

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Marek Baranowski

Nr albumu: 307 483

***Fluorofosforanowe analogi (oligo)nukleotydów
jako narzędzia do badań procesów biologicznych***

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
prof. dr. hab. Jacka Jemielitego
oraz dr hab. Joanny Kowalskiej

w Zakładzie Biofizyki
Instytutu Fizyki Doświadczalnej
Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa 2022

Badania zrealizowano w ramach projektu Diamentowy Grant finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (0149/DIA/2014/43) oraz stypendium ETIUDA 7 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (2019/32/T/ST4/00071) i stypendium START finansowanego ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (START 004.2021).

Praca była realizowana w Laboratorium Chemii Bioorganicznej Zakładu Biofizyki IFD na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego oraz w Laboratorium Chemii Bioorganicznej Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Promotorowi pomocniczemu - dr hab. Joannie Kowalskiej

za wprowadzenie w świat chemii nukleotydów i kwasów nukleinowych,
za zaszczepienie ciekawości naukowej, bez której realizacja badań nie byłaby taką przygodą,
za cierpliwość i ogromne wsparcie w sprawach merytorycznych, formalnych
i pozanaukowych,
za wsparcie w dążeniu do realizacji celów naukowych,
za przekazaną wiedzę oraz doświadczenie;

Promotorowi – prof. dr. hab. Jackowi Jemielitemu, za możliwość dołączenia do zespołu naukowego już na pierwszych latach studiów licencjackich, za przekazaną wiedzę i doświadczenie, a także stworzenie wielu możliwości prezentacji własnych wyników i rozwoju w różnych dziedzinach nauki;

dr. Marcinowi Warmińskiemu za pomoc w syntezie oligonukleotydów oraz owocne dyskusje naukowe;

dr Dorocie Kubackiej za nieocenioną pomoc w przygotowaniu białek oraz naukę technik badawczych stosowanych w biologii, co dla studenta biofizyki było niemałym wyzwaniem;

dr. Mikołajowi Chromińskiemu za wnikliwe przeczytanie i skrytykowanie niniejszej rozprawy doktorskiej;

dr Annie Wojtczak za owocną współpracę przy opracowaniu nowej metody wysokoprzepustowego badania przesiewowego białek;

mgr Marcelinie Bednarczyk za pomoc w badaniach specyficzności i regioselektywności substratowej ludzkiego enzymu Fhit;

mgr. inż. Sebastianowi Chmielińskiemu za nieustanne wsparcie w kwestiach funkcjonowania laboratorium oraz **mgr Karolinie Kaczmarek** za sprawne realizowanie wszystkich potrzeb związanych z zamówieniami odczynników chemicznych;

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Chemii Bioorganicznej za owocne dyskusje, wyjątkową atmosferę w laboratorium oraz za niezapomniane wyjazdy na konferencje naukowe.

Spis treści

PODZIĘKOWANIA	5
SPIS TREŚCI	7
STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	11
WYKAZ SKRÓTÓW	13
WPROWADZENIE	15
1. PRZEGLĄD LITERATUROWY	22
1.1 Atom fluoru w cząsteczkach organicznych	22
1.1.1 Zmiana właściwości biologicznych	23
1.1.2 Zmiana właściwości spektroskopowych	27
1.2 Atom fluoru w nukleozydach, nukleotydach oraz kwasach nukleinowych	28
1.2.1 Budowa kwasów nukleinowych a możliwe miejsca wprowadzenia fluoru	28
1.2.2 Podejścia syntetyczne w otrzymywaniu fluorowanych nukleozydów	33
1.2.3 Fluorowane nukleotydy i kwasy nukleinowe jako związki terapeutyczne	36
1.2.4 Fluorowane oligonukleotydy jako sondy molekularne w badaniach ^{19}F NMR	41
1.2.4.1 Fluor wprowadzony w obręb zasady azotowej - pirymidyny	44
1.2.4.2 Fluor wprowadzony w obręb zasady azotowej - puryny	51
1.2.4.3 Fluorowany podstawnik wprowadzony w obręb rybozy	59
1.2.4.4 Fluor wprowadzony na końcu nici oligonukleotydowej	65
1.3 Wykorzystanie związków fluorowanych jako substratów reporterowych	69
1.3.1 Monitorowanie reakcji enzymatycznych za pomocą fluorescencji	69
1.3.2 Monitorowanie reakcji enzymatycznych metodą ^{19}F NMR	74
1.4 Fluorofosforan jako modyfikacja grupy fosforanowej	79
1.5 Metody syntezy fluorofosforanowych analogów nukleotydów	81
1.6 Enzymy akceptujące fluorofosforan jako substrat	85
1.6.1 Fosfodiesteraza z jadu węża I (PDE-I)	86
1.6.2 Białka z rodziny HIT	87
1.6.2.1 Enzym dekapujący mRNA (DcpS)	88
1.6.2.2 Supresor nowotworowy – enzym Fhit	90
1.7 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	95
1.7.1 Podstawy fizyczne magnetycznego rezonansu jądrowego	95
1.7.2 Układ pomiarowy NMR	100
1.7.3 Podstawowe pojęcia opisujące widmo NMR	102
1.7.4 Spektroskopia ^{19}F NMR	107

BADANIA WŁASNE	109
2. ZASTOSOWANIE FLUOROFOSFORANOWYCH POCHODNYCH NUKLEOTYDÓW DO PROFILOWANIA PREFERENCJI SUBSTRATOWYCH I POSZUKIWANIA INHIBITORÓW ENZYMÓW HYDROLIZUJĄCYCH FLUOROFOSFORANOWE ANALOGI NUKLEOTYDÓW	115
2.1 Cele i obiekty badań	115
2.2 Fluorofosforanowe analogi nukleotydów w badaniach wysokoprzepustowych	116
2.2.1 Optymalizacja metody wysokoprzepustowej	119
2.2.2 Biblioteki związków	128
2.2.3 Badania HTS – enzym PDE-I	130
2.2.4 Badania HTS – enzym hDcpS	133
2.2.5 Badania HTS – hFhit oraz AtFhit	138
2.2.6 Porównanie profili substratowych enzymów z rodzin HIT	145
2.3 Nowe dinukleotydy adeninowe jako potencjalne inhibitory ludzkiego Fhit	151
2.3.1 Synteza chemiczna zaprojektowanych związków	151
2.3.2 Charakterystyka NMR otrzymanych dinukleotydów adeninowych	155
2.3.3 Charakterystyka enzymatyczna nowych analogów adeninowych	160
2.4 Zestawienie najlepszych zidentyfikowanych inhibitorów ludzkiego enzymu Fhit	162
3. FLUOROWE ANALOGI (OLIGO)NUKLEOTYDÓW JAKO SONDY MOLEKULARNE W BADANIACH ¹⁹F NMR	165
3.1 Cele i obiekty badań	165
3.2 Nowe oligonukleotydowe sondy molekularne znakowane fluorem	166
3.2.1 Synteza fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów	166
3.2.2 Charakterystyka ¹⁹ F NMR oraz HRMS	172
3.2.3 Synteza niemodyfikowanych oligonukleotydów	177
3.2.4 Wpływ fluorofosforanu na stabilność struktur drugorzędowych DNA	179
3.2.5 Zastosowanie sond molekularnych w badaniach metodą ¹⁹ F NMR	186
3.2.5.1 Dupleksy DNA i niekomplementarność nukleotydowe	186
3.2.5.2 G-kwadrupleks i oddziaływanie z trombiną	195
3.2.5.3 Struktury <i>i</i> -motywu oraz oddziaływanie z ligandami	200
3.3 Trifluorometylowane puryny jako sondy molekularne w badaniach ¹⁹ F NMR	214
3.3.1 Aktywność katalityczna i specyficzność substratowa ludzkiego białka hFhit	215
3.3.2 Aktywność katalityczna białek rozpoznających nukleotydy zawierające N7-metyloguaninę	219
4. PODSUMOWANIE	222
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	226
5.1 Informacje ogólne	226
5.1.1 Odczynniki chemiczne i rozpuszczalniki	226
5.1.2 Metody oczyszczania związków	226

5.1.2.1	Chromatografia cieczowa (RP-HPLC)	226
5.1.2.2	Chromatografia jonowymienna	227
5.1.3	Spektrometria mas	227
5.1.4	Obliczanie wydajności reakcji chemicznych	227
5.2	Syntezy chemiczne	228
5.3	Syntezy mono- i dinukleotydów	228
5.3.1	Synteza 5'-jodo adenozyiny, 5'IA	228
5.3.2	Synteza 5'-fosforanu 5'-deoxy-5'-tioadenozyiny, ASp	228
5.3.3	Synteza imidazolidu 5'-fosforanu 5'-deoxy-5'-tioadenozyiny, ASp-Im	229
5.3.4	Synteza P1-(5'-deoksy-5'-tioadenozyino)-P2-(5'-adenozyino) difosforanu, ASppA oraz P1-(5'-deoksy-5'-tioadenozyino)-P3-(5'-adenozyino) trifosforanu, ASpppA	229
5.3.5	Synteza P1,P3-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyino) trifosforanu, ASpppSA oraz 5'-difosforotiolanu adenozyiny, ASpp i P1,P2-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyino) difosforanu, ASppSA jako produktów ubocznych	230
5.3.6	Synteza P1,P4-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyino) tetrafosforanu, ASp₄SA oraz P1,P5-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyino) pentaforanu, ASp₅SA	231
5.3.7	Synteza P1,P3-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyino)-P3-tiotrifosforanu, ASppspSA	232
5.3.8	Synteza P1,P4-di(5'-adenozyino)-2,3-difluorometyleno tetrafosforanu, AppCF₂ppA	232
5.4	Synteza oligonukleotydów	233
5.4.1	Synteza deoksyrybonukleotydów (ONy) i ich 5'-fosforanów	233
5.4.2	Synteza 5'-fluoro(mono)fosforanów deoksyrybonukleotydów (FPONy)	233
5.4.3	Synteza 5'-fluoro(di)fosforanów deoksyrybonukleotydów (FPPONy)	234
5.5	Przygotowanie oligonukleotydów do pomiarów NMR oraz UV/VIS	234
5.6	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	234
5.6.1	Spektroskopia NMR jąder ¹ H	235
5.6.2	Spektroskopia NMR jąder ¹⁹ F	235
5.6.2.1	Badania tworzenia się dupleksów DNA oraz identyfikacja niekomplementarności	235
5.6.2.2	G-kwadrupeksy i oddziaływanie z trombiną	235
5.6.2.3	Struktury <i>i</i> -motyw i oddziaływania z ligandami	236
5.6.2.4	Trifluorometylowane sondy molekularne – badania enzymatyczne	236
5.6.3	Spektroskopia NMR jąder ³¹ P	237
5.7	Pomiary UV/VIS struktur drugorzędowych oligonukleotydów	237
5.8	Wyznaczenie temperatur mięknienia oraz pH przejścia oligonukleotydów	238
5.9	Wysokoprzepustowa metoda przesiewowa (HTS) oraz badania HPLC	238
5.9.1	Bufory	238
5.9.2	Biblioteki związków BZ-1 oraz BZ-2	238
5.9.3	Przygotowanie sond fluorowych oraz sondy fluorogenicznej	239
5.9.4	Wyznaczenie parametru Z'	239
5.9.5	Wysokoprzepustowe badanie przesiewowe	240
5.9.6	Wyznaczenie parametrów IC ₅₀	241

