zatrzymano poprzez dodanie Na$_2$EDTA (1,5 mg, 4,0 µmol). Wytrącony nadmiar barwnika fluoresceinowego został odwirowany. Produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem analitycznego RP HPLC (Eluent A: 0,05 M bufor octanu amonu pH 5,9, Eluent B: MeOH; gradient liniowy 0–100% w czasie 0–15 min; kolumna (RP)Supelcosil LC-18-T). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 0,3 mg (0,3 µmol) związku **D9-1** w postaci

żółtego proszku. Wydajność HPLC: 68%. Wydajność po oczyszczaniu: 7,5%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 494,5320 (z = 2), obliczone dla $C_{35}H_{30}N_9O_{18}P_3S^{2-}$: 494,5327 (z = 2).

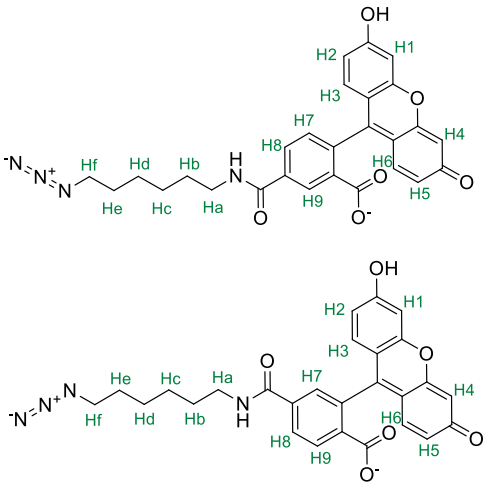
VI.1.5. Znaczniki fluorescencyjne

VI.1.5.1. (5)FAM4-N_3



Mieszaninę 5- i 6-karboksyfluoresceiny (42,0 mg, 112,0 µmol) rozpuszczono w 0,45 ml DMSO, po czym dodano TEA (21 µl, 150,0 µmol) i TSTU (116,0 mg, 313,0 µmol). Reakcję mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie dodano 1-azydo-4-butanoaminę (35 µl, 313,0 µmol) i prowadzono reakcję przez 20 h. Produkty reakcji ((5)FAM4-N_3 i (6)FAM4-N_3) oczyszczono wstępnie z wykorzystaniem preparatywnej płytki TLC (warunki rozdziału: chloroform:metanol 4:1, elucja ze zdrapanego złoża metanolem). Odparowano metanol, a powstały pomarańczowy proszek rozpuszczono w roztworze H_2O:ACN w stosunku 7:3. Izomer 5 FAM4-N_3 wyizolowano z użyciem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforu octanu amonu pH 5,9/30% ACN; kolumna Grace Vision HT C18). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany. Otrzymano 6,4 mg (13,4 µmol) związku (5)FAM4-N_3 w postaci pomarańczowego proszku. Wydajność HPLC: 55%. Wydajność po oczyszczaniu: 24%. HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 471,1311, obliczone dla $C_{25}H_{19}N_4O_6^-$: 471,1300; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 10,15 (br, 2H, s, OH), 8,94 (1H, d, J = 5,6 Hz, NH), 8,56 (1H, d, J = 1,4 Hz, H9), 8,32 (1H, dd, J_1 = 8,0 Hz, J_2= 1,4 Hz, H8), 7,46 (1H, d, J = 8,0 Hz, H7), 6,77 (d, J = 2,3 Hz, 2H, H1, H4), 6,69 (2H, d, J = 8,7 Hz, H3, H6), 6,64 (2H, dd, J_1 = 8,7 Hz, J_2 = 2,3 Hz, H2, H5), 3,49 (2H, m, Ha), 1,72 (4H, m, Hb, Hd), 1,60 (2H, m Hc).

VI.1.5.2. (5)FAM6-N_3 i (6)FAM6-N_3



Mieszaninę 5- i 6-karboksyfluoresceiny (37,0 mg, 98,0 µmol) rozpuszczono w 0,45 ml DMSO, po czym dodano TEA (35 µl, 252,0 µmol) i TSTU (141,0 mg, 468,0 µmol). Reakcję mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie dodano 1-azydo-6-heksanoaminę (35 µl, 251,0 µmol) i prowadzono reakcję przez 48 h. Produkty reakcji ((5)FAM6-N_3 i (6)FAM6-N_3) oczyszczono wstępnie z wykorzystaniem preparatywnej płytki TLC (warunki rozdziału: chloroform:metanol 4:1, elucja ze zdrapanego złoża metanolem). Odparowano metanol, a powstały pomarańczowy proszek rozpuszczono w roztworze H_2O:ACN w stosunku 7:3. Następnie rozdzielono izomery z użyciem semi-preparatywnego RP HPLC (elucja izokratyczna 0,05 M buforu octanu amonu pH 5,9/30% ACN; kolumna Grace Vision HT C18). Zebrany eluat został kilkukrotnie zliofilizowany z uzyskaniem 1,3 mg (2,6 µmol) związku (5)FAM6-N_3 i 1,7 mg (3,4 µmol) (6)FAM6-N_3 w postaci pomarańczowych proszków. Wydajność HPLC: (5)FAM6-N_3 –53%, (6)FAM6-N_3 – 40%. Wydajność po oczyszczaniu: (5)FAM6-N_3 –5,5%, (6)FAM6-N_3 – 7%.

(5)FAM6-N_3: HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 499,1628, obliczone dla $C_{27}H_{24}N_4O_6^-$: 499,1623; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 10,32 (br, 1H, s, OH), 9,47 (br, 1H, s, OH), 8,87 (1H, t, J = 5,5 Hz, NH), 8,55 (1H, d, J = 1,1 Hz, H9), 8,26 (1H, d, J = 8,0 Hz, H8), 7,43 (1H, d, J = 8,0 Hz, H7), 6,70 (4H, m, H1, H3, H4, H6), 6,59 (2H, d, J = 8,4 Hz, H2, H5), 3,43 (4H, m, Ha, Hf), 1,66 (4H, m, Hb, He), 1,47 (4H, m, Hc, Hd).

(6)FAM6-N_3: HR MS (-)ESI zmierzone *m/z*: 499,1626, obliczone dla $C_{27}H_{24}N_4O_6^-$: 499,1623;^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 10,29 (br, 1H, s, OH), 9,31(br, 1H, s, OH), 8,74 (1H, t, J = 5,5 Hz, NH), 8,23 (1H, dd, J_1 = 8,1, J_2 = 1,1 Hz, H8), 8,16 (1H, d, J = 8,1 Hz, H9), 7,75 (1H, s, H7), 6,73 (2H, m, H1, H4), 6,70 (2H, d, J = 8,8 Hz, H3, H6), 6,61 (2H, dd, J_1 = 8,8 Hz, J_2 = 2,3 Hz, H2, H5), 3,38 (2H, t, J = 7,1 Hz, Ha), 3,29 (2H, q, J = 7,1 Hz, Hf), 1,58 (4H, p, J = 7,1 Hz, Hb, He), 1,38 (4H, m, Hc, Hd).

VI.2. Synteza modyfikowanych nanomateriałów

Wszystkie rozpuszczalniki, reagenty chemiczne oraz grafit wykorzystane w syntezie zostały zakupione z Sigma Aldrich i wykorzystane bez obróbki wstępnej.

VI.2.1. Synteza tlenku grafenu (GO)

Grafit w postaci proszku < 45 μm (0,3 g) zawieszono w mieszaninie 4 ml 85% H_3PO_4 i 36 ml 95–98% H_2SO_4 w kolbie o objętości 250 ml. Następnie powoli, porcjami dodano $KMnO_4$ (1,8 g). Kolbę umieszczono w łaźni wodnej w temperaturze 50°C. Reakcję prowadzono przez noc i zakończono poprzez dodanie 250 ml 30% H_2O_2. Osad został odwirowany i przemyty wielokrotnie wodą do pH 7 zawiesiny wodnej. Następnie przeprowadzono dializę 100 mg GO w 5 ml wody. Roztwór poddano sonikacji, a następnie umieszczono w szczelnie zamkniętym woreczku do dializy. Woreczek przeniesiono do 500 ml zlewki z wodą, którą wymieniano po 1,5 oraz 14 h. Po 30 h roztwór z woreczka został odwirowany, a osad przemyty kilkukrotnie wodą. Otrzymano w ten sposób tlenek grafenu (GO) w postaci brązowego proszku.

VI.2.2. Synteza GO modyfikowanego grupą alkinową(GO-alkynyl)

Tlenek grafenu GO (10,7 mg) zawieszono w DMF (5 ml) i sonikowano przez 1h w łaźni wodnej w temperaturze 30°C, po czym dodano propargiloaminę (27 mg, 31 μl). Następnie dodawano porcjami DCC (400 mg) oraz DMAP (30 mg) przez 30 min. Reakcję prowadzono przez 16 h w temperaturze pokojowej, po czym zakończono ją poprzez dodanie 3 ml DMF odwirowanie oraz kilkukrotne przemycie wodą. Po liofilizacji uzyskano GO-alkynyl w postaci brązowego proszku.

VI.2.3. Synteza GO modyfikowanego grupą azydkową (GO-N_3)

Tlenek grafenu GO (16 mg) zawieszono w H_2O (16 ml) oraz poddano sonikacji przez 45 min w łaźni wodnej w temperaturze 30°C. Następnie mieszaninę schłodzono do 10°C i dodano NaN_3 (12,8 mg). Reakcję prowadzono przez 1 h, a następnie poddano liofilizacji w celu odparowania rozpuszczalnika. Uzyskany proszek zawieszono ponownie w wodzie, a osad odwirowano wraz z pięciokrotnym przemywaniem zimną wodą. Po liofilizacji uzyskano GO-N_3 w postaci brązowego proszku.

VI.2.4. Synteza GO modyfikowanego grupą azydkową na brzegach płatków ($GOpN_3$)

Tlenek grafenu GO (5 mg) zawieszono w 670 μl H_2O (7,5 mg/ml), a następnie dodano 1-azydo-3-propanoaminę (50 mg), EDC (32 mg) i NHS (16 mg). Reakcję prowadzono przez 24 h w temperaturze pokojowej. Następnie odwirowano osad i pięciokrotnie przemywano go wodą. Po ostatnim wirowaniu produkt zawieszono w wodzie i zliofilizowano. Otrzymano $GOpN_3$ w postaci brązowego proszku.

VI.2.5. Synteza koniugatu GO z m^7GTP

Bromek miedzi (I) CuBr (12 mg, 83,6 μmol) oraz TBTA (10 mg, 18,8 μmol) rozpuszczono w DMF (0,4 ml) i inkubowano w temperaturze 30°C przez 30 min z mieszaniem 800 rpm. Następnie dodano analog m^7GTP modyfikowany grupą propargilową $m^7GTPOC_3H_3$ w postaci soli amonowej (3,5 mg, 5,6 μmol) oraz utleniony grafen modyfikowany grupą azydkową na brzegach płatków $GOpN_3$ (1,5 mg). Reakcję prowadzono przez 5 h w temperaturze 60°C w atmosferze argonu. Osad odwirowano oraz inkubowano w DMF (12 ml) w 37°C przez noc, w celu pozbycia się resztek CuBr. Po odwirowaniu osadu oraz liofilizacji otrzymano koniugat GO z $m^7GTPOC_3H_3$ (GO-m^7GTP) w postaci czarnego proszku. Brak substratu nukleotydowego w supernatancie potwierdzono poprzez rejestrację profilu RP HPLC.

VI.2.6. Synteza koniugatu GO z GTP

Tlenek grafenu modyfikowany grupą azydkową na brzegach $GOpN_3$ (1 mg) zawieszono w DMF (0,3 ml), a następnie dodano analog GTP modyfikowany grupą propargilową $GTPOC_3H_3$ w postaci soli amonowej (3,8 mg, 6,8 μmol), bromek miedzi (I) (12 mg, 83,6 μmol) oraz TBTA (11 mg, 20,7 μmol). Reakcję prowadzono przez 2,5 h w temperaturze 60°C w atmosferze argonu. Osad odwirowano oraz inkubowano w DMF (12 ml) w 37°C przez noc, w celu pozbycia się resztek CuBr. Po odwirowaniu osadu oraz

liofilizacji otrzymano koniugat GO z $GTPOC_3H_3$ (GO-GTP) w postaci czarnego proszku. Brak substratu nukleotydowego w supernatancie potwierdzono poprzez rejestrację profilu RP HPLC.

VI.3. Materiały biologiczne

VI.3.1. eIF4E

Białko eIF4E stosowane w badanich zostało otrzymane oraz oczyszczone przez mgr Katarzynę Mokrzewską oraz dr Dorotę Kubacką w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Ekspresję mysiego białka eIF4E (miejsca 28–217) wykonano w *E. coli* oraz oczyszczono zgodnie z procedurą literaturową.[328] Wysoki poziom ekspresji eIF4E uzyskano poprzez indukcję formowania ciałek inkluzyjnych w warunkach 0,5 mM izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozydu (IPTG) w 37°C. Ciałka inkluzyjne zawierające eIF4E rozpuszczono w buforze 50 mM HEPES–KOH pH 7,2, zawierającym 10% glicerolu, 6 M chlorowodorku guanidyny oraz 2 mM DTT. Białko następnie poddano zwijaniu poprzez dwuetapową dializę z buforem zawierającym malejące stężenie chlorowodorku guanidyny, w obecności 100 mM KCl. Następnie eIF4E oczyszczono metodą FPLC na kolumnie jonowymiennej HiTrap SP HP (GE Healthcare) z elucją liniowym gradientem KCl od 0,1 do 1 M. Ostatecznie białka poddano odsalaniu poprzez wykonanie filtracji żelowj na kolumnie HiLoad 16/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare), stosując bufor 50 mM HEPES–KOH pH 7,2, zawierający 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA oraz 2 mM DTT. Otrzymane białko eIF4E przechowywano w stężeniu 79 µM w roztworze 10% glicerolu, w temperaturze -80°C. Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie z użyciem spektrofotometru NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific), stosując współczynnik ekstynkcji ε_{280} = 52940 M^{-1} cm^{-1}, obliczony narzędziem ProtParam (serwer ExPASy). Każdorazowo przez użyciem eIF4E w eksperymentach roztwór białka odwirowywano na kolumnie PVDP *Durapore*® o średnicy porów 0,45 µm, w temperaturze 4°C, przez 2 min w w 3000 g.