5.9.7	Badania HPLC	241
5.10	Plazmidy oraz transformacja bakterii	241
5.10.1	Plazmidy wykorzystane do otrzymania białek hFhit oraz AtFhit	241
5.10.2	Sekwencjonowanie plazmidów	242
5.10.3	Transformacja plazmidów do bakterii RIL BL21(DE3)	242
5.11	Ekspresja i oczyszczanie białek	242
5.11.1	Ludzki Fhit - hFhit	242
5.11.2	Roślinny Fhit – AtFhit	244
5.11.3	Ludzki DcpS - hDcpS	245
5.11.4	Ludzki cNIIIB - hcNIIIB	245
6.	LITERATURA	246
7.	ZAŁĄCZNIKI – TABELA	257

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Fluorofosforanowe analogi (oligo)nukleotydów jako narzędzia do badań procesów biologicznych

Sondy molekularne są cennymi narzędziami badawczymi wykorzystywanymi w badaniach biofizycznych i biochemicznych. Sondy te pozwalają badaczom na zrozumienie funkcjonowania procesów przebiegających w komórkach takich jak przekształcenia enzymatyczne, oddziaływania międzycząsteczkowe czy zmiany strukturalne w obrębie bardziej złożonych molekuł jak na przykład białka oraz kwasy nukleinowe.

Celem niniejszego projektu doktorskiego było stworzenie nukleotydowych i oligonukleotydowych narzędzi molekularnych do badania procesów biologicznych związanych ze zmianami strukturalnymi oligonukleotydów oraz funkcjonowaniem enzymów. Wybraną modyfikacją chemiczną był atom fluoru, który wprowadzono w obręb struktury (oligo)nukleotydów w postaci ugrupowania fluorofosforanowego. Fluor nie występuje w naturalnych związkach organicznych, jednak jego obecność znacząco zmienia właściwości fizykochemiczne molekuł, dlatego niemal 20% wszystkich terapeutyków posiada w swojej strukturze ten atom. Co więcej, fluor jest jądrem wykazującym zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego, a związki znakowane fluorem znajdują zastosowanie jako sondy molekularne w monitorowaniu procesów biologicznych metodą ^{19}F NMR.

W ramach realizacji projektu doktorskiego opracowałem metodę syntezy chemicznej nukleotydów oraz oligonukleotydów znakowanych fluorofosforanem w pozycji 5' rybozy. Następnie badałem możliwość wykorzystania tego typu związków w badaniach biofizycznych i biochemicznych, m.in. do monitorowania aktywności enzymatycznej białek, poszukiwania inhibitorów enzymów oraz śledzenia zmian konformacyjnych DNA i oddziaływań kwasów nukleinowych z białkami i małymi ligandami. Otrzymałem szereg fluorowanych oligonukleotydów, które różniły się między sobą długością (od 6 do 24 nukleotydów) oraz rodzajem zasad azotowych. Dużą uwagę poświęciłem ich zastosowaniom jako sond molekularnych w badaniach ^{19}F NMR. Zmiany przesunięć chemicznych sygnałów na widmach NMR umożliwiły monitorowanie takich procesów biologicznych jak tworzenie dupleksów, G-kwadrupeksów oraz struktur *i*-motywów DNA. Ponadto okazało się, że modyfikowane fluorofosforanem oligonukleotydy umożliwiają rozróżnianie niekomplementarności nukleotydowych w dupleksach DNA oraz umożliwiają obserwację oddziaływań pomiędzy kwasami nukleinowymi a białkiem czy małocząsteczkowym ligandem. Wykazałem także użyteczność zaprojektowanych sond do badań zmian konformacyjnych oligonukleotydów zależnych od pH czy temperatury.

Dodatkowym celem projektu doktorskiego było wykorzystanie małocząsteczkowych fluorofosforanowych analogów nukleotydów do badania specyficzności substratowej i poszukiwania inhibitorów pirofosfataz, DcpS oraz Fhit. Fluorofosforanowe analogi nukleotydów okazały się substratami dla wyżej wymienionych enzymów, przy czym jednym z produktów reakcji hydrolizy były jony fluorkowe. Odkrycie to umożliwiło opracowanie wysokoprzepustowej metody przesiewowej (HTS) opartej o detekcję fluorków. Opracowaną metodą HTS przeszukałem bibliotekę 141 związków pochodzenia nukleotydowego, wyselekcjonowałem najlepsze inhibitory oraz wyznaczyłem dla nich wartości parametru IC_{50} .

Abstract of dissertation

Fluorophosphate labeled (oligo)nucleotides as tools for studying biological processes

Molecular probes are valuable research tools used in biophysical studies. These probes allow researchers to understand how cellular processes work, from enzymatic transformations to intermolecular interactions, and to study structural changes in more complex structures such as proteins and nucleic acids.

The aim of the PhD project was to produce nucleotide and oligonucleotide biophysical tools to study biological processes related to structural changes of oligonucleotides and enzyme functions. The chosen chemical modification was a fluorine atom, which was introduced within the (oligo)nucleotide structure as the fluorophosphate moiety. Fluorine is not found in natural organic compounds, but its presence significantly alters the physicochemical properties of synthesized molecules, so nearly 20% of all therapeutics possess this atom in their structure. Moreover, fluorine is active in nuclear magnetic resonance spectroscopy, hence fluorine-labeled compounds are used as molecular probes in ^{19}F NMR monitoring of biological processes.

In this PhD project the chemical synthesis of nucleotides and oligonucleotides labeled with fluorophosphate at the 5' ribose position was developed. A number of fluorinated oligonucleotides, which differed in the length of the polymer chain (from 6 to 24) and the type of nucleobases were obtained. Much attention has been devoted to their applications as molecular probes in the ^{19}F NMR. Signal changes on NMR spectra allowed to monitor such biological processes as formation of duplexes, G-quadruplexes and *i*-motif structures of DNA. Moreover, nucleotide single mismatches in DNA duplexes were distinguished and interactions between nucleic acids and protein or small-molecule ligand were monitored. The utility of the designed probes to study structural changes of oligonucleotides as a function of variations in acid-base conditions or temperature was also demonstrated.

The PhD project also consists of a section devoted to the search for inhibitors of DcpS and Fhit proteins. Fluorophosphate analogs of nucleotides turned out to be substrates for the both enzymes, where fluoride ions were one of the products. This discovery enabled the development of a high-throughput screening (HTS) method based on fluorescence detection of fluorides. Using the developed HTS assay, a library of 141 nucleotide-derived compounds was searched, the best inhibitors were selected and their IC_{50} parameters were determined.

Wykaz skrótów

AtFhit – roślinne białko Fhit (At – łac. *Arabidopsis thaliana*)

cNIIIB – ludzka cytoplazmatyczna nukleotydaza cNIIIB,

D – diastereoizomer

DcpS – enzym hydrolizujący strukturę 5'-końca RNA tzw. kap (ang. *Decapping Scavenger*)

DEAE Sephadex – polisacharyd zawierający kowalencyjnie przyłączony 2-(*N,N*-dietyloamino)etyl, służący jako anionit (ang. *diethylaminoethyl Sephadex*)

DMF – *N,N*-dimetyloformamid (ang. *dimethylformamide*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethylsulfoxide*)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (wersenowy) (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

Fhit – białko Fhit (ang. *Fragile Histidine Triad Protein*)

hFhit – ludzkie białko Fhit (h – ang. *human*)

HIT – rodzina białek triady histydynowej (ang. *Histidine Triad Protein*)

HTS – eksperyment wysokoprzepustowy (ang. *High Throughput Screening*)

Me – grupa metylowa ($-\text{CH}_3$)

OD – jednostka ilości substancji absorbującej promieniowanie UV-Vis, proporcjonalna do iloczynu liczby moli i współczynnika ekstynkcji przy danej długości fali (w przypadku nukleotydów typowo 260 nm)

MS (HR-MS) – (wysokorozdzielcza) spektrometria mas (ang. *(high-resolution) mass spectrometry*)

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*)

NTP, NDP, NMP – tri-, di- lub monofosforan nukleozydu ($\text{N} = \text{A}, \text{C}, \text{G}, \text{U}, \text{m}^7\text{G}$ etc.)

NTPF, NDPF, NMPF – tri-, di- lub fluoromonofosforan nukleozydu ($\text{N} = \text{A}, \text{C}, \text{G}, \text{U}, \text{m}^7\text{G}$ etc.)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

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

TEAB – wodny roztwór wodorowęglanu trietyloamoniowego stosowany jako bufor w chromatografii jonowymiennej (ang. *triethylammonium bicarbonate*)

UV-Vis – spektroskopia w zakresie nadfioletu i światła widzialnego (ang. *ultraviolet-visible spectroscopy*)

v/v – stosunek objętościowy (obj./obj.) (ang. *volume/volume*)

Symbole stosowane w zapisie struktury nukleotydów

A, G, U, C, T – zasady azotowe: adenina, guanina, uracyl, cytozyna, tymina

Ade, Gua – nukleozydy adenozyne i guanozyne

bn⁷GMP - *N*⁷-benzyloguanozyna lub 7-benzyloguanozyna

m⁷G – *N*⁷-metyloguanozyna lub 7-metyloguanozyna

p lub P – reszta fosforanowa(V)

pNHp – grupa imidodifosforanowa

pCH₂p – grupa metylenobisfosfonianowa

p_S – reszta tiofosforanowa

p_S – reszta tiofosfoestrowa

p_{BH₃} – reszta boranofosforanowa

FP lub Fp – reszta fluoro(mono)fosforanowa

FPP lub Fpp – reszta fluoro(di)fosforanowa

p-Im – *P*-imidazolid

FP-Im – *P*-imidazolid fluorofosforanu

Nieujęte powyżej skróty wyjaśniono w tekście.