VI.3.2. DcpS

Białko DcpS stosowane w badanich zostało otrzymane oraz oczyszczone przez mgr Katarzynę Mokrzewską oraz dr Dorotę Kubacką w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego. Ekspresję rekombinowanego ludzkiego enzymu DcpS z sekwencją His-tag, przeprowadzono w komórkach BL21(DE3) RIL z indukcją przez noc w 18°C z 0,5 mM IPTG. Komórki zebrano i zawieszono w buforze (50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierającym 500 mM NaCl i 20 mM imidazolu) z lizozymem (0,1 mg/g osadu komórek) oraz inhibitorem proteaz (1 mM PMSF, 1 µM Pepstatyny A, 0,3 mM Aprotyniny), a następnie poddano lizie poprzez sonikację. Lizat poddano wirowaniu w 35000 g przez 40 min w temperaturze 4°C. Supernatant oczyszczono z wykorzystaniem kolumny powinowactwa 5 ml HisTrap HP (GE Healthcare) ze złożem Ni-NTA, a następnie przeprowadzono elucję buforem 50 mM Tris–HCl o pH 7,6, zawierającym 500 mM NaCl i 400 mM imidazolu. Enzym DcpS ponownie oczyszczono wykonując filtrację żelową na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) stosując ufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierającym 200 mM NaCl i 2 mM DTT. Białko przechowywano w stężeniach 10 µM lub 51,4 µM (5 µM lub 25,7 µM stężenia dimeru) w roztworze 10% glicerolu w -80°C. Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie z użyciem spektrofotometru NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific), stosując współczynnik ekstynkcji ε_{280} = 30370 M^{-1} cm^{-1} (dla monomeru), obliczony narzędziem ProtParam (serwer ExPASy). Każdorazowo przed eksperymentem roztwór enzymu inkubowano przez 15 minut w temperaturze 30°C z mieszaniem 300 rpm.

VI.3.3. PDE-I

PDE-I z jadu *C. adamenteus* (EC 3.1.4.1) został zakupiony w Sigma-Aldrich w postaci liofilizatu. Proszek rozpuszczono w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,9, zawierającym 110 mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$ oraz 50% glicerolu, w stężeniu 1 mg/ml. Roztwór enzymu przechowywano w temperaturze -20°C.

VI.3.4. Ecm1

Białko Ecm1 stosowane w badanich zostało otrzymane oraz oczyszczone przez dr Mirosława Śmietańskiego w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu

Warszawskiego. Nadekspresję białka Ecm1 przeprowadzono w formie białka fuzyjnego z białkiem SUMO oraz sekwencją His-tag w komórkach BL21(DE3)pLysS. Do indukcji użyto 0,3 mM IPTG do gęstości optycznej 0,8, po czym kontynuowano hodowlę komórek przez 16 h w 18°C. Następnie dodano bufor 50 mM Tris–HCl o pH 8,0 do lizy, zawierający 100 mM NaCl, 5% glicerolu, 5 mM β-merkaptoetanolu, 10 mM imidazolu, 1 mg/ml lizozymu oraz inhibitory proteaz. Po 30 minutach zwiększono stężenie NaCl do 500 mM, lizat sonikowano oraz odwirowano. Przefiltrowany supernatant oczyszczono na kolumnie HisTrap Crude (GE Healthcare), zrównoważonej buforem 50 mM Tris–HCl pH 8,0, zawierającym 10 mM imidazolu, 500 mM NaCl, 5% glicerolu oraz 5 mM β-merkaptoetanolu. 6xHis-SUMO-Ecm1 eluowano 300 mM imidazolem. W celu usunięcia białka SUMO z *N*-końca Ecm1 zastosowano proteazę MCLAB. Mieszaninę poddano dializie przez noc w temperaturze 4°C, z buforem 50 mM Tris–HCl o pH 8,0, zawierającym 500 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5% glicerolu, 0,5 mM DTT oraz 10 mM imidazolu. Białko oczyszczono z użyciem kolumny HisTrap-Crude, zrównoważonej buforem do dializy oraz zebrano w postaci Ecm1 bez *N*-końcowego SUMO-6xHis. Enzym Ecm1 ponownie oczyszczono wykonując filtrację żelową na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare). Zebrane frakcje N-metylotransferazy Ecm1 zagęszczono do 10,5 µM w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 8,0, zawierającym 200 mM NaCl, 5% glicerolu, 0,5 mM EDTA i 0,5 mM DTT, a następnie zamrożono w -80°C. Stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie z użyciem spektrofotometru NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific).

VI.3.5. RNMT-RAM

Ludzką N7–metylotransferazę w kompleksie z białkiem aktywującym RAM otrzymano od prof. Victorii H. Cowling z Centrum Regulacji i Ekspresji Genu, Szkoły Nauk o Życiu, Uniwersytetu w Dundee. Enzym otrzymano zgodnie z procedurą literaturową.[41] Rekombinowany ludzki enzym His-RNMT FL oraz GST-RAM w stężeniu 0,4 mg/ml (2,7 µM) jest przechowywany w buforze 50 mM Tris–HCl o pH 7,5, zawierającym 150 mM NaCl, 0,03% Brij-35 (eter laurylowy polioksyetylenu), 1 mM DTT i 10% glicerolu, w temperaturze -80°C.

VI.3.6. VCE

Enzym VCE został zakupiony w New England BioLabs w stężeniu 10000 U/ml, w buforze 20 mM Tris–HCl o pH 8,0, zawierającym 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerolu oraz 0,1% Triton® X-100. Zgodnie z informacjami podanymi przez producenta jedna jednostka VCE (1 U) oznacza ilość enzymu wymaganą do wprowadzenia 10 pmol (α^{32}P)GTP do 80–nukleotydowego transkryptu w ciągu 1 h w temperaturze 37°C.

VI.3.7. TG2

Ekspresję i oczyszczanie białka przeprowadziła Autorka pracy wraz z dr Chrisophem Hauserem w laboratorium dr Marusa Pietscha na Uniwersytecie w Kolonii. Ekspresję ludzkiej transglutaminazy II z sekwencją Strep-tag przeprowadzono w bakteriach *E. coli,* uprzednio transformowanych plazmidem, zawierającym gen *TG2*, pod kontrolą operonu laktozowego. Hodowlę nocną prowadzono w temperaturze 37°C. Następnie hodowlę rozcieńczono w roztworze pożywki LB i inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C z mieszaniem 200 rpm. Indukcję przeprowadzono poprzez dodanie 100 µl 120 mg/ml IPTG na każde 75 ml hodowli, po czym powtórzono inkubację 3 h w temperaturze 37°C z mieszaniem 200 rpm. Osad bakterii został odwirowany i zamrożony w -80°C. Po rozmrożeniu przeprowadzono lizę w warunkach: 1 ml roztworu lizozymu w 50% glicerolu w wodzie (10 mg/ml) oraz 100 µl PMSF w izopropanolu (17,4 mg/ml) na 10 ml zawiesiny *E. coli* (inkubacja 30 min w 37°C z mieszaniem 200 rpm). Następnie dodano roztwór wodny $MgSO_4$ (250 mg/ml) w ilości 1 ml, 200 µl roztworu DNazy I w 50% glicerolu w wodzie (5 mg/ml) na każe 10 ml zawiesiny *E. coli* (30 min inkubacji w 37°C z mieszaniem 200 rpm). Bakterie następnie zamrożono w -80°C i rozmrożono w temperaturze pokojowej (szok termiczny w celu poprawy lizy komórek). Bakterie odwirowano w temperaturze 4°C (20 min z 19000 rpm), a supernatant oczyszczono z użyciem FPLC. Do oczyszczania wykorzystano kolumnę Strep-Tactin® Superflow® (Merck) 5 ml, zrównoważoną buforem 100 mM Tris–HCl o pH 7,4, zawierającym 150 mM NaCl, 1 mM EDTA oraz 1 mM EGTA. Do elucji zastosowano bufor 100 mM Tris–HCl o pH 7,4, zawierającym 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA oraz 1 mg/ml D-destiobiotyny. Zebrane frakcje białka TG2 zagęszczono na kolumnie Amicon®Ultra 15 (Merck; 4°C, 10 min, 5000 rpm). Na tej samej

kolumnie wykonano wymianę buforu na 100 mM MOPS o pH 8,0, zawierający 50 µM EDTA, 20% glicerolu oraz 10 mM DTT. Stężenie białka wyznaczano każdorazowo metodą Bradforda.[329]

VI.3.8. Lizaty komórkowe

Lizaty cytoplazmatyczne z komórek HeLa oraz HEK 293 otrzymała mgr Karolina Kaczmarska w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii UW. Komórki HeLa (ang. *Human cervical carcinoma*) hodowano w DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Gibco) z 2 mM L-glutaminy, 10% FBS (Sigma) oraz 1% penicyliny/streptamycyny (Gibco) w warunkach 5% CO_2 i temperaturze 37°C. Ekstrakty cytoplazmatyczne przygotowano zgodnie z procedurą literaturową.[330] Komórki HeLa dwukrotnie przemyto PBS, zebrano do PBS i odwirowano. Osad przemyto PBS i buforem A (10 mM HEPES–KOH o pH 7,9, zawierający 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM DTT i 1 mM PSTF), a następnie zawieszono w 3 PCV (ang. *pellet cell volume*) buforu A i inkubowano na lodzie przez 10 min. Komórki rozerwano w homogenizatorze, a lizat odwirowano przez 15 min w 4°C i 2000 g. Supernatant (frakcja cytoplazmatyczna) zebrano, a następnie dodano 0,1 1 objętości buforu B (0,3 M HEPES–KOH o pH 7,9, zawierający 30 mM $MgCl_2$ i 1,4 M KCl). Przygotowany ekstrakt odwirowano w 16000 g przez 30 min w 4°C, a supernatant z dodatkiem 10% glicerolu poddano lizie przez 2 h z buforem C (20 mM HEPES–KOH o pH 7,9, zawierającym 20% (v/v) glicerolu, 100 mM KCl, 0,2 M EDTA i 1 mM DTT).

Komórki 293-F (Gibco) hodowano w pożywce CD 293 z 4 mM L-glutaminy w warunkach 5% CO_2 i temperatury 37°C. Pozostała procedura otrzymywania ekstraktów cytoplazmatycznych HEK 293 jest analogiczna do HeLa.

VI.4. Pomiary spektroskopowe

VI.4.1. UV-Vis

Widma absorpcyjne rejestrowano z użyciem spektrofotometru Shimadzu UV-1800 z przystawką CPS-100 do kontroli temperatury oraz kuwety kwarcowej 10x2 mm. Widma emisji i wzbudzania fluorescencji zmierzono na spektrofluorymetrze Cary Eclipse (Agilent) wyposażonym w lampę ksenonową, w kontrolowanej temperaturze i kuwecie kwarcowej 10x4 mm. Pomiary wykonywano w temperaturze 30°C. W zależności od badanego białka pomiary wykonywano w różnych buforach:

- 50 mM HEPES–KOH, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA o pH 7,2 (eIF4E);
- 50 mM Tris–HCl, 200 mM KCl, 0,5 mM EDTA o pH 7,6 (DcpS);
- 50 mM Tris–HCl, pH 7,5 (N7–MTazy: Ecm1, RNMT-RAM i VCE).
- 200 mM MOPS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2% glicerolu, 1 mM DTT o pH 7,3 (TG2);

Przed każdym pomiarem bufor był odgazowany z wykorzystaniem eksykatora próżniowego.
Wydajności kwantowe (QY) znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów wyznaczono korzystając z metody względnej porównania do wzorca, zgodnie z procedurą literaturową.[298] Eksperymenty wykonano w kuwecie kwarcowej 10 x10 mm w temperaturze 25°C. Związki z serii A i B badano w buforze 50 mM HEPES–KOH, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA o pH 7,6, a związki z serii C w 50 mM Tris–HCl o pH 7,5. Przed każdym pomiarem bufor był odgazowany z wykorzystaniem eksykatora próżniowego. Wartości QY wyznaczono poprzez pomiar widm absorpcyjnych i emisyjnych w tej samej kuwecie. Zastosowano takie same długości fali wzbudzania oraz szerokości szczelin spektrofluorymetru dla fluorescencyjnych nukleotydów, jak i odpowiadających im znaczników. W celu zminimalizowania wpływu reabsorpcji stężenia próbek dobierano w ten sposób, aby absorpcja w długości fali wzbudzania stosowanego do pomiaru widm emisji była niższa niż 0,1.

Tabela VI.1. Zestawienie znaczników fluorescencyjnych wykorzystanych do znakowania nukleotydów oraz referencji, które zastosowano do wyznaczania wydajności kwantowych QY, wraz z ich wartościami literaturowymi QY_{ref}.

Znacznik	λ_{exc} (nm)	Referencja	QY_{ref} (%)
Py, Py3	345	QS w 0,1 M H_2SO_4	54[331]
PEP	367	QS w 0,1 M H_2SO_4	54[331]
Pe	435	Pe-N_3 w EtOH	100[a]
BDP-FL, (5)FAM	475	fluoresceina w 0,1 M NaOH	79[332]

(6)FAM	450	fluoresceina w 0,1 M NaOH	79[332]
Cy3	520	Cy3-N_3 w EtOH	31[a]
Cy5	610	Cy5-N_3 w EtOH	20[a]

[a] zgodnie z danymi zapewnionymi przez producenta (https://www.lumiprobe.com/)

Do obliczenia wartości QY wykorzystano następujące równanie:

$$QY_{próbki} = QY_{ref} \frac{S_{próbki}}{S_{ref}} \frac{f_{ref}}{f_{próbki}} \frac{\eta^2_{próbki}}{\eta^2_{ref}} \quad , \tag{1}$$

gdzie *S* oznacza powierzchnię pod widmem emisji, η współczynnik załamania użytego rozpuszczalnika, a *f* to współczynnik absorpcji, zdefiniowany, jako:

$$f = 1 - 10^{-A(\lambda_{exc})} \quad , \tag{2}$$

VI.4.2. Czytnik płytek – pomiary FLINT

Eksperymenty badania wiązania bezpośredniego i kompetycyjnego, a także inhibicji (włączając HTS) przeprowadzono z użyciem czytnika płytek Synergy™ H1 w 96-dołkowych, czarnych, niewiążących płytkach Greiner o płaskim dnie. Wykonywano punktowe pomiary intensywności fluorescencji dla długości fali wzbudzania i emisji, charakterystycznych dla badanego znacznika. W przypadku pomiarów z udziałem nukleotydów znakowanych pirenem układ wzbudzano w 345 nm, a emisję rejestrowano w 378 nm lub 398 nm w przypadku eksperymentów w lizatach komórkowych. Intensywność fluorescencji rejestrowano w odstępach czasowych co 1 minutę, lub co 5–10 minut w eksperymentach z udziałem lizatów komórkowych. Do inkubacji i wytrząsania płytek stosowano termomikser Thermo-Shaker PST-60-HL-4 firmy Biosan (różne temperatury inkubacji, prędkość obrotów 300 rpm).
Warunki głównych eksperymentów wykonanych w ramach pracy doktorskiej są następujące:

- Wiązanie bezpośrednie kap-eIF4E: 10 nM analogu kapu znakowanego pirenem (**A1-1**–**A3-1** oraz **B4-1**) lub 2 nM (**A4-1**), 0–10 µM eIF4E, temperatura 20, 30 i 37°C, bufor 50 mM HEPES–KOH pH 7,2, zawierający 100 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wiązanie kompetycyjne kap-eIF4E: 75 nM sondy **A2-1**, 400 nM eIF4E, lub 10 nM sondy **A3-1**, 100 nM eIF4E, lub 10 nM **A4**-1, 75 nM eIF4E, stężenie niefluoryzującego liganda 1 nM do 31,6 µM (rozcieńczenia half log), temperatura 20, 30 i 37°C, bufor 50 mM HEPES–KOH pH 7,2, zawierający 100 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- z-factor metody PyFLINT-B dla eIF4E: kontrola pozytywna: 10 nM **A4-1**, 75 nM eIF4E, kontrola negatywna: 10 nM **A4-1**, 75 nM eIF4E, 100 µM m^7GDP. Temperatura 20, 30 i 37°C, bufor 50 mM HEPES–KOH pH 7,2, zawierający 100 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wyznaczanie parametrów kinetycznych degradacji kapu przez DcpS: **A2-1** (0,1, 0,2, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 5, 6 i 10 µM), 10 nM DcpS (dimer), temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl o pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze bez enzymu. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wyznaczanie IC_{50} metodą PyFLINT-HA dla DcpS: 5 µM sondy **A2-1**, 10 nM DcpS (dimer), stężenie niefluoryzującego inhibitora 1 nM do 31,6 µM lub 3,2 nM do 100 µM (rozcieńczenia half log), temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;

- z-factor metody PyFLINT-HA dla DcpS: kontrola pozytywna: 5 µM **A2-1**, 75 nM DcpS, kontrola negatywna: 5 µM **A2-1**, 75 nM DcpS, 200 µM m^7GDP. Temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wyznaczanie IC_{50} w lizatach komórkowych metodą PyFLINT-HA dla DcpS: 5 µM sondy **A2-1**, 10 µl lizatu HeLa ($C_{białek}$ = 3 mg/ml) lub HEK 293 ($C_{białek}$ = 6,35 mg/ml), stężenie niefluoryzującego inhibitora 3,2 nM do 100 µM (rozcieńczenia half log). Temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 398 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 5 minut;
- Wiązanie bezpośrednie kap-DcpS: 10 nM analogu kapu znakowanego pirenem (**B1-1**–**B3-1**) lub 5 nM (**B4-1**), 0–1 µM DcpS (dimer), temperatura 20, 30 i 37°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wiązanie kompetycyjne kap-DcpS: 10 nM sondy **B1-1**, 200 nM DcpS (dimer), lub 10 nM sondy **B2-1**, **B3-1** lub **B5-1**, 150 nM DcpS (dimer), lub 10 nM **B4**-1, 75 nM DcpS (dimer), stężenie niefluoryzującego liganda 1 nM do 31,6 µM lub 3,16 nM do 100 µM (rozcieńczenia half log), temperatura 20, 30 i 37°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- z-factor metody PyFLINT-B dla DcpS: kontrola pozytywna: 10 nM **B4-1**, 75 nM DcpS (dimer), kontrola negatywna: 10 nM **B4-1**, 75 nM DcpS (dimer), 100 µM m^7GDP. Temperatura 20, 30 i 37°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,6, zawierający 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wyznaczanie parametrów kinetycznych N7–metylacji przez Ecm1: **C1-2** (0–15 µM), 10 nM Ecm1, 50 µM SAM, temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wyznaczanie parametrów kinetycznych N7–metylacji przez RNMT-RAM: **C1-2** (0–15 µM), 20 nM RNMT-RAM, 20 µM SAM, temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wyznaczanie IC_{50} metodą PyFLINT-M dla Ecm1: 2 µM sondy **C1-2**, 10 nM Ecm1, 50 µM SAM, stężenie niefluoryzującego inhibitora 1 nM do 31,6 µM lub 3,2 nM do 100 µM (rozcieńczenia half log), temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Badania przesiewowe biblioteki LOPAC® z Ecm1: 2 µM sondy **C1-2**, 10 nM Ecm1, 50 µM SAM, 10 µM związku z biblioteki LOPAC®, temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5 z 2% DMSO (związki z biblioteki LOPAC® rozpuszczone są w czystym DMSO), 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- Wyznaczanie IC_{50} metodą PyFLINT-M dla RNMT-RAM: 2 µM sondy **C1-2**, 20 nM RNMT-RAM, 20 µM SAM, stężenie niefluoryzującego inhibitora 1 nM do 31,6 µM lub 3,2 nM do 100 µM (rozcieńczenia half log), temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, 15 min inkubacji w

termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;

- Wyznaczanie IC_{50} metodą PyFLINT-M dla VCE: 2 µM sondy **C1-2**, 5U VCE, 50 µM SAM, stężenie niefluoryzującego inhibitora 1 nM do 31,6 µM (rozcieńczenia half log), temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- z-factor metody PyFLINT-M dla Ecm1: kontrola pozytywna: 2 µM **C1-2**, 10 nM Ecm1, 50 µM SAM, kontrola negatywna: 2 µM **C1-2**, 10 nM Ecm1, 50 µM SAM, 25 µM sinefunginy. Temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę;
- z-factor metody PyFLINT-M dla RNMT-RAM: kontrola pozytywna: 2 µM **C1-2**, 20 nM RNMT-RAM, 20 µM SAM, kontrola negatywna: 2 µM **C1-2**, 20 nM RNMT-RAM, 20 µM SAM, 30 µM sinefunginy. Temperatura 30°C, bufor 50 mM Tris–HCl pH 7,5, 15 min inkubacji w termomikserze z 300 rpm bez enzymu oraz 20 min inkubacji wraz z pomiarem (bez enzymu) na czytniku płytek. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 150 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 345 nm, emisja 378 nm, rejestracja intensywności fluorescencji na czytniku płytek co 1 minutę.

VI.4.3. Czytnik płytek – pomiary FA

Eksperymenty badania wiązania bezpośredniego i kompetycyjnego przeprowadzono z użyciem czytnika płytek BioTek Synergy 2 w 96-dołkowych czarnych płytkach BRANDplates pureGrade o płaskim dnie. Wykonywano punktowe pomiary intensywności fluorescencji dla długości fali wzbudzania i emisji, charakterystycznych dla badanego znacznika. Eksperymenty wykonano wraz z dr Christophem Hauserem w laboratorium dr Markusa Pietscha z Instytutu II Farmakologii, Centrum Farmakologii Wydziału Medycznego Uniwersytetu w Kolonii.

- Wiązanie bezpośrednie nukleotyd-TG2: 50 nM sondy **D1-1**, **D3-1**–**D9-1** lub **D5-2**–**D5-4**, , 0,1–1000 nM TG2, bufor 200 mM MOPS pH 7,3, zawierający 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% DMSO oraz 2% glicerolu, temperatura 30°C. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 100 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 485/20 nm, emisja 528/20 nm, rejestracja anizotropii oraz intensywności fluorescencji na czytniku płytek po 0, 30 i 60 minutach inkubacji;
- Wiązanie kompetycyjne nukleotyd-TG2: 50 nM **D5-1**, 300 nM TG2, stężenie inhibitora 0–100 µM. Temperatura 30°C, bufor 200 mM MOPS pH 7,3, zawierający 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5% DMSO oraz 2% glicerolu. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 100 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 485/20 nm, emisja 528/20 nm, rejestracja anizotropii oraz intensywności fluorescencji na czytniku płytek po 60 minutach inkubacji;
- z-factor metody FA dla TG2: kontrola pozytywna: 50 nM **D5-1**, 300 nM TG2, kontrola negatywna: 50 nM **D5-1**, 300 nM TG2, 30 µM $GTP_{\gamma}S$. Temperatura 30°C, bufor 200 mM MOPS pH 7,3, zawierający 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5% DMSO oraz 2% glicerolu. Całkowita objętość mieszaniny w dołku to 100 µl. Warunki pomiaru: wzbudzanie 485/20 nm, emisja 528/20 nm, rejestracja anizotropii oraz intensywności fluorescencji na czytniku płytek po 0, 30 i 60 minutach inkubacji.

VI.4.4. MST

Eksperymenty mikroskalowej termoforezy MST przeprowadzono na urządzeniu Monolith NT.115 firmy NanoTemper Technologies, w kapilarach Monolith NT.115 Premium Coated Capillaries. Otrzymane dane zanalizowano z wykorzystaniem oprogramowania MO Affinity Analysis software v. 2.1.3 z NanoTemper Technologies, stosując dane MST z 1s (cold region start -1 s, hot region start 4 s). W celu wyznaczenia wartości K_D wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism® 7 lub Origin® 2019b.

- Wiązanie bezpośrednie $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2-eIF4E: 25 nM sondy $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2, eIF4E w stężeniu od 0,61 nM do 20 µM, temperatura 25°C, bufor 50 mM HEPES–KOH o pH 7,2, zawierający 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA i 0,05% Tween-20;
- Wiązanie kompetycyjne m^7GMP/m^7G-t-p-eIF4E: 25 nM sondy $m^7Gp_2C_4$(6)FAM2, 1 µM eIF4E, stężenie niefluoryzującego liganda od 15,2 nM do 500 µM (rozcieńczenia połówkowe), temperatura 25°C, bufor 50 mM HEPES–KOH o pH 7,2, zawierający 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA i 0,05% Tween-20;
- Wiązanie kompetycyjne nukleotyd-eIF4E: 10 nM sondy $m^7Gp_5OC_3$(5)FAM2, 50 nM eIF4E, stężenie niefluoryzującego liganda od 15,2 nM do 500 µM (dinukleotydy) lub od 0,05 nM do 1,75 µM (krótkie kapowane RNA), temperatura 25°C, bufor 50 mM HEPES–KOH o pH 7,2, zawierający 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA i 0,05% Tween-20.

VI.4.5. FTIR

Widma FTIR zarejestrowano na aparacie IRPrestige-21 firmy Shimadzu z detektorem DLaTGS z przystawką ATR (Miracle™ firmy PIKE Technologies z kryształem diamentowym), lub z przystawką przeznaczoną do metody rozproszonego odbicia (DiffusIR™ firmy PIKE Technologies). Wszystkie próbki badano w postaci ciała stałego w temperaturze pokojowej. Rejestrowano absorbancję próbki w zakresie 500–4000 cm^{-1} (krok skanowania 0,5 cm^{-1}).

VI.4.6. Spektroskopia ramanowska

Widma ramanowskie pochodnych grafenu w proszku oraz mapy ramanowskie płytek SiC z warstwą grafenu, charakteryzowano na spektrometrze Renishaw InVia. W pomiarach wykorzystano laser pracy ciągłej Nd:YAG o długości fali 532 nm. Moc pobudzania dobrano tak (ok. 0,1–2 mW), żeby nie uszkodzić próbki, ogniskując światło z wykorzystaniem obiektywu 100 x. Wielkość plamki lasera na próbce miała średnicę poniżej 1 mikrometra. Widma rejestrowano w zakresie 400–3000 cm^{-1}. Dla każdego z fragmentów płytek zastosowano inne odstępy pomiędzy punktami na powierzchni, z których rejestrowano widma ramanowskie (Tabela IV.2).

Tabela VI.2. Zestawienie parametrów pomiarowych map ramanowskich płytek SiC z monowarstwą grafenu.

Próbka	Krok x/y (µm/µm)	Liczba punktów
2562G2C1	579,5/650	288
2562G2C1 I	290,6/302,6	340
2562G2C1 II	303,125/325	323
2562G2C1 III	282,2/250	336
2562G2C1 IV	217/217	306
2562G2C1 I po utlenianiu	290,6/302,6	340
2562G2C1 II po utlenianiu	303,125/325	323
2562G2C1 III kontrola utleniania	282,5/250	244
2562G2C1 I po utlenianiu i azydkowaniu	290,6/302,6	340

Analizę map ramanowskich przeprowadzono w programie Origin® 2019b.