Zapis dinukleotydów

W opisie dinukleotydów stosowano nazwy skrócone np. ApppA, co oznacza, że dwie adenozyne są ze sobą połączone mostkiem 5'-5' trifosforanowym.

Zapis oligonukleotydów

Sekwencję oligonukleotydów zapisywano zgodnie z przyjętą konwencją rozpoczynając od końca 5' w kierunku końca 3'. Na przykład zapis AGACATTGAC oznacza sekwencję z adeniną na końcu 5' oraz cytozyną na końcu 3'. Dla uproszczenia zapisu nie zaznaczano obecności wiązania 5'-3'fosfodiesterowego łączącego poszczególne nukleozydy.

Wprowadzenie

Nukleotydy są cząsteczkami znajdującymi się w komórkach wszystkich organizmów żywych. Ich rola zaczyna się już w jądrze komórkowym, gdzie tworząc długie oligomery stanowią niezbędną do funkcjonowania informację genetyczną (DNA i RNA). Mniejsze cząsteczki takie jak mono- i dinukleotydy dostarczają komórkom energii, biorą udział w przekazywaniu wewnątrzkomórkowych sygnałów i są kofaktorami enzymów. Mnogość funkcji jakie pełnią nukleotydy przekłada się na mnogość zastosowań chemicznie modyfikowanych nukleotydów. Modyfikacje chemiczne mają na celu nadanie nukleotydом nowych właściwości biologicznych czy biofizycznych. Do tych drugich zalicza się znaczniki fluorescencyjne, izotopowe czy spinowe, dzięki którym nukleotydy wykorzystuje się jako narzędzia badawcze (tzw. sondy lub próbniki molekularne) do śledzenia i poznawania procesów związanych z funkcjonowaniem komórek. Modyfikowane analogi nukleotydów są także wykorzystywane w opracowywaniu metod wysokoprzepustowych w celu identyfikacji inhibitorów badanych enzymów. Moje zainteresowania badawcze realizowane w ramach niniejszej rozprawy skupiły się wokół nukleotydów i oligonukleotydów znakowanych atomem fluoru w obrębie reszt fosforanowych. Fluor zastępując jeden z atomów tlenu w grupie fosforanowej tworzy ugrupowanie 5'-fluorofosforanowe (FP). Realizację badań związanych z fluorofosforanowymi analogami nukleotydów rozpocząłem już na etapie studiów licencjackich i rozwijałem w ramach studiów magisterskich, kiedy to opracowałem wydajne metody syntezy wybranych mononukleotydów znakowanych grupą 5'-fluorofosforanową. Związki tego typu są łatwo dostępne syntetycznie, a przeprowadzone w tamtym czasie wstępne badania biofizyczne zaprezentowały ich praktyczne zastosowanie jako cząsteczek reporterowych w badaniach ^{19}F NMR, umożliwiającym monitorowanie postępu reakcji enzymatycznych. Te badania skłoniły mnie do szerszej eksploracji fluorofosforanowych analogów nukleotydów jako sond molekularnych i stały się punktem wyjścia do badań opisanych w niniejszej rozprawie.

Głównym celem badań w ramach niniejszej rozprawy było wykorzystanie wszechstronnych możliwości zastosowania fluorofosforanowych analogów nukleotydów oraz oligonukleotydów jako narzędzi badawczych (tzw. sond molekularnych) do badań procesów biologicznych. Otrzymane związki scharakteryzowałem pod kątem właściwości biologicznych jako substraty dla enzymów hydrolizujących nukleotydy oraz jako narzędzia do monitorowania procesów

biologicznych. W rezultacie znalazłem dwa główne obszary zastosowań dla fluorofosforanowych analogów nukleotydów i oligonukleotydów, i są to:

- ⇒ monitorowanie procesów enzymatycznych i identyfikacja inhibitorów,
- ⇒ monitorowanie zmian konformacyjnych i oddziaływań kwasów nukleinowych z białkami i ligandami.

Dla zachowania przejrzystości pracy, wyniki badań własnych przedstawiłem w postaci dwóch odrębnych części.

Część pierwsza niniejszej rozprawy dotyczy opracowania wysokoprzepustowej metody przesiewowej (HTS) do poszukiwania inhibitorów białek z rodziny triady histydynowej (HIT). Pomysł na opracowanie nowej metody HTS powstał dzięki wstępnym eksperymentom, które wykonałem w ramach pracy magisterskiej. Eksperymenty enzymatyczne monitorowane metodą ^{19}F NMR wykazały, że niektóre enzymy hydrolizują 5'-fluorofosforanowe analogi nukleotydów z uwolnieniem jonów fluorkowych. Ponieważ jony fluorkowe można wykryć wieloma innymi metodami, w ramach niniejszej rozprawy poszukiwałem czulszej metody detekcji jonów fluorkowych, która umożliwiłaby określenie postępu reakcji enzymatycznej w szybki i prosty sposób. W tym celu wykorzystałem selektywną sondę fluorogeniczną, która w obecności fluorków zmienia swoje właściwości spektroskopowe. W ramach tej części badań podjąłem się realizacji następujących celów badawczych:

- Wykorzystując enzym modelowy, fosfodiesterazę z jadu węża PDE-I, opracowałem warunki eksperymentu wysokoprzepustowego, a w tym: określiłem optymalne stężenie fluorowanego substratu i sondy fluorogenicznej, zoptymalizowałem czasy reakcji enzymatycznej z sondą fluorogeniczną i określiłem wpływ składników buforu na selektywność sondy fluorogenicznej,
- Eksperyment wysokoprzepustowy zaadaptowałem dla ludzkiego enzymu dekapującego (hDcpS), ludzkiego supresora nowotworowego (hFhit) oraz roślinnego enzymu Fhit (AtFhit),
- Skompletowałem bibliotekę 141 cząsteczek pochodzenia głównie nukleotydowego,
- Wykonałem badania wysokoprzepustowe dla wyżej wymienionych białek, identyfikując ich najsilniejsze inhibitory,
- Dla wyselekcjonowanych inhibitorów wyznaczyłem parametry IC_{50} ,

Głównym obiektem mojego zainteresowania był ludzki enzym Fh1t, który w literaturze jest opisywany jako supresor nowotworowy, jednak mechanizm jego działania nie został dokładnie poznany. Niektóre prace wskazują również, że enzym ten wspólnie z DcpS, pełni rolę enzymu degradującego koniec 5' mRNA. Profilowanie specyficzności substratowej oraz zidentyfikowanie silnych inhibitorów nukleotydowych, może rzucić nowe spojrzenie na rolę Fh1t w komórkach. Ponadto, na podstawie wyników badań przesiewowych zaplanowałem i wykonałem syntezę nowych analogów diadeninowych jako potencjalnych inhibitorów tego białka. Otrzymane związki scharakteryzowałem metodami biofizycznymi, w tym opracowaną metodą HTS.

W części drugiej rozprawy doktorskiej opisałem syntezę chemiczną 5'-fluorofosforanowych oligodeoksyrybonukleotydów o różnej długości i różnej sekwencji zasad azotowych. Następnie dużą uwagę poświęciłem zastosowaniom otrzymanych związków w badaniach ^{19}F NMR, w których fluorowane oligonukleotydy wykorzystałem do:

- Monitorowania tworzenia się dupleksów DNA i rozpoznawania pojedynczych niekomplementarności nukleotydowych,
- Monitorowania obecności struktur drugorzędowych oligonukleotydów takich jak G-kwadrupleksy oraz *i*-motywy pod wpływem zmian temperatury oraz pH,
- Monitorowania oddziaływania G-kwadrupleksów z białkiem,
- Monitorowania oddziaływania małowymiarowych ligandów ze strukturami *i*-motywów.

Doświadczenie zdobyte podczas badania nukleotydowych i oligonukleotydowych pochodnych fluorofosforanu wykorzystałem do zanalizowania innej klasy związków zawierających fluor, a mianowicie nukleotydów purynowych modyfikowanych grupą trifluorometylową (CF_3). Związki te scharakteryzowałem jako sondy ^{19}F NMR pod kątem możliwości monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznych oraz identyfikacji inhibitorów badanych enzymów.

Rozprawa została podzielona na kilka części i są to przegląd literaturowy (r. 1), badania własne rozdzielone na dwa odrębne rozdziały (r. 2 oraz r. 3), podsumowanie badań własnych (r. 4) oraz część eksperymentalną (r. 5). W pierwszych podrozdziałach części literaturowej przedstawiłem podstawowe informacje na temat konsekwencji, jakie niesie za sobą wprowadzenie atomu fluoru do cząsteczki. Zwróciłem uwagę nie tylko na ogólnie pojęte fluorowane związki biologicznie czynne, ale przede wszystkim na nukleozydy, nukleotydy oraz

kwasy nukleinowe. Efekty terapeutyczne fluorowanych cząsteczek są związane ze zmianą ich właściwości biologicznych takich jak zmiana powinowactwa do białek czy zwiększona odporność na degradację enzymatyczną w komórkach. Ponadto, fluor nadaje cząsteczkom nowe właściwości spektroskopowe dzięki czemu mogą one zostać wykorzystane jako sondy molekularne do monitorowania różnych procesów biologicznych metodą ^{19}F NMR. W podrozdziale 1.2.4 przedstawiłem metody syntezy fluorowanych oligonukleotydów, zarówno DNA jak i RNA, oraz zaprezentowałem ich liczne zastosowania z użyciem fluorowego rezonansu magnetycznego. Tematem badań niniejszej rozprawy były także enzymy hydrolizujące wiązanie fosfor-fluor, których krótka charakterystyka znajduje się w podrozdziale 1.6. Dysfunkcje tych białek często są powiązane z występowaniem zaburzeń chorobowych, dlatego opracowywanie wydajnych metod badawczych identyfikujących związki hamujące nadaktywność tych enzymów jest takie istotne. Na początku każdego z rozdziałów opisujących badania własne w pierwszej kolejności przedstawiłem biologiczne obiekty badawcze oraz cele badań. W rozdziale 4 podsumowałem najważniejsze, moim zdaniem, wyniki badań. Na końcu rozprawy umieściłem spis literatury (r. 6). Do pracy dołączyłem także trzy tabele (r. 7), w których zebrałem wartości inhibicji uzyskane w ramach eksperymentów wysokoprzepustowych oraz profile spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości nowych analogów diadeninowych.