VI.5. Wyznaczanie parametrów biofizycznych

VI.5.1. Wiązanie bezpośrednie (K_D)

W celu wyznaczenia wartości stałych dysocjacji nukleotydów do białek eIF4E, DcpS i TG2 wykonano pomiary intensywności fluorescencji (eIF4E, DcpS) bądź anizotropii fluorescencji (TG2). Eksperymenty wykonano z użyciem czytnika płytek w 96-dołkowych, czarnych, niewiążących płytkach. Każdy dołek zawierał odpowiedni bufor (50 mM HEPES–KOH pH 7,2 z 100 mM KCl i 0,5 mM EDTA dla eIF4E; 50 mM Tris–HCl pH 7,6 z 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA dla DcpS; 200 mM MOPS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% DMSO i 2% glicerolu dla TG2), białko oraz sondę fluorescencyjną w stałym stężeniu. Do

uzyskanych zależności intensywności/skorygowanej anizotropii fluorescencji od stężenia białka $F([P_t])$ dopasowano równanie, wyprowadzone z podstawowych reguł wiązania bezpośredniego białko–ligand:

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0)\frac{[P_t]+[L_t]+K_D-\sqrt{([P_t]+[L_t]+K_D)^2-4[L_t][P_t]}}{2[L_t]} \quad (3)$$

gdzie: F_0 – minimalna zarejestrowana intensywność/skorygowana anizotropia fluorescencji, F_{max} – maksymalna zarejestrowana intensywność/skorygowana anizotropia fluorescencji, $[P_t]$ – całkowite stężenie białka, $[L_t]$ – całkowite stężenie sondy fluorescencyjnej, K_D – stała dysocjacji kompleksu białko–sonda.
Krzywą opisaną równaniem (3) dopasowano do danych eksperymentalnych w programie Origin® 2019b (eIF4E, DcpS) lub GraphPad® Prism 7 (TG2).

VI.5.2. Wiązanie kompetycyjne (IC_{50}, K_D)

W celu wyznaczenia wartości stałych dysocjacji niefluoryzujących ligandów do białek eIF4E, DcpS i TG2 wykonano pomiary intensywności (eIF4E, DcpS) lub anizotropii (TG2) fluorescencji w eksperymencie wiązania kompetycyjnego. Eksperymenty wykonano z użyciem czytnika płytek w 96-dołkowych, czarnych, niewiążących płytkach. Każdy dołek zawierał odpowiedni bufor (50 mM HEPES–KOH pH 7,2 z 100 mM KCl i 0,5 mM EDTA dla eIF4E; 50 mM Tris–HCl pH 7,6 z 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA dla DcpS; 200 mM MOPS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% DMSO i 2% glicerolu dla TG2), białko w stałym stężeniu, sondę fluorescencyjną w stałym stężeniu oraz badany ligand (rozcieńczenia half-log). Do uzyskanych zależności intensywności/skorygowanej anizotropii fluorescencji od logarytmu stężenia liganda $F(\log(C_{lig.}))$ dopasowano równanie:

$$F = F_0 + \frac{F_{max}-F_0}{1+10^{(\log(IC_{50})-\log(C_{lig.})p}}\ , \quad (4)$$

gdzie: F_0 – minimalna zarejestrowana intensywność/skorygowana anizotropia fluorescencji, F_{max} – maksymalna zarejestrowana intensywność/skorygowana anizotropia fluorescencji, IC_{50} – stężenie liganda/inhibitora wymagane do zastąpienia 50% sondy fluorescencyjnej z miejsca wiążącego białka, $C_{lig.}$ – stężenie liganda, p – współczynnik Hilla.
Analogicznie równanie można zapisać w formie zależności intensywności/skorygowanej anizotropii fluorescencji od stężenia liganda $F(C_{lig.})$:

$$F = F_0 + \frac{F_{max}-F_0}{1+\left(\frac{C_{lig.}}{IC_{50}}\right)^p}\ , \quad (5)$$

Korzystając z wcześniej wyprowadzonego równania,[301] obliczono stałe dysocjacji (inhibicji) K_i liganda kompetycyjnego, na podstawie wyznaczonych wartości IC_{50}. Aby wyprowadzić równanie przyjęto następujące założenia:
- całkowity sygnał fluorescencji:

$$F = C_{PL}\frac{[PL]}{[L_t]} + C_L\frac{[L]}{[L_t]} = (C_{PL} - C_L)\frac{[PL]}{[L_t]} + C_L, \quad (6)$$

gdzie C_{PL} i C_L to współczynniki sygnału fluorescencji kompleksu PL i sondy L.

- sygnał fluorescencji w 0% inhibicji to:

$$F_0 = (C_{PL} - C_L)\frac{[PL]_0}{[L_t]} + C_L, \quad (7)$$

- sygnał fluorescencji w 100% inhibicji to:

$$F_{100} = C_L, \quad (8)$$

- sygnał fluorescencji w 50% inhibicji to:

$$F_{50} = (C_{PL} - C_L)\frac{[PL]_{50}}{[L_t]} + C_L\ , \quad (9)$$

- stężenia całkowite substancji:

$$[P_t] = [P] + [PL] + [PI] \ , \tag{10}$$
$$[L_t] = [L] + [PL] \ , \tag{11}$$
$$[I_t] = [I] + [PI] \ , \tag{12}$$

Korzystając z tych założeń uzyskuje się równanie:

$$[PL] = \frac{[P_t]}{1+\frac{K_D}{[L]}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)} \ , \tag{13}$$

gdzie K_D – stała dysocjacji kompleksu sonda–białko (PL), a K_i – stała dysocjacji kompleksu ligand–białko (PI). Oraz:

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{\frac{[L]_{50}}{K_D}+\frac{[P]_0}{K_D}+1} , \tag{14}$$

Pozostałe parametry można obliczyć z równań:

$$[P]_0 = \frac{-K_D-[L_t]+[P_t]+\sqrt{(K_D+[L_t]-[P_t])^2+4[P_t]K_D}}{2} \ , \tag{15}$$
$$[L]_0 = \frac{[L_t]}{1+\frac{[P]_0}{K_D}} \ , \tag{16}$$
$$[L]_{50} = [L_t] - \frac{[PL]_0}{2} \ , \tag{17}$$
$$[I]_{50} = IC_{50} - [P_t] + K_D\frac{[PL]_0}{2[L]_{50}} + \frac{[PL]_0}{2} \ , \tag{18}$$

Ostatecznie do obliczenia K_I na podstawie IC_{50} wykorzystano następujące równanie:

$$K_i = \frac{IC_{50}-[P_t]+[PL]_{50}\left(\frac{K_D}{[L]_{50}}+1\right)}{\frac{[L]_{50}}{K_D}+\frac{[P]_0}{K_D}+1} \ , \tag{19}$$

gdzie: $[P_t]$ – całkowite stężenie białka, $[PL]_{50}$ – stężenie kompleksu białko–sonda w 50% inhibicji, $[L]_{50}$ – stężenie wolnej sondy w 50% inhibicji, $[P]_0$ – stężenie wolnego białka bez inhibicji.

VI.5.3. Kinetyka enzymatyczna

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy sondy **A2-1** przez DcpS bądź N7–metylacji sondy **C1-2** przez Ecm1 i RNMT-RAM wykonano pomiary intensywności fluorescencji w czasie trwania reakcji. Eksperymenty wykonano w temperaturze 30°C z użyciem czytnika płytek w 96-dołkowych, czarnych, niewiążących płytkach. Każdy dołek zawierał odpowiedni bufor (50 mM Tris–HCl pH 7,6 z 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA dla DcpS; 50 mM Tris–HCl pH 7,5 dla Ecm1 i RNMT-RAM), sondę fluorescencyjną (0–10 µM **A2-1** dla DcpS i 0–15 µM **C1-2** dla Ecm1 i RNMT-RAM), białko w stałym stężeniu (10 nM dimeru DcpS, 10 nM Ecm1 lub 20 nM RNMT-RAM) oraz w przypadku N7–metylacji kosubstrat SAM (50 µM dla Ecm1 i 20 µM dla RNMT-RAM). Mieszaniny bez białka były uprzednio inkubowane przez 15 min w 30°C z mieszaniem 300 rpm. Prędkości początkowe V obliczono poprzez dopasowanie równania prostej do prostoliniowego przebiegu zmian intensywności fluorescencji w czasie (zwykle do 10–20 punktów). Do zależności prędkości początkowej od stężenia substratu fluorescencyjnego $V([S])$ dopasowano równanie Michaelisa-Menten:

$$V = \frac{E_t k_{cat}[S]}{K_M+[S]} , \tag{20}$$

gdzie: E_t – stężenie enzymu, k_{cat} – stała katalityczna, K_M – stała Michaelisa.
Krzywą opisaną równaniem (20) dopasowano do danych eksperymentalnych w programie Origin® 2019b.

VI.5.4. Inhibicja (IC_{50}, K_I)

W celu wyznaczenia parametrów inhibicji reakcji enzymatycznej hydrolizy sondy **A2-1** przez DcpS bądź N7–metylacji sondy **C1-2** przez Ecm1, RNMT-RAM i VCE wykonano pomiary intensywności fluorescencji w czasie trwania reakcji w obecności różnych stężeń inhibitora. Eksperymenty wykonano

w temperaturze 30°C z użyciem czytnika płytek w 96-dołkowych, czarnych, niewiążących płytkach. Każdy dołek zawierał odpowiedni bufor (50 mM Tris–HCl pH 7,6 z 200 mM KCl i 0,5 mM EDTA dla DcpS; 50 mM Tris–HCl pH 7,5 dla Ecm1, RNMT-RAM i VCE), sondę fluorescencyjną w stałym stężeniu (5 µM **A2-1** dla DcpS i 2 µM **C1-2** dla Ecm1, RNMT-RAM i VCE), białko w stałym stężeniu (10 nM dimeru DcpS, 10 nM Ecm1, 20 nM RNMT-RAM i 5 U VCE), badany inhibitor (rozcieńczenia half-log) oraz kosubstrat SAM w przypadku N7–metylacji (50 µM dla Ecm1 i VCE lub 20 µM dla RNMT-RAM). Mieszaniny bez białka były uprzednio inkubowane przez 15 min w 30°C z mieszaniem 300 rpm. Prędkości początkowe V obliczono poprzez dopasowanie równania prostej do prostoliniowego przebiegu zmian intensywności fluorescencji w czasie (zwykle do 10–20 punktów). Do zależności stosunku prędkości początkowej V do prędkości początkowej bez inhibitora V_0 od logarytmu ze stężenia inhibitora ($V/V_0(\log(C_{inh.}))$) dopasowano równanie analogiczne do równania (4):

$$V/V_0 = A1 + \frac{A2-A1}{1+10^{(\log(IC_{50})-\log(C_{inh.})p}}\ , \tag{21}$$

gdzie: V_0 – prędkość początkowa reakcji bez inhibitora, $A1$ – dolna asymptota, $A2$ – górna asymptota, IC_{50} – stężenie inhibitora wymagane do zahamowania reakcji w 50%, $C_{inh.}$ – stężenie inhibitora, p – współczynnik Hilla.
Analogicznie równanie można zapisać w formie zależności stosunku prędkości początkowej V do prędkości początkowej bez inhibitora V_0 od stężenia inhibitora ($V/V_0(C_{inh.})$):

$$V/V_0 = A1 + \frac{A2-A1}{1+\left(\frac{C_{inh.}}{IC_{50}}\right)^p}\ , \tag{22}$$

W przypadku inhibitorów nukleotydowych, będących analogami substratu założono kompetycyjny model inhibicji. Tym samym korzystając z wyznaczone stałej Michaelisa K_M reakcji oraz wartości IC_{50} obliczono stałe inhibicji K_I zgodnie z równaniem Cheng-Prusoff[333]:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1+\frac{[L]}{K_M}}, \tag{23}$$

gdzie: $[L]$ – stężenie sondy fluorescencyjnej.

VI.5.5. Parametr *z*

Parametr *z* obliczono stosując poniższy wzór:

$$z = 1\ -\ \frac{3*(\sigma_{pos}+\sigma_{neg})}{|\mu_{pos}-\mu_{neg}|}, \tag{24}$$

gdzie σ to odchylenie standardowe, a μ wartości średnie rejestrowanego sygnału (intensywność fluorescencji, anizotropia fluorescencji, prędkość początkowa obliczona na podstawie zmian intensywności fluorescencji) kontroli pozytywnej (pos) i negatywnej (neg).

VI.5.6. Korekcja anizotropii

W oparciu o zmiany intensywności fluorescencji zarejestrowane w trakcie wiązania sondy fluorescencyjnej z białkiem TG2 obliczono współczynnik wygaszania fluorescencji ($Q = Q_b/Q_f$), który wykorzystano do korekcji mierzonej anizotropii fluorescencji. Rejestrowane wartości anizotropii fluorecencji w metodzie badania wiązania nukleotydów z białkiem TG2 korygowano stosując poniższe równanie:

$$A_{corr} = \frac{\frac{A-Af}{Ab-A}*\frac{Qf}{Qb}Af+Af}{1+\frac{A-Af}{Ab-A}*\frac{Qf}{Qb}}, \tag{25}$$

gdzie: A – rejestrowana anizotropia, A_f – wartość anizotropii z dolnego plateau, A_b – wartość anizotropii z górnego plateau, Q_f – wartość intensywności fluorescencji z dolnego plateau, Q_b – wartość intensywności fluorescencji z górnego plateau.

VII. Bibliografia

[1] J. Kowalska, M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1301-1305; B. A. Connolly, P. J. Romaniuk, F. Eckstein, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1983-1989.

[2] S. Daffis, K. J. Szretter, J. Schriewer, J. Li, S. Youn, J. Errett, T. Y. Lin, S. Schneller, R. Zust, H. Dong, V. Thiel, G. C. Sen, V. Fensterl, W. B. Klimstra, T. C. Pierson, R. M. Buller, M. Gale, P. Y. Shi, M. S. Diamond, *Nature* **2010**, *468*, 452-456.

[3] M. Werner, E. Purta, K. H. Kaminska, I. A. Cymerman, D. A. Campbell, B. Mittra, J. R. Zamudio, N. R. Sturm, J. Jaworski, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, 4756-4768.

[4] J. D. Bangs, P. F. Crain, T. Hashizume, J. A. McCloskey, J. C. Boothroyd, *J Biol Chem* **1992**, *267*, 9805-9815; J. R. Zamudio, B. Mittra, S. Foldynová-Trantírková, G. M. Zeiner, J. Lukes, J. M. Bujnicki, N. R. Sturm, D. A. Campbell, *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 6084-6092.

[5] C. Wei, A. Gershowitz, B. Moss, *Nature* **1975**, *257*, 251-253.

[6] C. M. Wei, A. Gershowitz, B. Moss, *Biochemistry* **1976**, *15*, 397-401.

[7] J. Mauer, X. Luo, A. Blanjoie, X. Jiao, A. V. Grozhik, D. P. Patil, B. Linder, B. F. Pickering, J. J. Vasseur, Q. Chen, S. S. Gross, O. Elemento, F. Debart, M. Kiledjian, S. R. Jaffrey, *Nature* **2017**, *541*, 371-375.

[8] P. J. Sikorski, M. Warminski, D. Kubacka, T. Ratajczak, D. Nowis, J. Kowalska, J. Jemielity, *Nucleic Acids Res* **2020**.

[9] H. Cahová, M. L. Winz, K. Höfer, G. Nübel, A. Jäschke, *Nature* **2015**, *519*, 374-377; R. W. Walters, T. Matheny, L. S. Mizoue, B. S. Rao, D. Muhlrad, R. Parker, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, 480-485.

[10] M. Kiledjian, *Trends Cell Biol* **2018**, *28*, 454-464.

[11] Y. Wang, S. Li, Y. Zhao, C. You, B. Le, Z. Gong, B. Mo, Y. Xia, X. Chen, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 12094-12102.

[12] N. Sonenberg, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **1988**, *35*, 173-207.

[13] I. Topisirovic, Y. V. Svitkin, N. Sonenberg, A. J. Shatkin, *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2011**, *2*, 277-298.

[14] Y. Nishimura, S. Takahashi, T. Yamamoto, M. Tsuboi, M. Hattori, K. Miura, K. Yamaguchi, S. Ohtani, T. Hata, *Nucleic Acids Res* **1980**, *8*, 1107-1119.

[15] P. D. Lawley, P. Brookes, *Nature* **1961**, *192*, 1081-1082.

[16] S. M. Hecht, B. L. Adams, J. W. Kozarich, *J Org Chem* **1976**, *41*, 2303-2311.

[17] C. J. Chetsanga, C. Makaroff, *Chem Biol Interact* **1982**, *41*, 235-249.

[18] W. T. M. Volker A. Erdmann , Jan Barciszewski, *Chemical Biology of Nucleic Acids: Fundamentals and Clinical Applications RNA Technologies*, Springer Science & Business, **2014**.

[19] T. Ishida, M. Doi, H. Ueda, M. Inoue, G. M. Scheldrick, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2286–2294.

[20] K. Kamiichi, M. Danshita, N. Minamino, M. Doi, T. Ishida, M. Inoue, *FEBS Lett* **1986**, *195*, 57-60.

[21] Z. Wieczorek, K. Zdanowski, L. Chlebicka, J. Stepiński, M. Jankowska, B. Kierdaszuk, A. Temeriusz, E. Darzynkiewicz, R. Stolarski, *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1354*, 145-152.

[22] E. Kulikowska, A. Bzowska, J. Wierzchowski, D. Shugar, *Biochim Biophys Acta* **1986**, *874*, 355-363.

[23] Z. Wieczorek, J. Stepinski, M. Jankowska, H. Lönnberg, *J Photochem Photobiol B* **1995**, *28*, 57-63.

[24] A. J. Shatkin, J. L. Manley, *Nat Struct Biol* **2000**, *7*, 838-842.

[25] S. Moteki, D. Price, *Mol Cell* **2002**, *10*, 599-609.

[26] C. Chu, K. Das, J. R. Tyminski, J. D. Bauman, R. Guan, W. Qiu, G. T. Montelione, E. Arnold, A. J. Shatkin, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 10104-10108.

[27] A. Ramanathan, G. B. Robb, S. H. Chan, *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 7511-7526.

[28] S. Shuman, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, *3*, 619-625.

[29] C. Fabrega, S. Hausmann, V. Shen, S. Shuman, C. D. Lima, *Mol Cell* **2004**, *13*, 77-89.

[30] V. Balagopal, R. Parker, *Curr Opin Cell Biol* **2009**, *21*, 403-408.

[31] D. R. Schoenberg, L. E. Maquat, *Trends Biochem Sci* **2009**, *34*, 435-442.

[32] E. Decroly, F. Ferron, J. Lescar, B. Canard, *Nat Rev Microbiol* **2011**, *10*, 51-65.

[33] Y. Furuichi, A. J. Shatkin, *Adv Virus Res* **2000**, *55*, 135-184.

[34] A. Harwig, R. Landick, B. Berkhout, *Viruses* **2017**, *9*.

[35] S. Shuman, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **2001**, *66*, 1-40.

[36] J. Li, J. T. Wang, S. P. Whelan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 8493-8498.

[37] T. Ogino, S. P. Yadav, A. K. Banerjee, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 3463-3468.

[38] S. J. Plotch, M. Bouloy, I. Ulmanen, R. M. Krug, *Cell* **1981**, *23*, 847-858.

[39] T. Fujimura, R. Esteban, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 17667-17671; T. Fujimura, R. Esteban, *J Biol Chem* **2013**, *288*, 23716-23724.

[40] M. Byszewska, M. Smietanski, E. Purta, J. Bujnicki, *Rna Biology* **2014**, *11*, 1597-1607.

[41] D. Varshney, A. P. Petit, J. A. Bueren-Calabuig, C. Jansen, D. A. Fletcher, M. Peggie, S. Weidlich, P. Scullion, A. V. Pisliakov, V. H. Cowling, *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 10423-10436.

[42] L. Yu, A. Martins, L. Deng, S. Shuman, *J Virol* **1997**, *71*, 9837-9843.

[43] S. Zheng, S. Shuman, *RNA* **2008**, *14*, 696-705.

[44] M. De la Peña, O. J. Kyrieleis, S. Cusack, *EMBO J* **2007**, *26*, 4913-4925.

[45] Y. Chen, D. Guo, *Virol Sin* **2016**, *31*, 3-11.

[46] Y. Chen, H. Cai, J. Pan, N. Xiang, P. Tien, T. Ahola, D. Guo, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 3484-3489.

[47] S. Hausmann, C. P. Vivarès, S. Shuman, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 96-103.

[48] J. M. Holstein, L. Anhäuser, A. Rentmeister, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 10899-10903.

[49] J. M. Holstein, F. Muttach, S. H. H. Schiefelbein, A. Rentmeister, *Chemistry* **2017**, *23*, 6165-6173; F. Muttach, F. Masing, A. Studer, A. Rentmeister, *Chemistry-a European Journal* **2017**, *23*, 5988-5993.

[50] D. Liu, J. M. Brockman, B. Dass, L. N. Hutchins, P. Singh, J. R. McCarrey, C. C. MacDonald, J. H. Graber, *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, 234-246.

[51] E. Beaudoing, S. Freier, J. R. Wyatt, J. M. Claverie, D. Gautheret, *Genome Res* **2000**, *10*, 1001-1010.

[52] W. F. Marzluff, E. J. Wagner, R. J. Duronio, *Nat Rev Genet* **2008**, *9*, 843-854.

[53] A. E. Erson-Bensan, T. Can, *Mol Cancer Res* **2016**, *14*, 507-517.

[54] J. C. Dantonel, K. G. Murthy, J. L. Manley, L. Tora, *Nature* **1997**, *389*, 399-402.

[55] A. Kahvejian, Y. V. Svitkin, R. Sukarieh, M. N. M'Boutchou, N. Sonenberg, *Genes Dev* **2005**, *19*, 104-113.

[56] H. Tilgner, D. G. Knowles, R. Johnson, C. A. Davis, S. Chakrabortty, S. Djebali, J. Curado, M. Snyder, T. R. Gingeras, R. Guigó, *Genome Res* **2012**, *22*, 1616-1625.

[57] E. Allemand, E. Batsché, C. Muchardt, *Curr Opin Genet Dev* **2008**, *18*, 145-151.

[58] S. M. Fica, N. Tuttle, T. Novak, N. S. Li, J. Lu, P. Koodathingal, Q. Dai, J. P. Staley, J. A. Piccirilli, *Nature* **2013**, *503*, 229-234.

[59] N. A. Faustino, T. A. Cooper, *Genes Dev* **2003**, *17*, 419-437.

[60] X. Jiao, J. H. Chang, T. Kilic, L. Tong, M. Kiledjian, *Mol Cell* **2013**, *50*, 104-115.

[61] P. Fortes, J. Kufel, M. Fornerod, M. Polycarpou-Schwarz, D. Lafontaine, D. Tollervey, I. W. Mattaj, *Mol Cell Biol* **1999**, *19*, 6543-6553.

[62] E. Izaurralde, J. Lewis, C. McGuigan, M. Jankowska, E. Darzynkiewicz, I. W. Mattaj, *Cell* **1994**, *78*, 657-668.