Publikacje, zgłoszenia patentowe oraz prezentacje wyników powstałe w trakcie wykonywania niniejszej pracy:

Badania w kierunku opracowania metod syntezy oraz badania właściwości fluorofosforanowych analogów (oligo)nukleotydów stały się tematem 3 prac opublikowanych w czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej (dwie prace powstały w trakcie realizacji projektu doktorskiego, jedna praca została opublikowana wcześniej) oraz jednego patentu przyznanego na terenie RP. Przeprowadzone przeze mnie badania dotyczące trifluorometylowanych analogów nukleotydów purynowych stały się częścią kolejnej publikacji. Praca zawierająca wyniki badań wysokoprzepustowych białka Fhit jest obecnie w przygotowaniu. Wyniki badań prezentowałem w postaci plakatów oraz wystąpień ustnych na konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym.

Publikacje bezpośrednio związane z tematem rozprawy:

- 1) *"5'-fluoro(di)phosphate-labeled oligonucleotides are versatile molecular probes for studying nucleic acid secondary structure and interactions by ^{19}F NMR"* Marek R. Baranowski, Marcin Warmiński, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; *Nucleic Acids Research* **2020**, 48 (15): 8209-8224, praca została wyróżniona przez edytorów NAR i uzyskała status "NAR Breakthrough Article";
- 2) *"Synthesis of trifluoromethylated purine ribonucleotides and their evaluation as ^{19}F NMR probes"*; Mikołaj Chromiński, Marek R. Baranowski, Sebastian Chmieliński, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity; *The Journal of Organic Chemistry* **2020**, 85 (5), 3440-3453.
- 3) *"A fluorescent HTS assay for phosphohydrolases based on nucleoside 5'-fluorophosphates: its application in screening for inhibitors of mRNA decapping scavenger and PDE-I"*; Marek R. Baranowski,[§] Anna Nowicka,[§] Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, 14: 4595-4604;
- 4) *"Synthesis of fluorophosphate nucleotide analogues and their characterization as tools for ^{19}F NMR studies"*; Marek R. Baranowski, Anna Nowicka, Anna M. Rydzik, Marcin Warmiński, Renata Kasprzyk, Błażej A. Wojtczak, Jacek Wójcik, Timothy D. W. Claridge, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity; *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, 80 (8), 3982-3997; (opublikowana przed rozpoczęciem studiów doktoranckich)

- 5) "Revisiting the mRNA cap-metabolism reveals the major role of DcpS and cNIIIB, and backup role of Fhit in degradation of 7-methylguanine mono- and dinucleotide derivatives" – praca w przygotowaniu

Publikacje niezwiązane bezpośrednio z tematem rozprawy:

- 6) "Fluorinated PAPS analogs for continuous sulfotransferase activity monitoring and inhibitor screening by ^{19}F NMR spectroscopy"; Agnieszka Młynarska-Cieslak, Mikołaj Chrominski, Tomasz Spiewła, Marek R. Baranowski, Marcelina Bednarczyk, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; praca zaakceptowana do publikacji w *ACS Chemical Biology*
- 7) "Novel N7-arylmethyl substituted dinucleotide mRNA 5' cap analogs – synthesis and evaluation as modulators of translation"; Radosław Wójcik,[§] Marek R. Baranowski,[§] Łukasz Markiewicz, Dorota Kubacka, Marcelina Bednarczyk, Natalia Baran, Anna Wojtczak, Paweł J. Sikorski, Joanna Zuberek, Joanna Kowalska and Jacek Jemielity; *Pharmaceutics* **2021**, 13, 1941
- 8) „Substrate Specificity of SARS-CoV-2 Nsp10-Nsp16 Methyltransferase”; Benoni, R.; Krafčíková, P.; Baranowski, M. R.; Kowalska, J.; Boura, E.; Cahová, H; *Viruses* **2021**, 13, 1722;
- 9) "Purine and pyrimidine dinucleoside polyphosphates differentially affect the phenylpropanoid pathway in *Vitis vinifera* L. cv. Monastrell suspension cultured cells"; Małgorzata Piertowska-Borek, Anna Wojdyła-Mamoń, Jędrzej Dobrogojski, Agnieszka Młynarska-Cieślak, Marek R. Baranowski, Jakub M. Dąbrowski, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, Sławomir Borek, Maria Angeles Pedreño, Andrzej Guranowski; *Plant Physiology and Biochemistry* **2020**, 147, 125-132;
- 10) "7-Methylguanosine monophosphate analogues with 5'-(1,2,3-triazoyl) moiety: Synthesis and evaluation as the inhibitors of cNIIIB nucleotidase"; Mateusz Kozarski, Dorota Kubacka, Błażej Wojtczak, Renata Kasprzyk, Marek R. Baranowski, Joanna Kowalska; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, 16: 191-199;
- 11) "mRNA cap analogues substituted in the tetraphosphate chain with CX₂: identification of O-to-CCl₂ as the first bridging modification that confers resistance to decapping without impairing translation"; Anna M. Rydzik, Marcin Warminski, Paweł J. Sikorski, Marek R.

Baranowski, Sylwia Walczak, Joanna Kowalska, Joanna Zuberek, Maciej Lukaszewicz, Elzbieta Nowak, Timothy D. W. Claridge, Edward Darzynkiewicz, Marcin Nowotny, Jacek Jemielity; *Nucleic Acids Research* **2017**, 45 (15): 8661-8675.

Komunikaty ustne prezentowane osobiście podczas konferencji naukowych:

- 1) „*Synthesis and ^{19}F NMR applications of 5'-fluoro(di)phosphate oligonucleotides*”; 19th European Symposium on Fluorine Chemistry; 25-31 sierpnia 2019, Warszawa, Polska.
- 2) „*Synthesis of oligonucleotides modified with fluorophosphate moiety and their application in monitoring of oligonucleotide folding and interactions by ^{19}F NMR*”; 15-ty Międzynarodowy Kongres Młodych Chemików “YoungChem2017”, 11-15 października 2017, Lublin, Polska.
- 3) „*Fluorofosforanowe analogi nukleotydów jako sondy molekularne do badania właściwości supresorowego białka Fhit (fragile histidine triad protein)*”; 61. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego (PTChem), 17-21 września, 2018, Kraków, Polska.

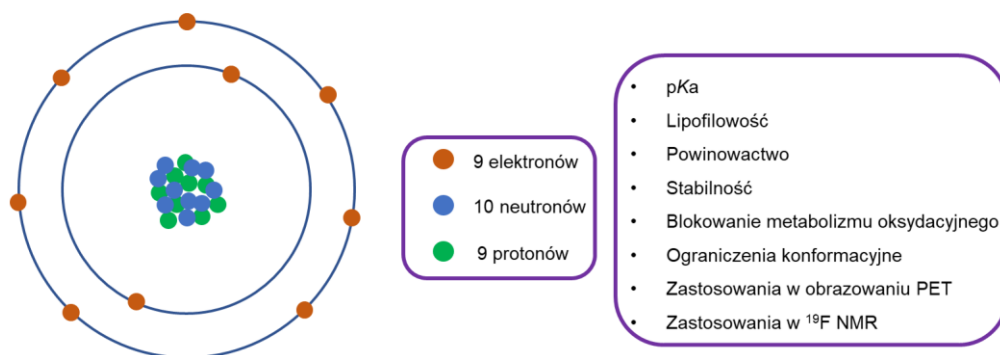
Zgłoszenia patentowe i przyznane patenty:

- 1) Współautorstwo zgłoszenia patentowego w trybie PCT nr PCT/IB2017/05044 „*5'-tiofosforanowe analogi końca 5' mRNA (kapu), mRNA je zawierające, sposób ich otrzymywania i ich zastosowania*”;
- 2) Współautorstwo przyznanego patentu na terenie RP „*Fluorofosforanowe analogi końca 5' mRNA (kapu), sposób ich otrzymywania i zastosowanie*”, P.417980, 2017-09-19 Warszawa.

1. Przegląd literaturowy

1.1 Atom fluoru w cząsteczkach organicznych

Do dziś zidentyfikowano tylko kilkanaście naturalnych związków organicznych zawierających w swojej strukturze atom fluoru i są to na przykład fluoroaceton, fluoroocetan czy 4-fluorotreonina. Biorąc pod uwagę, że fluor jest jednym z najpowszechniej występujących pierwiastków i najobficiej występującym halogenem na Ziemi, fluoroorganiczne związki występują w przyrodzie bardzo rzadko (1). W przeciwieństwie do tego co oferuje przyroda, przez ostatnie dziesięciolecia syntetyzowano bardzo wiele fluorowanych cząsteczek, które znalazły zastosowanie w chemii medycznej, biochemii oraz biofizyce, a także w chemii polimerów i materiałów, co zostanie przedstawione w kolejnych podrozdziałach.



Rys. 1-1. Uproszczona struktura atomu fluoru (z lewej) oraz właściwości (z prawej), na które ma wpływ atomu fluoru w cząsteczce.

Fluor umiejscowiony jest w układzie okresowym w okresie 2, grupie 17. W skali Paulinga jest on najbardziej elektroujemnym atomem o niewielkim rozmiarze, charakteryzującym się bardzo słabą polaryzowalnością i zdolnością tworzenia stosunkowo silnych wiązań kowalencyjnych – wiązanie C-F jest jednym z najsilniejszych wiązań chemicznych. Wszystkie te cechy przekładają się na zmianę właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych cząsteczek organicznych, w obręb których atom fluoru został wprowadzony. Substytucję fluorem wykorzystuje się we współczesnej chemii medycznej w celu zwiększania stabilności metabolicznej cząsteczki, poprawy biodostępności oraz modulacji oddziaływań pomiędzy fluorowanym związkiem a celem terapeutycznym (białkiem) (Rys. 1-1). Jednym z pierwszych leków zawierających fluor jest 5-fluorouracyl, który został otrzymany i przebadany w roku 1957 (2). Od tamtej pory obserwuje się znaczny wzrost liczby fluorowanych cząsteczek terapeutycznych.

1.1.1 Zmiana właściwości biologicznych

Wprowadzenie fluoru w obręb cząsteczki ma znaczący wpływ na jej właściwości biologiczne. Uzasadniając wprowadzenie atomu fluoru do cząsteczki pod uwagę bierze się jego właściwości fizykochemiczne, które są porównywane z właściwościami atomu wodoru, i są to:

- niewielki rozmiar atomu fluoru (promień *van der Waalsa* wynosi 1.47 Å) porównywalny z atomem wodoru (promień *van der Waalsa* wynosi 1.20 Å),
- wysoka elektroujemność (3.98 w skali Paulinga), z którą wiąże się bardzo silne przyciąganie elektronów (efekt indukcyjny),
- większa stabilność wiązania C-F w porównaniu do wiązania C-H,
- większa lipofilowość fluoru niż wodoru.

Ze względu na stosunkowo niewielki rozmiar, atom fluoru jest powszechnie stosowany jako zamiennik atomu wodoru lub grupy hydroksylowej w cząsteczce, powodując minimalne perturbacje steryczne i nie zaburzając tym samym sposobu wiązania się fluorowanego związku z receptorem (3). Fluor jako atom o najwyższej elektroujemności (Tabela 1.1) ma znaczący wpływ na zmianę gęstości elektronowej w cząsteczce, co tym samym zmienia właściwości kwasowo-zasadowe (wartości pK_a) sąsiadujących z fluorem grup funkcyjnych. Efekt indukcyjny wywołany przez fluor powoduje zwiększenie kwasowości lub zmniejszenie zasadowości związku, co może mieć wpływ na jego stabilność chemiczną lub biodostępność. Reprezentatywne przykłady zostały przedstawione w Tabeli 1.2.

Tabela 1.1. Promień *van der Waalsa* oraz wartości elektroujemności atomów w skali Paulinga(4)

Atom	Promień <i>van der Waalsa</i> (Å)	Elektroujemność
C	1,70	2,55
H	1,20	2,20
F	1,47	3,98
O	1,52	3,44
N	1,55	3,04
Cl	1,75	3,16

Znaczne zmniejszenie zasadowości obserwuje się w przypadku amin n-alkilowych podstawionych fluorem w pozycji β lub γ łańcucha alkilowego, a nawet w przypadku, gdy fluor oddalony jest aż o cztery atomy węgla od grupy aminowej (pozycja δ). Zmniejszenie zasadowości, czy też zwiększenie kwasowości, dobrze zobrazowane zostało na przykładzie kwasu octowego i alkoholu etylowego. Im mniejsza odległość pomiędzy fluorem a grupą jonizowaną oraz im więcej atomów fluoru w cząsteczce (efekt addytywności), tym większa

zmiana wartości pK_a (Tabela 1.2). Zmiany pK_a mogą mieć bezpośredni wpływ na parametry fizykochemiczne projektowanego terapeutyku, włączając w to zmiany w rozpuszczalności, zmiany w powinowactwie związku do celu molekularnego (siła, selektywność) oraz zmiany absorpcji, dystrybucji, metabolizmu oraz wydalanie (ADME) leku.

Tabela 1.2. Wpływ podstawienia fluorem na właściwości kwasowo-zasadowe prostych związków organicznych¹

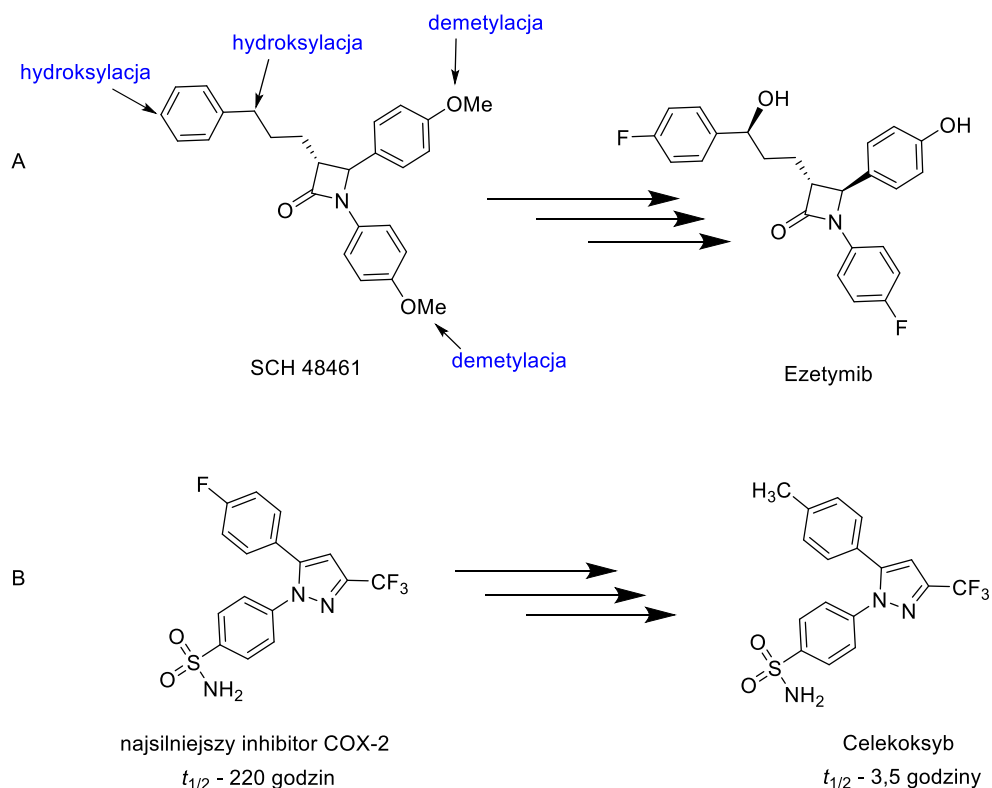
Aminy β -podstawione	pK_a	Kwasy karboksylowe	pK_a
$CH_3CH_2NH_3^+$	10,7	CH_3COOH	4,76
$FCH_2CH_2NH_3^+$	9,2	CH_2FCOOH	2,59
$F_2CHCH_2NH_3^+$	7,3	CHF_2COOH	1,34
$F_3CCH_2NH_3^+$	5,7	CF_3COOH	0,52
Aminy γ -podstawione	pK_a	Alkohole	pK_a
$CH_3CH_2CH_2NH_3^+$	10,7	CH_3CH_2OH	15,9
$FCH_2CH_2CH_2NH_3^+$	9,9	CF_3CH_2OH	12,4
$F_3CCH_2CH_2NH_3^+$	8,7		
Aminy δ -podstawione	pK_a	Aldehydy	pK_a
$CH_3CH_2CH_2CH_2NH_3^+$	10,7	$(CH_3)_3CHO$	19,2
$F_3CCH_2CH_2CH_2NH_3^+$	9,7	$(CF_3)_3CHO$	5,1

Fluor wbudowywany jest także w celu modulacji lipofilowości cząsteczki, dzięki czemu można zwiększyć zdolność przenikania leku przez błony komórkowe. Silne wyciąganie elektronów przez fluor powoduje, że nasycone związki alkilowe zawierające podstawnik mono- i trifluorometylowy, charakteryzują się zmniejszoną lipofilowością (5). Z kolei odwrotną zależność zaobserwowano dla cząsteczek, w których fluor został wprowadzony w bliskim sąsiedztwie układu aromatycznego oraz wiązań typu π . Nakładanie się orbitali 2s atomu fluoru z orbitalami 2p najbliższego atomu węgla powoduje, że wiązanie C-F jest wysoce niespolaryzowane, przyczyniając się tym samym do zwiększenia lipofilowości (5).

Kolejnym aspektem kluczowym dla efektywnego projektowania leków jest powinowactwo cząsteczki do celu terapeutycznego. Atom fluoru może bezpośrednio oddziaływać z białkiem lub wpływać na to oddziaływanie w sposób pośredni, poprzez wpływ na polarność jonizowanych grup funkcyjnych (aminowych, karboksylowych), co zaznaczono powyżej. W interakcjach bezpośrednich niespolaryzowane wiązanie C-F może brać udział w słabych oddziaływaniach wodorowych pomiędzy terapeutyką a białkiem. Większy wkład

¹ *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th ed.; Dean, J. A., New York 1999; *Fluorine in Organic Chemistry*, R. D. Chambers, Blackwell Publishing, Oxford, 2000

w interakcję pomiędzy cząsteczkami ma natomiast oddziaływanie elektrostatyczne, co zostało dobrze zobrazowane na przykładzie inhibitorów trombiny. Badania strukturalne wykazały, że fluor umieszczony w pozycji *para* pierścienia benzyłowego znalazł się w bliskim kontakcie ze spolaryzowanym dodatnio atomem węgla grupy C=O aminokwasu oraz wodoru H-C α , a te oddziaływania dipolarne uznano za kluczowe dla zwiększenia inhibicji (6). Podsumowując, niemal 20% leków oraz kandydatów na cząsteczki terapeutyczne, posiada w swojej strukturze co najmniej jeden atom fluoru (7-10). Poniżej opisano kilka reprezentatywnych fluorowanych terapeutyków.

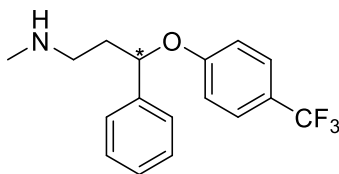


Rys. 1-2. Optymalizacja struktury cząsteczki w celu zmiany jej stabilności metabolicznej na przykładzie A) Ezetymibu oraz B) Celekoksytu. Małymi strzałkami oznaczono miejsca podatne na zmiany metaboliczne.

Jednym z ciekawszych przykładów racjonalnego wprowadzenia fluoru w celu zwiększenia stabilności metabolicznej oraz poprawienia działania związku *in vivo* jest Ezetymib, fluorowany lek o działaniu hipolipemicznym (Rys. 1-2A). Należy on do klasy związków blokujących absorbowanie cholesterolu w jelitach i został zatwierdzony w 2002 roku przez FDA jako terapeutyk w celu leczenia pacjentów z hipercholesterolemią oraz cukrzycą. Strukturą

wyjściową była cząsteczka o roboczej nazwie SCH 48461, która charakteryzowała się silną inhibicją wchłaniania cholesterolu, jednak była szybko metabolizowana w komórkach na trzy różne sposoby: poprzez demetylację, hydroksylację oraz utlenianie, co tym samym prowadziło do utraty jej właściwości biologicznych. Wprowadzenie pojedynczych atomów fluoru w obrębie grup fenylowych rozwiązało powyższe problemy bez negatywnego wpływu na działanie związku *in vivo* (11). Kolejnym przykładem, w którym kluczową rolę odegrał fluor jest opracowanie inhibitora drugiej izoformy cyklooksygenazy (COX-2). COX-2 jest enzymem katalizującym syntezę prostanoidów, które są istotnymi czynnikami zaangażowanymi w przebieg procesu zapalnego wpływając na powstanie bólu czy gorączki. Inhibitory cyklooksygenazy drugiej stosuje się jako leki przeciwzapalne. Opracowany przez Penninga i wsp. silny inhibitor COX-2 ($IC_{50} = 0,041 \mu M$) (12) w badaniach *in vivo* wykazał się nieakceptowalnie długim czasem półtrwania wynoszącym aż 220 godzin. Zaobserwowano, że zastąpienie atomu fluoru w pierścieniu fenylowym podatną na zmiany metaboliczne grupą metylową skraca ten czas do 3,5 godziny. Ponadto grupy trifluoro- i difluorometylowe wprowadzone w pozycję 3 pirazolu miały znaczący wpływ na aktywność oraz selektywność leku. Celekoksyb obecnie stosowany jest jako niesteroidowy lek przeciwbólowy i przeciwzapalny (Rys. 1-2B).