[63] C. Mazza, M. Ohno, A. Segref, I. W. Mattaj, S. Cusack, *Mol Cell* **2001**, *8*, 383-396.
[64] H. Cheng, K. Dufu, C. S. Lee, J. L. Hsu, A. Dias, R. Reed, *Cell* **2006**, *127*, 1389-1400.
[65] A. Köhler, E. Hurt, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 761-773.
[66] T. Narita, T. M. Yung, J. Yamamoto, Y. Tsuboi, H. Tanabe, K. Tanaka, Y. Yamaguchi, H. Handa, *Mol Cell* **2007**, *26*, 349-365.
[67] K. M. Kim, H. Cho, K. Choi, J. Kim, B.-W. Kim, Y.-G. Ko, S. K. a. K. Jang, Y. K., *Genes Dev.* **2009**, *23*, 2033-2045.
[68] S. M. Dias, K. F. Wilson, K. S. Rojas, A. L. Ambrosio, R. A. Cerione, *Nat Struct Mol Biol* **2009**, *16*, 930-937.
[69] T. Gonatopoulos-Pournatzis, V. H. Cowling, *Biochem J* **2014**, *457*, 231-242.
[70] J. D. Richter, N. Sonenberg, *Nature* **2005**, *433*, 477-480.
[71] S. Mader, H. Lee, A. Pause, N. Sonenberg, *Mol Cell Biol* **1995**, *15*, 4990-4997.
[72] N. Sonenberg, A. G. Hinnebusch, *Cell* **2009**, *136*, 731-745.
[73] C. Schmidt, V. Beilsten-Edmands, C. V. Robinson, *J Mol Biol* **2016**, *428*, 344-356.
[74] A. De Benedetti, J. R. Graff, *Oncogene* **2004**, *23*, 3189-3199.
[75] J. R. Graff, S. G. Zimmer, *Clin Exp Metastasis* **2003**, *20*, 265-273.
[76] R. J. DeFatta, E. A. Turbat-Herrera, B. D. Li, W. Anderson, A. De Benedetti, *Int J Cancer* **1999**, *80*, 516-522.
[77] C. O. Nathan, L. Liu, B. D. Li, F. W. Abreo, I. Nandy, A. De Benedetti, *Oncogene* **1997**, *15*, 579-584.
[78] S. Franklin, T. Pho, F. W. Abreo, R. Nassar, A. De Benedetti, F. J. Stucker, C. O. Nathan, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **1999**, *125*, 177-182.
[79] J. P. Crew, S. Fuggle, R. Bicknell, D. W. Cranston, A. de Benedetti, A. L. Harris, *Br J Cancer* **2000**, *82*, 161-166.
[80] L. S. D'Abronzo, P. M. Ghosh, *Neoplasia* **2018**, *20*, 563-573.
[81] H. J. Berkel, E. A. Turbat-Herrera, R. Shi, A. de Benedetti, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2001**, *10*, 663-666.
[82] N. Seki, T. Takasu, K. Mandai, M. Nakata, H. Saeki, Y. Heike, I. Takata, Y. Segawa, T. Hanafusa, K. Eguchi, *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 3046-3053.
[83] J. Matthews-Greer, A. De Benedetti, A. Tucker, S. Dempsey, D. Black, E. Turbat-Herrera, *J. Appl. Res.* **2002**, *2*, 77-86.
[84] S. Wang, I. B. Rosenwald, M. J. Hutzler, G. A. Pihan, L. Savas, J. J. Chen, B. A. Woda, *Am J Pathol* **1999**, *155*, 247-255.
[85] A. De Benedetti, A. L. Harris, *Int J Biochem Cell Biol* **1999**, *31*, 59-72.
[86] A. Niedzwiecka, J. Marcotrigiano, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, A. Wyslouch-Cieszynska, M. Dadlez, A. C. Gingras, P. Mak, E. Darzynkiewicz, N. Sonenberg, S. K. Burley, R. Stolarski, *J Mol Biol* **2002**, *319*, 615-635.
[87] C. J. Decker, R. Parker, *Genes Dev* **1993**, *7*, 1632-1643.
[88] R. Khanna, M. Kiledjian, *EMBO J* **2004**, *23*, 1968-1976.
[89] E. Grudzien, M. Kalek, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, *J Biol Chem* **2006**, *281*, 1857-1867.
[90] M. Schmid, T. H. Jensen, *Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33*, 501-510.
[91] J. Lykke-Andersen, *Mol Cell Biol.* **2002**, *22*, 8114–8121.
[92] C. T. Chang, N. Bercovich, B. Loh, S. Jonas, E. Izaurralde, *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, 5217-5233.
[93] M. J. Bessman, D. N. Frick, S. F. O'Handley, *J Biol Chem* **1996**, *271*, 25059-25062.
[94] M. Gu, C. Fabrega, S. W. Liu, H. Liu, M. Kiledjian, C. D. Lima, *Mol Cell* **2004**, *14*, 67-80.
[95] Y. Li, E. S. Ho, S. I. Gunderson, M. Kiledjian, *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, 2227-2237.
[96] H. Liu, N. Rodgers, X. Jiao, M. Kiledjian, *Embo Journal* **2002**, *21*, 4699-4708.
[97] C. D. Lima, M. G. Klein, W. A. Hendrickson, *Science* **1997**, *278*, 286-290.
[98] N. Chen, M. A. Walsh, Y. Liu, R. Parker, H. Song, *J Mol Biol* **2005**, *347*, 707-718.
[99] D. K. Gavrilov, X. Shi, K. Das, T. C. Gilliam, C. H. Wang, *Nat Genet* **1998**, *20*, 230-231.
[100] J. Singh, M. Salcius, S. Liu, B. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. Mattoon, J. Printen, J. Christensen, J. Bjornsson, B. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki, M. Gurney, *Acs Chemical Biology* **2008**, *3*, 711-722.
[101] J. R. Graff, B. W. Konicek, T. M. Vincent, R. L. Lynch, D. Monteith, S. N. Weir, P. Schwier, A. Capen, R. L. Goode, M. S. Dowless, Y. Chen, H. Zhang, S. Sissons, K. Cox, A. M. McNulty, S. H. Parsons, T. Wang, L. Sams, S. Geeganage, L. E. Douglass, B. L. Neubauer, N. M. Dean, K. Blanchard, J. Shou, L. F. Stancato, J. H. Carter, E. G. Marcusson, *J Clin Invest* **2007**, *117*, 2638-2648.
[102] N. Moerke, H. Aktas, H. Chen, S. Cantel, M. Reibarkh, A. Fahmy, J. Gross, A. Degterev, J. Yuan, M. Chorev, J. Halperin, G. Wagner, *Cell* **2007**, *128*, 257-267.
[103] G. Descamps, P. Gomez-Bougie, J. Tamburini, A. Green, D. Bouscary, S. Maïga, P. Moreau, S. Le Gouill, C. Pellat-Deceunynck, M. Amiot, *Br J Cancer* **2012**, *106*, 1660-1667.
[104] R. Cencic, D. R. Hall, F. Robert, Y. Du, J. Min, L. Li, M. Qui, I. Lewis, S. Kurtkaya, R. Dingledine, H. Fu, D. Kozakov, S. Vajda, J. Pelletier, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 1046-1051.
[105] J. Cao, L. He, G. Lin, C. Hu, R. Dong, J. Zhang, H. Zhu, Y. Hu, C. R. Wagner, Q. He, B. Yang, *Biochem Pharmacol* **2014**, *89*, 20-30.
[106] D. M. Peffley, C. Sharma, P. Hentosh, R. D. Buechler, *Arch Biochem Biophys* **2007**, *465*, 266-273.
[107] A. Kentsis, I. Topisirovic, B. Culjkovic, L. Shao, K. L. Borden, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 18105-18110.
[108] Y. Jia, T. L. Chiu, E. A. Amin, V. Polunovsky, P. B. Bitterman, C. R. Wagner, *Eur J Med Chem* **2010**, *45*, 1304-1313.
[109] C. R. Wagner, V. V. Iyer, E. J. McIntee, *Med Res Rev* **2000**, *20*, 417-451.
[110] S. CARBERRY, R. RHOADS, D. GOSS, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8078-8083.
[111] X. Du, Y. Li, Y. L. Xia, S. M. Ai, J. Liang, P. Sang, X. L. Ji, S. Q. Liu, *Int J Mol Sci* **2016**, *17*.
[112] M. J. Osborne, L. Volpon, J. A. Kornblatt, B. Culjkovic-Kraljacic, A. Baguet, K. L. Borden, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 3877-3882.
[113] C. Visco, C. Perrera, S. Thieffine, F. Sirtori, R. D'Alessio, P. Magnaghi, *Journal of Biomolecular Screening* **2012**, *17*, 581-592.
[114] S. G. Patching, *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838*, 43-55.
[115] J. Zuberek, J. Jemielity, A. Jablonowska, J. Stepinski, M. Dadlez, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5370-5379.
[116] R. G. Gogliotti, H. Cardona, J. Singh, S. Bail, C. Emery, N. Kuntz, M. Jorgensen, M. Durens, B. Xia, C. Barlow, C. R. Heier, H. L. Plasterer, V. Jacques, M. Kiledjian, J. Jarecki, J. Rusche, C. J. DiDonato, *Hum Mol Genet* **2013**, *22*, 4084-4101.
[117] J. P. Van Meerbeke, R. M. Gibbs, H. L. Plasterer, W. Miao, Z. Feng, M. Y. Lin, A. A. Rucki, C. D. Wee, B. Xia, S. Sharma, V. Jacques, D. K. Li, L. Pellizzoni, J. R. Rusche, C. P. Ko, C. J. Sumner, *Hum Mol Genet* **2013**, *22*, 4074-4083.
[118] J. Poleszak, P. Szabat, M. Szabat, G. Borenski, M. Wojcik, J. Milanowska, K. Rejdak, *Journal of Education, Health and Sport* **2019**, *9*, 585-596.
[119] A. Gopalsamy, A. Narayanan, S. Liu, M. D. Parikh, R. E. Kyne, O. Fadeyi, M. A. Tones, J. J. Cherry, J. F. Nabhan, G. LaRosa, D. N. Petersen, C. Menard, T. L. Foley, S. Noell, Y. Ren, P. M. Loria, J. Maglich-Goodwin, H. Rong, L. H. Jones, *J Med Chem* **2017**, *60*, 3094-3108.
[120] A. Wypijewska, E. Bojarska, M. Lukaszewicz, J. Stepinski, J. Jemielity, R. E. Davis, E. Darzynkiewicz, *Biochemistry* **2012**, *51*, 8003-8013.
[121] B. Wojtczak, P. Sikorski, K. Fac-Dabrowska, A. Nowicka, M. Warminski, D. Kubacka, E. Nowak, M. Nowotny, J. Kowalska, J. Jemielity, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 5987-5999.
[122] M. R. Baranowski, A. Nowicka, J. Jemielity, J. Kowalska, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 4595-4604.
[123] A. Wypijewska, E. Bojarska, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, J. Jemielity, R. Davis, E. Darzynkiewicz, *Febs Journal* **2010**, *277*, 3003-3013.
[124] E. Hett, H. Xu, K. Geoghegan, A. Gopalsamy, R. Kyne, C. Menard, A. Narayanan, M. Parikh, S. Liu, L. Roberts, R. Robinson, M. Tones, L. Jones, *Acs Chemical Biology* **2015**, *10*, 1094-1098.

[125] H. Xu, A. Gopalsamy, E. Hett, S. Salter, A. Aulabaugh, R. Kyne, B. Pierce, L. Jones, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 6179-6183.
[126] D. Martinez Molina, R. Jafari, M. Ignatushchenko, T. Seki, E. A. Larsson, C. Dan, L. Sreekumar, Y. Cao, P. Nordlund, *Science* **2013**, *341*, 84-87.
[127] L. Delang, C. Li, A. Tas, G. Quérat, I. C. Albulescu, T. De Burghgraeve, N. A. Guerrero, A. Gigante, G. Piorkowski, E. Decroly, D. Jochmans, B. Canard, E. J. Snijder, M. J. Pérez-Pérez, M. J. van Hemert, B. Coutard, P. Leyssen, J. Neyts, *Sci Rep* **2016**, *6*, 31819.
[128] K. Das, E. Arnold, *Cell* **2015**, *162*, 239-241.
[129] E. Mühlberger, *Future Virol* **2007**, *2*, 205-215.
[130] G. Sutton, J. M. Grimes, D. I. Stuart, P. Roy, *Nat Struct Mol Biol* **2007**, *14*, 449-451.
[131] D. Chen, C. L. Luongo, M. L. Nibert, J. T. Patton, *Virology* **1999**, *265*, 120-130.
[132] K. M. Reinisch, M. L. Nibert, S. C. Harrison, *Nature* **2000**, *404*, 960-967.
[133] M. Milani, E. Mastrangelo, M. Bollati, B. Selisko, E. Decroly, M. Bouvet, B. Canard, M. Bolognesi, *Antiviral Res* **2009**, *83*, 28-34.
[134] M. Bouvet, C. Debarnot, I. Imbert, B. Selisko, E. J. Snijder, B. Canard, E. Decroly, *PLoS Pathog* **2010**, *6*, e1000863.
[135] S. P. Lim, C. G. Noble, P. Y. Shi, *Antiviral Res* **2015**, *119*, 57-67; H. Dong, S. Ren, B. Zhang, Y. Zhou, F. Puig-Basagoiti, H. Li, P. Y. Shi, *J Virol* **2008**, *82*, 4295-4307.
[136] S. Dunn, O. Lombardi, R. Lukoszek, V. H. Cowling, *Open Biol* **2019**, *9*, 190052.
[137] J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem Biol* **2016**, *11*, 583-597.
[138] S. P. Lim, L. S. Sonntag, C. Noble, S. H. Nilar, R. H. Ng, G. Zou, P. Monaghan, K. Y. Chung, H. Dong, B. Liu, C. Bodenreider, G. Lee, M. Ding, W. L. Chan, G. Wang, Y. L. Jian, A. T. Chao, J. Lescar, Z. Yin, T. R. Vedananda, T. H. Keller, P. Y. Shi, *J Biol Chem* **2011**, *286*, 6233-6240.
[139] W. Aouadi, C. Eydoux, B. Coutard, B. Martin, F. Debart, J. J. Vasseur, J. M. Contreras, C. Morice, G. Quérat, M. L. Jung, B. Canard, J. C. Guillemot, E. Decroly, *Antiviral Res* **2017**, *144*, 330-339.
[140] A. S. Ferreira-Ramos, C. Li, C. Eydoux, J. M. Contreras, C. Morice, G. Quérat, A. Gigante, M. J. Pérez Pérez, M. L. Jung, B. Canard, J. C. Guillemot, E. Decroly, B. Coutard, *Antiviral Res* **2019**, *163*, 59-69.
[141] T. L. Graves, Y. Zhang, J. E. Scott, *Anal Biochem* **2008**, *373*, 296-306.
[142] B. J. Geiss, H. J. Stahla-Beek, A. M. Hannah, H. H. Gari, B. R. Henderson, B. J. Saeedi, S. M. Keenan, *J Biomol Screen* **2011**, *16*, 852-861.
[143] Y. Sun, Z. Wang, J. Tao, Y. Wang, A. Wu, Z. Yang, K. Wang, L. Shi, Y. Chen, D. Guo, *Antiviral Res* **2014**, *104*, 156-164.
[144] S. P. Lim, C. Bodenreider, P. Y. Shi, *Methods Mol Biol* **2013**, *1030*, 249-268.
[145] D. Park, S. S. Choi, K. S. Ha, *Amino Acids* **2010**, *39*, 619-631.
[146] T. Lai, T. Slaughter, K. Peoples, J. Hettasch, C. Greenberg, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 1776-1781.
[147] S. Liu, R. A. Cerione, J. Clardy, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 2743-2747.
[148] R. Kiraly, E. Csosz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, L. Fesus, *Febs Journal* **2009**, *276*, 7083-7096.
[149] M. Pietsch, R. Wodtke, J. Pietzsch, R. Löser, *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23*, 6528-6543.
[150] S. A. Mahoney, M. Wilkinson, S. Smith, L. W. Haynes, *Neuroscience* **2000**, *101*, 141-155.
[151] H. F. Upchurch, E. Conway, M. K. Patterson, M. D. Maxwell, *J Cell Physiol* **1991**, *149*, 375-382.
[152] E. A. Chiocca, P. J. Davies, J. P. Stein, *J Cell Biochem* **1989**, *39*, 293-304; Z. Nemes, R. Adány, M. Balázs, P. Boross, L. Fésüs, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 20577-20583.
[153] L. Huang, A. M. Xu, W. Liu, *Am J Cancer Res* **2015**, *5*, 2756-2776.
[154] M. Lesort, J. Tucholski, M. L. Miller, G. V. Johnson, *Prog Neurobiol* **2000**, *61*, 439-463.
[155] S. Schaertl, M. Prime, J. Wityak, C. Dominguez, I. Munoz-Sanjuan, R. E. Pacifici, S. Courtney, A. Scheel, D. Macdonald, *J Biomol Screen* **2010**, *15*, 478-487.
[156] K. Mehta, *Prog Exp Tumor Res* **2005**, *38*, 1-18.
[157] M. Huber, I. Rettler, K. Bernasconi, E. Frenk, S. P. Lavrijsen, M. Ponec, A. Bon, S. Lautenschlager, D. F. Schorderet, D. Hohl, *Science* **1995**, *267*, 525-528.
[158] R. Seitz, F. Duckert, S. Lopaciuk, L. Muszbek, F. Rodeghiero, U. Seligsohn, *Semin Thromb Hemost* **1996**, *22*, 415-418.
[159] E. Duval, A. Case, R. L. Stein, G. D. Cuny, *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 1885-1889.
[160] T. S. Lai, Y. Liu, T. Tucker, K. R. Daniel, D. C. Sane, E. Toone, J. R. Burke, W. J. Strittmatter, C. S. Greenberg, *Chem Biol* **2008**, *15*, 969-978.
[161] T. M. Jeitner, E. J. Delikatny, J. Ahlqvist, H. Capper, A. J. Cooper, *Biochem Pharmacol* **2005**, *69*, 961-970.
[162] A. Case, R. Stein, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1106-1115.
[163] J. Kowalska, M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Bojarska, J. Wojcik, L. S. Cohen, R. E. Davis, J. Stepinski, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 595-600.
[164] J. Kowalska, A. Wypijewska del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Strenkowska, M. Ziemniak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin, J. Jemielity, *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, 10245-10264.
[165] M. Strenkowska, P. Wanat, M. Ziemniak, J. Jemielity, J. Kowalska, *Org Lett* **2012**, *14*, 4782-4785.
[166] J. Kowalska, M. Lewdorowicz, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 5475-5479.
[167] M. Baranowski, A. Nowicka, A. Rydzik, M. Warminski, R. Kasprzyk, B. Wojtczak, J. Wojcik, T. Claridge, J. Kowalska, J. Jemielity, *Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80*, 3982-3997.
[168] M. Kalek, J. Jemielity, Z. M. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, E. Darzynkiewicz, *Bioorg Med Chem* **2006**, *14*, 3223-3230.
[169] A. M. Rydzik, M. Kulis, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Zuberek, Z. M. Darzynkiewicz, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 1699-1710.
[170] A. M. Rydzik, M. Warminski, P. J. Sikorski, M. R. Baranowski, S. Walczak, J. Kowalska, J. Zuberek, M. Lukaszewicz, E. Nowak, T. D. W Claridge, E. Darzynkiewicz, M. Nowotny, J. Jemielity, *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, 8661-8675.
[171] P. Wanat, S. Walczak, B. Wojtczak, M. Nowakowska, J. Jemielity, J. Kowalska, *Organic Letters* **2015**, *17*, 3062-3065.
[172] S. Walczak, A. Nowicka, D. Kubacka, K. Fac, P. Wanat, S. Mroczek, J. Kowalska, J. Jemielity, *Chem Sci* **2017**, *8*, 260-267.
[173] A. M. Rydzik, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, J. Kowalska, Z. M. Darzynkiewicz, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 4763-4776.
[174] J. Kowalska, M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Grudzien-Nogalska, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Rhoads, E. Darzynkiewicz, R. Davis, J. Jemielity, *Rna-a Publication of the Rna Society* **2008**, *14*, 1119-1131.
[175] M. Warminski, P. J. Sikorski, J. Kowalska, J. Jemielity, *Top Curr Chem (Cham)* **2017**, *375*, 16.
[176] M. Strenkowska, R. Grzela, M. Majewski, K. Wnek, J. Kowalska, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, A. N. Kuhn, U. Sahin, J. Jemielity, *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 9578-9590.
[177] R. Kasprzyk, J. Kowalska, Z. Wieczorek, M. Szabelski, R. Stolarski, J. Jemielity, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 3863-3868.
[178] S. Li, Y. Jia, B. Jacobson, J. McCauley, R. Kratzke, P. B. Bitterman, C. R. Wagner, *Mol Pharm* **2013**, *10*, 523-531.
[179] K. Kijewska, P. Głowala, J. Kowalska, J. Jemielity, K. Kaczyńska, K. Janiszewska, J. Stolarski, G. J. Blanchard, D. Kępińska, K. Lubelska, K. Wiktorska, M. Pisarek, M. Mazur, *Polymer* **2015**, *57*, 77-87.
[180] K. Kijewska, A. Jarzębińska, J. Kowalska, J. Jemielity, D. Kępińska, J. Szczytko, M. Pisarek, K. Wiktorska, J. Stolarski, P. Krysiński, A. Twardowski, M. Mazur, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1867-1876.
[181] M. Zochowska, A. C. Piguet, J. Jemielity, J. Kowalska, E. Szolajska, J. F. Dufour, J. Chroboczek, *Nanomedicine* **2015**, *11*, 67-76.