Przykładem leku, w którym fluor spełnił rolę modulatora powinowactwa cząsteczki do celu terapeutycznego jest antydepresant znany pod nazwą Prozac (Rys. 1-3, fluoksetyna). W roku 1987 został on zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków (FDA) i stał się najczęściej przepisywanym lekiem przeciwdepresyjnym na świecie. Jest on także stosowany w leczeniu zaburzeń obsesyjno-kompulsyjnych oraz bulimii. Depresja związana jest z niskim poziomem neuroprzekaźnika 5-hydroksytryptaminy (5-HT), znanego również pod nazwą serotonina. Działanie farmakologiczne fluoksetyny polega na selektywnym hamowaniu wychwytu zwrotnego serotoniny przez blokowanie transportera tego neuroprzekaźnika. Badania nad mechanizmem działania fluoksetyny wykazały, że włączenie grupy trifluorometylowej w pozycji *para* pierścienia fenyłowego zwiększyło około 6-krotnie siłę hamowania wychwytu zwrotnego 5-HT w porównaniu z niefluorowanym związkiem macierzystym (13). Uważa się, że wprowadzenie obszernej sterycznej grupy trifluorometylowej umożliwia przyjęcie przez pierścień fenoksyłowy przestrzennej konformacji sprzyjającej wiązaniu się z transporterem serotoniny (14).



Fluoksetyna

Rys. 1-3. Struktura Fluoksetyny. Gwiazdką oznaczono centrum stereogeniczne.

1.1.2 Zmiana właściwości spektroskopowych

Fluor w literaturze określany jest mianem „znacznika spinowego”. Oznacza to, że wprowadzenie go do cząsteczki chemicznej, białka czy kwasu nukleinowego nadaje badanemu układowi nowe właściwości spektroskopowe, a w tym konkretnym przypadku jest to możliwość zastosowania techniki fluorowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^{19}F NMR). Fluor posiada właściwości, które są korzystne ze względu na technikę ^{19}F NMR i są to (15,16):

- spinowa liczba kwantowa wynosząca $\frac{1}{2}$,
- abundancja naturalnego izotopu ^{19}F wynosząca 100%,
- czułość na poziomie 83%, porównując do najbardziej czułego w technice NMR jądra protonu, ^1H .

W porównaniu do wodoru, fluor otoczony jest przez dziewięć elektronów, co przekłada się na dwie zalety. Po pierwsze, zakres przesunięć chemicznych sygnałów fluorowych (szerokość rejestrowanego widma) jest niemal 100-krotnie szerszy dzięki czemu analiza zarejestrowanego widma jest dużo prostsza. Po drugie, fluor jest dużo czulszy na subtelne zmiany otoczenia chemicznego, co umożliwia obserwację nawet niewielkich zmian konformacyjnych białek (17) i struktur kwasów nukleinowych (18). Powyższe zalety zostały wielokrotnie wykorzystane w badaniach białek, w których atom bądź atomy fluoru zostały wprowadzane w obręb łańcuchów bocznych aminokwasów (19). Ponadto fluor nie występuje naturalnie w białkach i kwasach nukleinowych, dlatego można mieć pewność, że sygnały obserwowane na widmach pochodzą od badanej próbki, a nie są efektem biologicznych zanieczyszczeń, co zostało wykorzystane w badaniach *in vivo* (20).

W powyższych podrozdziałach opisałem szereg korzyści, które niesie za sobą wprowadzenie fluoru do cząsteczki, takich jak zmiana właściwości biologicznych oraz nadanie

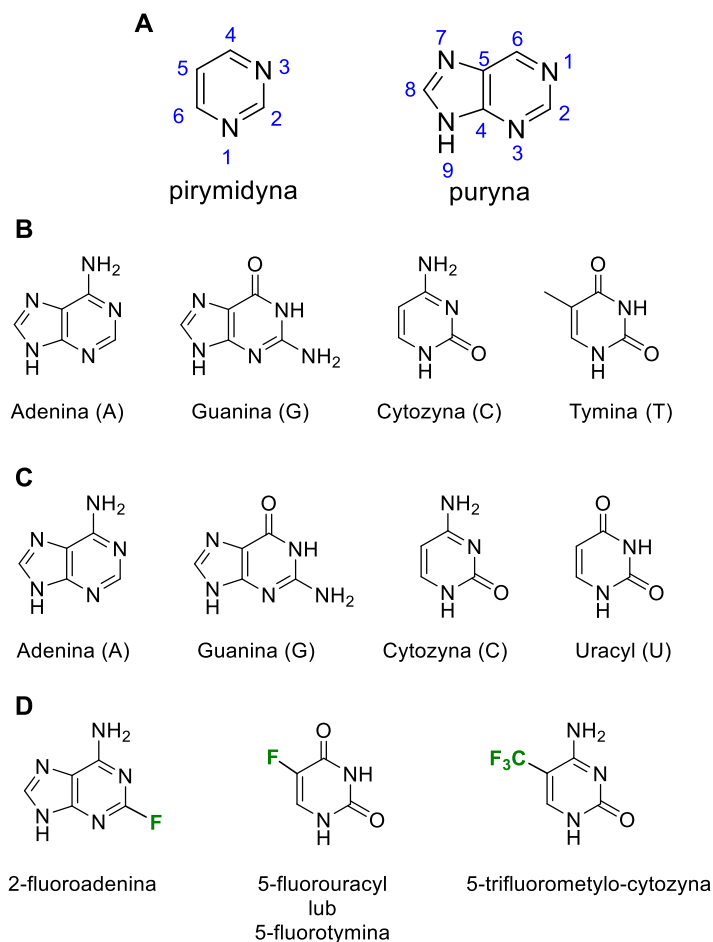
nowych właściwości spektroskopowych. W dalszej części niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawię przykłady zastosowania podstawienia fluorem do modyfikacji nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych. Fluorowane analogi tych związków znalazły liczne zastosowania w terapiach antynowotworowych i antywirusowych, jak również jako narzędzia molekularne (sondy molekularne) umożliwiające precyzyjne badanie oddziaływań lub monitorowanie procesów biologicznych.

1.2 Atom fluoru w nukleozydach, nukleotydach oraz kwasach nukleinowych

1.2.1 Budowa kwasów nukleinowych a możliwe miejsca wprowadzenia fluoru

Kwasy nukleinowe są nośnikami informacji genetycznej wszystkich organizmów żywych. Ze względu na budowę strukturalną wyróżnia się kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) oraz rybonukleinowy (RNA). Zarówno DNA jak i RNA są długimi polimerami składającymi się z pojedynczych nukleotydów (monomerów), a te z kolei zbudowane są z co najmniej jednej grupy fosforanowej (P), pięciowęglowego cukru, rybofuranozy oraz zasad azotowych.

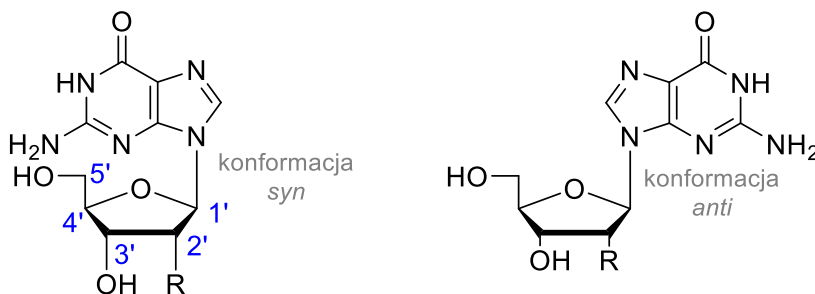
Naturalnie występujące zasady azotowe dzieli się na puryny oraz pirymidyny. Mniejsze z nich, pirymidyny, są aromatycznymi heterocyklicznymi związkami organicznymi, w których w obrębie pojedynczego pierścienia wyróżnia się dwa atomy azotu oraz cztery atomy węgla. Pirymidyny występujące w DNA to tymina (T) oraz cytozyna (C), natomiast w RNA tymina zastąpiona jest uracylem (U). Drugim typem zasad azotowych budujących kwasy nukleinowe są puryny, które w porównaniu do pirymidyn są powiększone o dodatkowy pierścień imidazolu. Istnieje wiele naturalnie występujących puryn, natomiast DNA i RNA zbudowane są z adeniny (A) oraz guaniny (G). Atomy budujące zasady azotowe numeruje się zgodnie z przyjętą konwencją, co zostało zaprezentowane na Rys. 1-4. Atom fluoru lub znacznik fluorowy najczęściej wprowadzany jest w miejsce jednego z atomów wodoru, a tak zbudowana zasada azotowa jest częścią całego kwasu nukleinowego. Substytucja wodoru fluorem nie zaburza lub ma niewielki wpływ na oddziaływania wodorowe pomiędzy parami zasad azotowych stabilizujących strukturę drugorzędową DNA lub RNA. Przykładowymi związkami są pochodne 2-fluoroadeniny, 5-fluorouracylu, 5-trifluorometylocytozyny oraz wiele innych, które zostaną szerzej omówione w rozdziale 1.2.4.1.



Rys. 1-4. A) Ogólna struktura heterocyklicznej pirymidyny oraz puryny wraz z numeracją atomów. B) Struktury zasad azotowych budujących DNA. C) Struktury zasad azotowych budujących RNA. D) Przykładowe fluorowane zasady azotowe budujące kwasy nukleinowe. W nawiasach podano skróty jednoliterowe zasad azotowych stosowane w literaturze.