[182] E. Grudzien-Nogalska, J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads, *RNA* **2007**, *13*, 1745-1755.
[183] A. Kuhn, M. Diken, S. Kreiter, A. Selmi, J. Kowalska, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, C. Huber, O. Tureci, U. Sahin, *Gene Therapy* **2010**, *17*, 961-971.
[184] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed., Springer, **2006**.
[185] T. F. Massoud, S. S. Gambhir, *Genes Dev* **2003**, *17*, 545-580.
[186] D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon, T. D. James, *Chem Soc Rev* **2017**, *46*, 7105-7123.
[187] K. Chen, X. Chen, *Curr Top Med Chem* **2010**, *10*, 1227-1236.
[188] M. K. Rahim, R. Kota, S. Lee, J. B. Haun, *Nanotechnol Rev* **2013**, *2*, 215–227.
[189] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 2686-2695.
[190] M. P. VanBrunt, K. Shanebeck, Z. Caldwell, J. Johnson, P. Thompson, T. Martin, H. Dong, G. Li, H. Xu, F. D'Hooge, L. Masterson, P. Bariola, A. Tiberghien, E. Ezeadi, D. G. Williams, J. A. Hartley, P. W. Howard, K. H. Grabstein, M. A. Bowen, M. Marelli, *Bioconjug Chem* **2015**, *26*, 2249-2260.
[191] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 2596-2599.
[192] P. Liu, S. Brown, T. Goktug, P. Channathodiyil, V. Kannappan, J. P. Hugnot, P. O. Guichet, X. Bian, A. L. Armesilla, J. L. Darling, W. Wang, *Br J Cancer* **2012**, *107*, 1488-1497.
[193] M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem Soc Rev* **2014**, *43*, 6511-6526.
[194] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem Biol* **2006**, *1*, 644-648.
[195] G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, 2443-2447.
[196] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 2253-2255.
[197] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 13518-13519.
[198] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 2297-2299.
[199] P. Kumar, O. Zainul, F. M. Camarda, T. Jiang, J. A. Mannone, W. Huang, S. T. Laughlin, *Org Lett* **2019**, *21*, 3721-3725.
[200] S. J. Siegl, J. Galeta, R. Dzijak, M. Dračínský, M. Vrabel, *Chempluschem* **2019**, *84*, 493-497.
[201] J. Dong, L. Krasnova, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53*, 9430-9448.
[202] A. S. Barrow, C. J. Smedley, Q. Zheng, S. Li, J. Dong, J. E. Moses, *Chem Soc Rev* **2019**, *48*, 4731-4758.
[203] S. Li, P. Wu, J. E. Moses, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, *56*, 2903-2908.
[204] Q. Chen, P. Mayer, H. Mayr, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 12664-12667.
[205] C. J. Smedley, M. C. Giel, A. Molino, A. S. Barrow, D. J. D. Wilson, J. E. Moses, *Chem Commun (Camb)* **2018**, *54*, 6020-6023.
[206] Q. Zhao, X. Ouyang, X. Wan, K. S. Gajiwala, J. C. Kath, L. H. Jones, A. L. Burlingame, J. Taunton, *J Am Chem Soc* **2017**, *139*, 680-685.
[207] Z. Liu, J. Li, S. Li, G. Li, K. B. Sharpless, P. Wu, *J Am Chem Soc* **2018**, *140*, 2919-2925.
[208] F. V. Bright, and Munson, C. A., *Anal. Chim.*

Acta **2003**, *500*, 71–104.
[209] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem Biol* **2008**, *3*, 142-155.
[210] J. F. W. Herschel, *Phil Trans Roy Soc* **1845**, *135*, 143–145.
[211] O. S. Wolfbeis, *The fluorescence of organic natural products. In Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications—Part 1*, Wiley, New York, **1985**.
[212] J. M. Beechem, L. Brand, *Annu Rev Biochem* **1985**, *54*, 43-71.
[213] A. Baeyer, *Ber.*

Dtsch. Chem. Ges. **1871**, *4*, 555-558.
[214] J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig, L. D. Lavis, *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 1303-1310.
[215]
[216] U. Woggon, *Optical Properties of Semiconductor Quantum Dots, Vol. 136*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1997**.
[217] G. K. Bains, S. H. Kim, E. J. Sorin, V. Narayanaswami, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6207-6219.
[218] B. Bondurant, J. A. Last, T. A. Waggoner, A. S lade, S. D. Y., *Langmuir* **2003**, *19*, 1829-1837; J. Duhamel, *Polymers* **2012**, *4*, 211-239.
[219] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley, New York, **1970**; J. Duhamel, *Langmuir* **2012**, *28*, 6527-6538.
[220] E. M. S. Castanheira, J. M. G. Martinho, *J Photochem Phorobiol A: Chem* **1994**, *80*, 151-156.
[221] J. K. McVey, D. M. Shold, N. C. Yang, *J. Chem. Phys* **1976**, ***65***, 3375.
[222] L. Augenstein , R. Mason , B. Rosenberg, *Physical Processes in Radiation Biology: Proceedings of an International Symposium Sponsored by the U.S. Atomic Energy Commission and Held at the Kellogg Center for Continuing Education, Michigan State University, on May 6–8, 1963*, Elsevier, **1964**.
[223] P. F. Jones, *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 5440.
[224] I. V. Astakhova, A. D. Malakhov, I. A. Stepanova, A. V. Ustinov, S. L. Bondarev, A. S. Paramonov, V. A. Korshun, *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 1972-1980.
[225] A. D. Malakhov, M. V. Skorobogatyi, I. A. Prokhorenko, S. V. Gontarev, D. T. Kozhich, D. A. Stetsenko, I. A. Stepanova, Z. O. Shenkarev, Y. A. Berlin, V. A. Korshun, *Eur J Org Chem* **2004**, *2004*, 1298–1307.
[226] H. Maeda, T. Maeda, K. Mizuno, K. Fujimoto, H. Shimizu, M. Inouye, *Chemistry* **2006**, *12*, 824-831.
[227] J. Gorman, R. Pandya, J. R. Allardice, M. B. Price, T. W. Schmidt, R. H. Friend, A. Rao, N. J. L. K. Davis, *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **2019**, *123*, 3433-3440.
[228] G. Han, D. Kim, Y. Park, J. Bouffard, Y. Kim, *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54*, 3912-3916.
[229] C. Shi, H. Gu, C. Ma, *Anal Biochem* **2010**, *400*, 99-102.
[230] P. Wu, L. Brand, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10457-10462.
[231] L. Stryer, *Annu Rev Biochem* **1978**, *47*, 819-846.
[232] B. T. Bajar, E. S. Wang, S. Zhang, M. Z. Lin, J. Chu, *Sensors (Basel)* **2016**, *16*.
[233] A. l. o. o. panel, J. Saha, A. Datta, D. Dey, D. Bhattcharjee, S. A. Hussain, *Materials Today: Proceedings* **2015**, *5*, 2306-2313
[234] S. S. Vogel, B. W. van der Meer, P. S. Blank, *Methods* **2014**, *66*, 131-138.
[235] N. Hardt, S. Hacker, A. Marx, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 8298-8305.
[236] S. Hacker, D. Pagliarini, T. Tischer, N. Hardt, D. Schneider, M. Mex, T. Mayer, M. Scheffner, A. Marx, *Angewandte Chemie-International Edition* **2013**, *52*, 11916-11919.
[237] N. Hardt, S. M. Hacker, A. Marx, *Org Biomol Chem* **2013**, *11*, 8298-8305.
[238] S. M. Hacker, D. Pagliarini, T. Tischer, N. Hardt, D. Schneider, M. Mex, T. U. Mayer, M. Scheffner, A. Marx, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52*, 11916-11919.
[239] H. Kautsky, *Trans Faraday Soc* **1939**, *35*, 216-219.
[240] P. W. Jensen, M. Falconi, E. L. Kristoffersen, A. T. Simonsen, J. B. Cifuentes, L. B. Marcussen, R. Frøhlich, J. Vagner, C. Harmsen, S. Juul, Y. P. Ho, M. A. Withers, J. R. Lupski, J. Koch, A. Desideri, B. R. Knudsen, M. Stougaard, *Biosens Bioelectron* **2013**, *48*, 230-237.
[241] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *J Phys Chem* **1953**, *57*, 670-673.
[242] H. S. Song, T. H. Park, *Biotechnol J* **2011**, *6*, 1310-1316.
[243] M. Zheng, S. Liu, J. Li, D. Qu, H. Zhao, X. Guan, X. Hu, Z. Xie, X. Jing, Z. Sun, *Adv Mater* **2014**, *26*, 3554-3560.
[244] L. T. Rosenblum, N. Kosaka, M. Mitsunaga, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Mol Membr Biol* **2010**, *27*, 274-285.
[245] F.-M. Chen, X. Liu, *Progress in Polymer Science* **2016**, *53*, 86-168.
[246] Y. Wu, J. A. Phillips, H. Liu, R. Yang, W. Tan, *ACS Nano* **2008**, *2*, 2023-2028.
[247] W. Putzbach, N. J. Ronkainen, *Sensors (Basel)* **2013**, *13*, 4811-4840.
[248] S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, *Microchim. Acta* **1998**, *128*, 127–143.

[249] B. Gulbakan, E. Yasun, M. I. Shukoor, Z. Zhu, M. You, X. Tan, H. Sanchez, D. H. Powell, H. Dai, W. Tan, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 17408-17410.
[250] Y. Xu, Z. Liu, X. Zhang, Y. Wang, J. Tian, Y. Huang, Y. Ma, X. Zhang, Y. Chen, *Adv Mater* **2009**, *21*, 1275-1279.
[251] J. Shen, M. Shi, B. Yan, H. Ma, N. Li, Y. Hu, M. Ye, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2010**, *81*, 434-438.
[252] Z. Wang, Z. Ge, X. Zheng, N. Chen, C. Peng, C. Fan, Q. Huang, *Nanoscale* **2012**, *4*, 394-399.
[253] B. Gigliotti, B. Sakizzie, D. S. Bethune, R. M. Shelby, J. N. Cha, *Nano Lett* **2006**, *6*, 159-164.
[254] X. Tang, S. Bansaruntip, N. Nakayama, E. Yenilmez, Y. L. Chang, Q. Wang, *Nano Lett* **2006**, *6*, 1632-1636.
[255] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, *Front Chem* **2014**, *2*, 63.
[256] B. S. He, B. Song, D. Li, C. Zhu, W. Qi, Y. Wen, L. Wang, S. Song, H. Fang, C. Fan, *Adv. Funct. Mater* **2010**, *20*, 453–459.
[257] D. Rendell, *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, **1987**.
[258] D. M. Jameson, J. A. Ross, *Chem Rev* **2010**, *110*, 2685-2708.
[259] R. D. Spencer, F. B. Toledo, B. T. Williams, N. L. Yoss, *Clin Chem* **1973**, *19*, 838-844.
[260] C. Ludwig, *Sitzungber Bayer Akad Wiss Wien MathNaturwiss Kl* **1856**, *20*.
[261] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, *Assay Drug Dev Technol* **2011**, *9*, 342-353.
[262] T. H. Scheuermann, S. B. Padrick, K. H. Gardner, C. A. Brautigam, *Anal Biochem* **2016**, *496*, 79-93.
[263] M. Jerabek-Willemsen, T. André, R. Wanner, H. M. Roth, S. Duhr, P. Baaske, D. Breitsprecher, *Journal of Molecular Structure* **2014**, *1077*, 101–113.
[264] U. Curth, C. Urbanke, J. Greipel, H. Gerberding, V. Tiranti, M. Zeviani, *Eur J Biochem* **1994**, *221*, 435-443.
[265] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J Biomol Screen* **1999**, *4*, 67-73.
[266] Z. Kecki, *Podstawy spektroskopii molekularnej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, **2020**.
[267] F. M. Mirabella, *Internal reflection spectroscopy : theory and applications, Vol. 15*, Marcel Dekker, New York, **1993**.
[268] A. Ausili, M. Sánchez, J. C. Gómez-Fernández, *Biomedical Spectroscopy and Imaging* **2015**, *4*, 159-170.
[269] M. B. Mitchell, *Advances in Chemistry* **1993**, *236*, 351-375.
[270] A. J. Margenot, F. J. Caldero´n, K. W. Goyne, F. N. D. Mukome, S. J. Parikh, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, Third Edition, Vol. 2*, Elsevier Ltd, Oxford, **2017**, pp. 448-454.
[271] L. Kou, H. He, C. Gao, *Nano-Micro Lett* **2010**, *2*, 177-183.
[272] P. Atkins, J. de Paula, *Chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, **2019**.
[273] A. C. Ferrari, D. M. Basko, *Nat Nanotechnol* **2013**, *8*, 235-246.
[274] L. M. Malard, M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Physical Reports* **2009**, *473*, 51-87.
[275] K. N. Kudin, B. Ozbas, H. C. Schniepp, R. K. Prud'homme, I. A. Aksay, R. Car, *Nano Lett* **2008**, *8*, 36-41.
[276] C. Faugeras, A. Nerrière, M. Potemski, A. Mahmood, E. Dujardin, C. Berger, W. A. de Heer, *Appl Phys Lett* **2008**, *92*.
[277] T. M. G. Mohiuddin, A. Lombardo, R. R. Nair, A. Bonetti, G. Savini, R. Jalil, N. Bonini, D. M. Basko, C. Galiotis, N. Marzari, K. S. Novoselov, A. K. a. F. A. C. Geim, *Phys. Rev. B* **2009**, *79*.
[278] J. M. Urban, P. Dabrowski, J. Binder, M. Kopciuszynski, A. Wysmolek, Z. Klusek, M. Jalochowski, W. Strupinski, J. M. Baranowski, *J Appl Phys* **2014**, *114*.
[279] B. Lesiak, L. Kövér, J. Tóth, J. Zemek, P. Jiricek, A. Kromka, N. Rangam, *Applied Surface Science* **2018**, *452*, 223-231.
[280] D. R. Baer, J. E. Amonette, M. H. Engelhard, D. J. Gaspar, A. S. Karakoti, S. Kuchibhatla, P. Nachimuthu, J. T. Nurmi, Y. Qiang, V. Sarathy, S. Seal, A. Sharma, P. G. Tratnyek, C.-M. Wang, *Surface and Interface Analysis* **2008**, *40*, 529-537.
[281] S. K. Yadav, H. J. Yoo, J. W. Cho, *JOURNAL OF POLYMER SCIENCE: PART B: POLYMER PHYSICS 2* **2012**, *51*, 39-47.
[282] F. T. Johra, J. Lee, W. Jung, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2014**, *20*, 2883-2887.
[283] H. Wendel, R. Silva, A. Malina, J. Mills, H. Zhu, T. Ueda, R. Watanabe-Fukunaga, R. Fukunaga, J. Teruya-Feldstein, J. Pelletier, S. Lowe, *Genes & Development* **2007**, *21*, 3232-3237.
[284] B. D. Li, L. Liu, M. Dawson, A. De Benedetti, *Cancer* **1997**, *79*, 2385-2390.
[285] L. Furic, L. Rong, O. Larsson, I. Koumakpayi, K. Yoshida, A. Brueschke, E. Petroulakis, N. Robichaud, M. Pollak, L. Gaboury, P. Pandolfi, F. Saad, N. Sonenberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 14134-14139.
[286] J. T. Cunningham, M. V. Moreno, A. Lodi, S. M. Ronen, D. Ruggero, *Cell* **2014**, *157*, 1088-1103.
[287] J. Singh, M. Salcius, S. W. Liu, B. L. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. R. Mattoon, J. Printen, J. Christensen, J. M. Bjornsson, B. A. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki, M. E. Gurney, *ACS Chem Biol* **2008**, *3*, 711-722.
[288] A. Niedzwiecka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz, N. Sonenberg, R. Stolarski, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12140-12148.
[289] T. Youtani, K. Tomoo, T. Ishida, H. Miyoshi, K. Miura, *Iubmb Life* **2000**, *49*, 27-31.
[290] A. Natarajan, N. Moerke, Y. Fan, H. Chen, W. Christ, G. Wagner, J. Halperin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 2657-2660.
[291] J. Jarecki, X. Chen, A. Bernardino, D. D. Coovert, M. Whitney, A. Burghes, J. Stack, B. A. Pollok, *Hum Mol Genet* **2005**, *14*, 2003-2018.
[292] K. Y. Chung, H. Dong, A. T. Chao, P. Y. Shi, J. Lescar, S. P. Lim, *Virology* **2010**, *402*, 52-60.
[293] M. Kalek, J. Jemielity, E. Grudzien, J. Zuberek, E. Bojarska, L. S. Cohen, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 615-621.
[294] P. Wanat, R. Kasprzyk, M. Kopcial, P. J. Sikorski, D. Strzelecka, J. Jemielity, J. Kowalska, *Chem Commun (Camb)* **2018**, *54*, 9773-9776.
[295] H. Jiang, J. Congleton, Q. Liu, P. Merchant, F. Malavasi, H. C. Lee, Q. Hao, A. Yen, H. Lin, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 1658-1659.
[296] M. Kopcial, B. A. Wojtczak, R. Kasprzyk, J. Kowalska, J. Jemielity, *Molecules* **2019**, *24*.
[297] S. Datta, M. A. Antonyak, R. A. Cerione, *Biochemistry* **2006**, *45*, 13163-13174.
[298] C. Wurth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger, *Nature Protocols* **2013**, *8*, 1535-1550.
[299] R. Kasprzyk, B. J. Starek, S. Ciechanowicz, D. Kubacka, J. Kowalska, J. Jemielity, *Chemistry* **2019**, *25*, 6728-6740.
[300] J. Kowalska, E. Grudzien-Nogalska, M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Rhoads, E. Darzynkiewicz, R. Davis, J. Jemielity, M. Hocek, *Chemistry of Nucleic Acid Components* **2008**, *10*, 362-365.
[301] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, S. Wang, *Anal Biochem* **2004**, *332*, 261-273.
[302] S. Walczak, P. J. Sikorski, R. Kasprzyk, J. Kowalska, J. Jemielity, *Org Biomol Chem* **2018**, *16*, 6741-6748.
[303] S. Golojuch, M. Kopcial, D. Strzelecka, R. Kasprzyk, N. Baran, P. J. Sikorski, J. Kowalska, J. Jemielity, *Bioorg Med Chem* **2020**, *28*, 115523.
[304] M. R. Baranowski, A. Nowicka, J. Jemielity, J. Kowalska, *Org Biomol Chem* **2016**, *14*, 4595-4604.
[305] B. Y. Feng, A. Simeonov, A. Jadhav, K. Babaoglu, J. Inglese, B. K. Shoichet, C. P. Austin, *J Med Chem* **2007**, *50*, 2385-2390.
[306] B. K. Shoichet, *J Med Chem* **2006**, *49*, 7274-7277; M. H. Roehrl, J. Y. Wang, G. Wagner, *Biochemistry* **2004**, *43*, 16056-16066.
[307] R. Kasprzyk, M. Fido, A. Mamot, P. Wanat, M. Smietanski, M. Kopcial, V. H. Cowling, J. Kowalska, J. Jemielity, *Chem Eur J* **2020**.
[308] R. Eisenthal, M. J. Danson, D. W. Hough, *Trends Biotechnol* **2007**, *25*, 247-249.
[309] M. Chromiński, M. R. Baranowski, S. Chmielinski, J. Kowalska, J. Jemielity, *J Org Chem* **2020**.
[310] R. V. La Rocca, C. A. Stein, C. E. Myers, *Cancer Cells* **1990**, *2*, 106-115.

[311] S. Zimmermann, L. Hall, S. Riley, J. Sørensen, R. E. Amaro, A. Schnaufer, *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, e24; J. Trapp, R. Meier, D. Hongwiset, M. U. Kassack, W. Sippl, M. Jung, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1419-1431; Y. Xu, I. Triantafyllou, M. Cable, R. Palermo, *Anal Biochem* **2008**, *372*, 89-95.
[312] K. M. Drake, V. G. Watson, A. Kisielewski, R. Glynn, A. D. Napper, *Assay Drug Dev Technol* **2014**, *12*, 258-271; K. Y. Horiuchi, M. M. Eason, J. J. Ferry, J. L. Planck, C. P. Walsh, R. F. Smith, K. T. Howitz, H. Ma, *Assay Drug Dev Technol* **2013**, *11*, 227-236; G. Ibanez, D. Shum, G. Blum, B. Bhinder, C. Radu, C. Antczak, M. Luo, H. Djaballah, *Comb Chem High Throughput Screen* **2012**, *15*, 359-371.
[313] R. G. González, R. S. Haxo, T. Schleich, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4299-4303.
[314] Y. Feng, M. Li, B. Wang, Y. G. Zheng, *J Med Chem* **2010**, *53*, 6028-6039.
[315] J. Jemielity, T. Fowler, J. Zuberek, J. Stepinski, M. Lewdorowicz, A. Niedzwiecka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, R. Rhoads, *Rna-a Publication of the Rna Society* **2003**, *9*, 1108-1122.
[316] R. Wodtke, C. Hauser, G. Ruiz-Gómez, E. Jäckel, D. Bauer, M. Lohse, A. Wong, J. Pufe, F. A. Ludwig, S. Fischer, S. Hauser, D. Greif, M. T. Pisabarro, J. Pietzsch, M. Pietsch, R. Löser, *J Med Chem* **2018**, *61*, 4528-4560.
[317] W. P. Katt, N. J. Blobel, S. Komarova, M. A. Antonyak, I. Nakano, R. A. Cerione, *Oncotarget* **2018**, *9*, 34379-34397.
[318] M. K. Kozarski, D. Wojtczak, B. A. Kasprzyk, R. Baranowski, M. R. Kowalska, J., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**.
[319] I. O. Aparin, V. M. Farzan, O. A. Veselova, A. A. Chistov, A. T. Podkolzin, A. V. Ustinov, G. A. Shipulin, A. A. Formanovsky, V. A. Korshun, T. S. Zatsepin, *Analyst* **2016**, *141*, 1331-1338.
[320] K. Shinohara, C. King, A. D. Carter, E. J. Regan, A. Arias, J. Bergman, M. Urteaga, B. Brar, *IEEE Electron Device Letters* **2018**, *39*, 417-420.
[321] W. Strupinski, K. Grodecki, A. Wysmolek, R. Stepniewski, T. Szkopek, P. E. Gaskell, A. Grüneis, D. Haberer, R. Bozek, J. Krupka, J. M. Baranowski, *Nano Lett* **2011**, *11*, 1786-1791.
[322] J. Binder, J. M. Urban, R. Stepniewski, W. Strupinski, A. Wysmolek, *Nanotechnology* **2016**, *27*, 045704.
[323] D. C. Marcano, D. V. Kosynkin, J. M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L. B. Alemany, W. Lu, J. M. Tour, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4806-4814.
[324] S. Eigler, Y. Hu, Y. Ishii, A. Hirsch, *Nanoscale* **2013**, *5*, 12136-12139.
[325] K. P. Loh, Q. Bao, P. K. Ang, J. Yang, *J Mater Chem* **2010**, *20*, 2277-2289.
[326] S. Eigler, C. Dotzer, F. Hof, W. Bauer, A. Hirsch, *Chemistry* **2013**, *19*, 9490-9496.
[327] T. Mukaiyama, M. Hashimoto, *J Am Chem Soc* **1972**, *94*, 8528-8532.
[328] J. Zuberek, A. Wyslouch-Cieszynska, A. Niedzwiecka, M. Dadlez, J. Stepinski, W. Augustyniak, A. C. Gingras, Z. Zhang, S. K. Burley, N. Sonenberg, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, *RNA* **2003**, *9*, 52-61.
[329] M. M. Bradford, *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-254.
[330] D. Mukherjee, D. T. Fritz, W. J. Kilpatrick, M. Gao, J. Wilusz, *Methods Mol Biol* **2004**, *257*, 193-212.
[331] A. N. Fletcher, *J Mol Spectrosc.* **1967**, *23*, 221-224.
[332] R. E. Kellogg, R. G. Bennett, *J Chem Phys* **1964**, *41*, 3042-3045.
[333] H. C. Cheng, *J Pharmacol Toxicol Methods* **2001**, *46*, 61-71.