Drugim elementem budującym nukleotydy jest rybofuranaza (ryboza), która jest pięciowęglowym cyklicznym cukrem prostym, składającym się z czterech endocyklicznych atomów węgla oznaczonych kolejno C1', C2', C3', C4' oraz egzocyklicznej grupy CH₂OH (C5') (Rys. 1-5). Zasady azotowe połączone są z rybozą wiązaniem N-glikozydowym. Wiązanie to utworzone jest pomiędzy atomem azotu pierścienia aromatycznego a anomerycznym atomem węgla C1', który kanonicznie występuje w konfiguracji β (21). W przypadku puryn jest to wiązanie z atomem azotu N9, natomiast pirymidyny łączą się atomem azotu N1. Warto zauważyć, że wiązanie N-glikozydowe jest wiązaniem pojedynczym i przyjmuje różne konformacje, przy czym najpowszechniej występujące są tak zwane rotamery *syn* oraz *anti*

(Rys. 1-5). Rozważając budowę mononukleotydów purynowych oraz pirymidynowych, a w konsekwencji budowę nici DNA i RNA, konformację wiązania N-glikozydowego występującą w znaczącej przewadze jest konformacja *anti* (22,23) (ta forma będzie prezentowana na strukturach w pracy doktorskiej). Związek organiczny składający się z rybozy oraz zasady azotowej nazywa się nukleozidem.

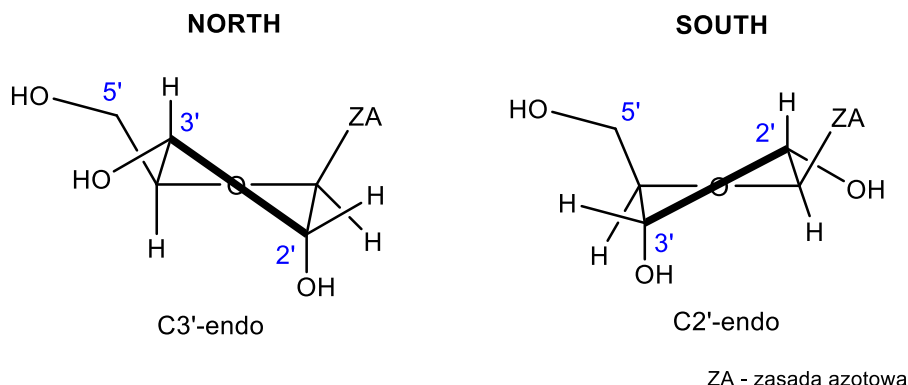


DNA: deoksyryboza, R: H
RNA: ryboza, R: OH

Rys. 1-5. Numeracja atomów węgla pentozy oraz konformacja *syn* oraz *anti* wiązania N-glikozydowego na przykładzie nukleozydu - guanozyny. Wyróżniona została różnica w budowie rybozy występującej w DNA i RNA.

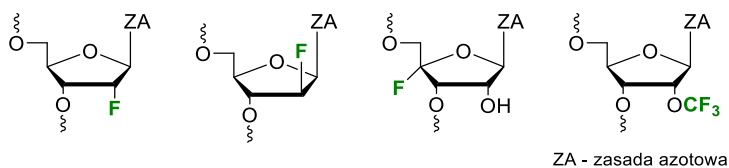
Pierścień rybozy nie jest płaski lecz przyjmuje kilka konformacji, które określa się na podstawie endocyklicznych kątów torsyjnych. Pierścień β -D-rybofuranozy budujący kwasy nukleinowe przyjmuje najczęściej dwa spośród ośmiu możliwych ułożeń przestrzennych, co zostało zobrazowane za pomocą tzw. koła pseudorotacyjnego zaproponowanego w 1972 roku przez Altona i Sundaralingama (24). Ułożenie pierścienia rybozy ściśle powiązane jest z zawadami sterycznymi oraz właściwościami elektrostatycznymi podstawników bezpośrednio związanych z atomami węgla. W kwasach nukleinowych występuje forma południowa (ang. *south*, S) lub północna (ang. *north*, N) rybozy. Formy te są także opisywane na podstawie przestrzennego ułożenia atomów węgla C2' i C3' względem płaszczyzny pierścienia furanozy. Ułożenie C2'-endo, które charakterystyczne jest dla typu S oznacza, że atom węgla C2' położony jest nad pierścieniem cukrowym i symetrycznie atom węgla C3' ułożony jest poniżej. Konsekwentnie, ułożenie C3'-endo, które charakterystyczne jest dla typu N oznacza, że atom węgla C3' położony jest nad pierścieniem cukrowym i symetrycznie atom węgla C2' ułożony jest poniżej (21,25) (Rys. 1-6). Konsekwencją różnych upakowań przestrzennych rybozy jest występowanie różnych typów dupleksów DNA i struktur drugorzędowych RNA (takich jak dupleksy, struktury „spinki do włosów” i inne). DNA może przyjąć trzy główne konformacje i są to formy A, B oraz

Z. Konformacje te różnią się pomiędzy sobą skrętnością podwójnej helisy (prawo- lub lewoskrętna), liczbą zasad azotowych przypadającą na jeden pełny obrót helisy oraz typem upakowania grupy cukrowej. Dla form A-DNA i A-RNA konformacja rybozy to C3'-endo, natomiast dla form B-DNA i Z-DNA jest to ryboza typu C2'-endo (23).



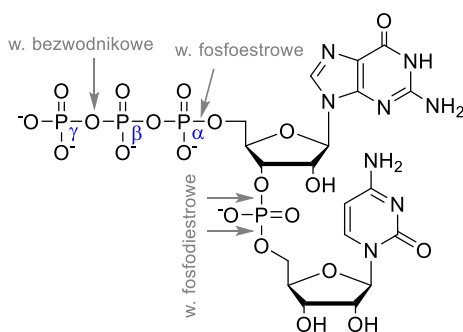
Rys. 1-6. Dwa wybrane konformery β -D-rybozy.

Grupy cukrowe DNA i RNA różnią się pomiędzy sobą atomem tlenu w pozycji C2' rybozy. DNA w pozycji C2' posiada atom wodoru stąd nazwa deoksyrybonukleotydy, natomiast podstawnikiem w tym samym miejscu dla RNA jest grupa hydroksylowa (Rys. 1-5). Różnica w postaci grupy OH ma ogromne znaczenie dla konformacji przyjmowanej przez rybozę. Przestrzenna zawada oraz oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy tlenem w pozycji C3' a grupą hydroksylową w pozycji C2' RNA indukuje preferencję konformacji N rybozy (C3'-endo), natomiast odwrotnie jest dla DNA, gdzie deoksyryboza przyjmuje w przeważającej części konformację S (C2'-endo). Jedną z modyfikacji rybozy jest wprowadzenie w miejsce grupy hydroksylowej w pozycji C2' atomu fluoru. Elektroujemność fluoru wymusza konformację C3'-endo rybozy, a tym samym konformację typową dla A-DNA i A-RNA. Odwrotną konformację przyjmuje analog arabinozy (Rys. 1-7), w którym fluor wymusza konformację C2'-endo pentozy (26,27). W obu przypadkach wprowadzenie atomu fluoru zwiększa stabilność termiczną kwasu nukleinowego oraz zwiększa powinowactwo fluorowanego DNA do RNA, co ma znaczenie terapeutyczne szerzej opisane w rozdziale 1.2.3. Inne przykłady fluorowanej rybozy to modyfikacja grupą trifluorometylową w pozycji 2'-O lub wprowadzenie fluoru w pozycji 4' (więcej w rozdziale 1.2.4.3) (Rys. 1-7).



Rys. 1-7. Przykłady analogów kwasów nukleinowych fluorowanych w obrębie rybozy.
Od lewej: modyfikacja 2'-F-rybozy, 2'-F-arabinozy, 4'-F-rybozy oraz 2'-OCF₃ rybozy.

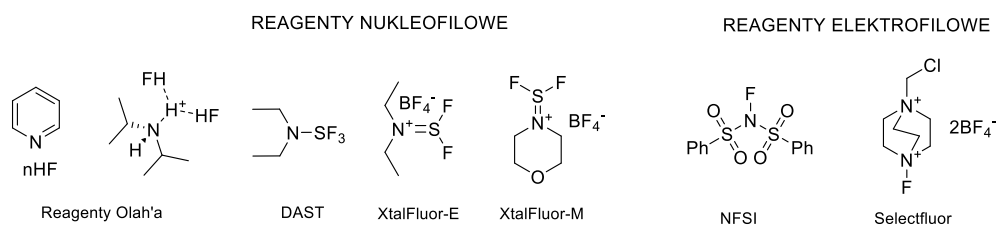
Trzecim i ostatnim elementem budulcowym nukleotydów i kwasów nukleinowych są grupy fosforanowe. W DNA oraz RNA pojedyncze nukleotydy połączone są pomiędzy sobą wiązaniem fosfodiestrowym, które atom węgla C5' jednego nukleozydu łączy z atomem węgla C3' drugiego nukleozydu (Rys. 1-8). Małocząsteczkowe nukleotydy zawierają grupę fosforanową (P) lub łańcuch fosforanowy (jeżeli $P > 1$) związany wiązaniem fosfoestrowym w pozycji C5' (dla uproszczenia stosuje się też zapis 5') rybozy. Fosforany łączą się pomiędzy sobą, tworząc wysokoenergetyczne wiązania bezwodnikowe, co ma kluczowe znaczenie w dostarczeniu energii komórkom (np. ATP). Możliwe jest wprowadzenie fluoru w obręb fosforanu czy fosfodiestru, na co zostanie zwrócona uwaga w dalszej części rozprawy.



Rys. 1-8. Oznaczenie i nazewnictwo łańcucha fosforanowego oraz mostka fosforanowego na przykładzie dinukleotydu 5'pppGC (w. odnosi się do wiązania).

1.2.2 Podejścia syntetyczne w otrzymywaniu fluorowanych nukleozydów

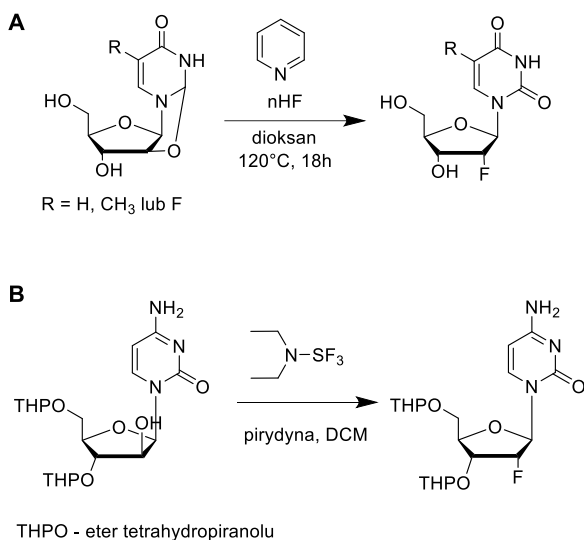
Wiele kuracji chorób wirusowych czy nowotworowych wykorzystuje nukleozydy, nukleotydy czy ich proleki, w obręb których wprowadzono co najmniej jeden atom fluoru. Można wyróżnić dwie główne ścieżki syntezy takich fluorowanych związków: podejście dywergentne, w którym przygotowany najpierw nukleozyd ulega odpowiedniej reakcji fluorowania oraz podejście konwergentne, w którym wykorzystuje się reakcję N-glikozytacji pentozy z zasadą azotową. Pierwsza metoda jest liniowym podejściem syntetycznym, które zapewnia oryginalną konfigurację nukleozydu użytego w reakcji. Metoda druga to kondensacja pochodnej rybozy z różnymi heterocyklicznymi zasadami azotowymi, gdzie pierwsza, druga lub obie podjednostki mogą być wyznakowane fluorem. Wprowadzenie fluoru w obręb cząsteczki jest możliwe dzięki zastosowaniu przeznaczonych do tego reagentów. Wyróżnia się dwie klasy odczynników fluorujących i są to reagenty nukleofilowe, w których atom fluoru występuje jako donor pary elektronowej oraz reagenty elektrofilowe (Rys. 1-9).



Rys. 1-9. Nukleofilowe oraz elektrofilowe reagenty fluorujące.

Jak wspomniano wcześniej jon fluorkowy jest niewielkim anionem, który charakteryzuje się największą gęstością ładunku ujemnego, dlatego jest on raczej akceptorem wiązania wodorowego niż nukleofilem. Jednak w zależności od warunków reakcji fluorki mogą być słabymi (w protycznych rozpuszczalnikach) lub dobrymi nukleofilami (w polarnych aprotycznych rozpuszczalnikach). Dlatego jedną ze standardowych metod przekształcania grupy hydroksylowej (OH) w fluor jest reakcja typu substytucji nukleofilowej (S_N2), w której grupa OH zostaje aktywowana dobrą grupą odchodzącą, taką jak mesylan, tosyłan czy trifluorometanosulfonian (OTf). Dostęp do fluoru zapewniają nukleofilowe reagenty fluorujące takie jak reagenty Olah'a (28,29) czy trifluorek (dietyloamino)siarki (DAST). Na reagenty Olah'a składają się dwa odczynniki, gdzie pierwszy z nich to mieszanina kwasu fluorowego i pirydyny (7:3) ($Py.nHF$), a drugi to mieszanina kwasu fluorowego oraz diizopropylaminy ($iPr_2NH.3HF$) (Rys. 1-9). Reagenty te są użyteczne przy przekształcaniu drugo- i trzeciorzędowych alkoholi

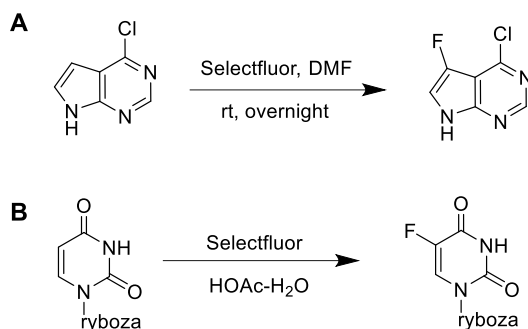
ze wskazaniem selektywności na te ostatnie. Wyższa kwasowość Py.nHF umożliwia otwarcie pierścienia epoksydowego z podstawieniem grupy hydroksylowej fluorem, co zostało wykorzystane w syntezie nukleozydu fluorowanego w pozycji 2' rybozy (30) (Rys. 1-10A). DAST jest najbardziej uniwersalnym nukleofilowym odczynnikiem stosowanym w chemii nukleozydów. Mechanizm fluorowania tym związkiem biegnie typową ścieżką S_N2 zastąpienia grupy hydroksylowej fluorem z inwersją konfiguracji (30) (Rys. 1-10B). Stosunkowo nowymi reagentami fluorującymi są tetrafluoroboran dietyloaminodifluorosulfinowy, XtalFluor-E, oraz tetrafluoroboran morfolinodifluorosulfinowy, XtalFluor-M (Rys. 1-9). Związki te są znacznie łatwiejsze w syntezie i bardziej stabilne niż DAST, a wykorzystuje się je w konwersji alkoholi do fluorków alkilowych oraz konwersji grupy karbonylowej w ketonach i aldehydach do *gem*-difluorków (31).



Rys. 1-10. Schematy reakcji syntezy fluorowanych nukleozydów z wykorzystaniem A) reagenta Olah'a oraz B) reagenta DAST.

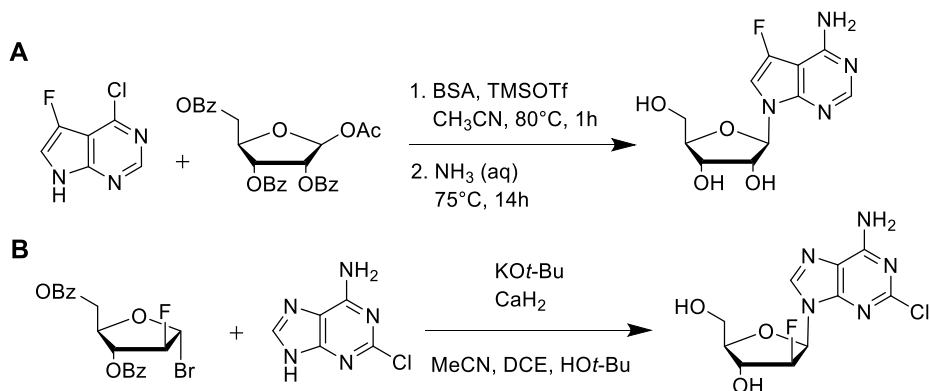
Fluorowanie pierścieni aromatycznych oraz bogatych w elektrony wiązań podwójnych może zostać osiągnięte poprzez zastosowanie elektrofilowych reagentów fluorujących. Fluorek może być „prawdziwym” elektrofilem (F^+), gdy tworzy wiązanie z elektroujemnym atomem azotu, który z kolei jest aktywowany poprzez połączenie z grupą silnie wyciągającą elektrony taką jak grupa sulfonowa lub gdy aktywatorem jest ładunek dodatni znajdujący się na atomie azotu. Kation F^+ jest reaktywny w reakcjach addycji do wiązania podwójnego lub aromatycznej substytucji elektrofilowej (32,33). Przykładami takich reagentów są NFSI oraz

Selectfluor (Rys. 1-9). Selectfluor charakteryzuje się znacznie większą reaktywnością niż NFSI, jest stabilniejszy chemicznie, łatwiejszy do otrzymania oraz rozpuszczalny w większości polarnych rozpuszczalników aprotycznych takich jak acetonitryl czy DMF, które są powszechnie stosowane w chemii kwasów nukleinowych. Selectfluor został wykorzystany w chemii nukleozydów do wprowadzenia atomu fluoru do układów heterocyklicznych na drodze substytucji elektrofilowej (Rys. 1-11).



Rys. 1-11. Wprowadzenie atomu fluoru do układu aromatycznego zasad azotowych za pomocą reagenta Selectfluor. A) Synteza fluorowanej pochodnej puryny(34), B) Synteza 5-fluorouracylu(35).

Podójście konwergentne stosuje się, kiedy fluorowanie związku w późnej fazie syntezy nie jest możliwe lub wymaga skomplikowanych przekształceń. Wtedy wykorzystuje się reakcję N-glikozytacji, która umożliwia połączenie rybozy z zasadą azotową, a fluorowana może być jedna z dwóch wymienionych podjednostek bądź obie jednocześnie. Przykładem takiego podójścia jest synteza 5-fluorotubercydyny (34) oraz klofarabiny (36) (Rys. 1-12).

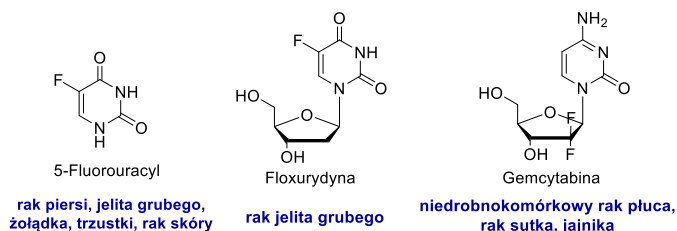


Rys. 1-12. Konwergentne podójście syntezy 5-fluorotybercydyny (A) oraz klofarabiny (B).

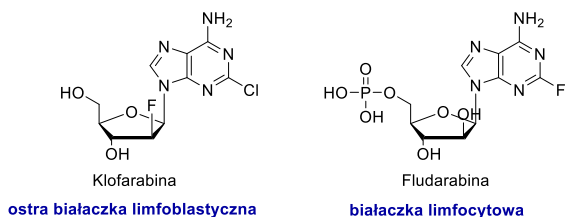
1.2.3 Fluorowane nukleotydy i kwasy nukleinowe jako związki terapeutyczne

Nukleotydy są elementami kwasów nukleinowych DNA i RNA. Polimery te są odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie komórek, biorąc udział w przechowywaniu, replikacji oraz ekspresji materiału genetycznego. Fluorowane analogi nukleotydów znalazły szerokie zastosowanie jako antymetabolity, tj. związki chemiczne zaburzające przebieg wybranego szlaku metabolicznego komórki poprzez wyparcie naturalnego metabolitu. Antymetabolity pochodzenia nukleotydowego zaburzają funkcjonowanie komórek poprzez zahamowanie: szlaków biosyntezy nukleotydów (np. 5-fluorouracyl), procesów replikacji DNA (np. gemcytabina) czy procesów metylacji DNA (np. 5-azacytydyna) (37). Z tego powodu związki te są szeroko stosowane jako leki w terapiach antynowotworowych oraz antywirusowych.

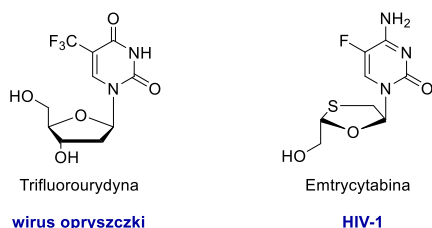
Fluorowane analogi pirymidynowe stosowane jako leki antynowotworowe



Fluorowane analogi purynowe stosowane jako leki antynowotworowe

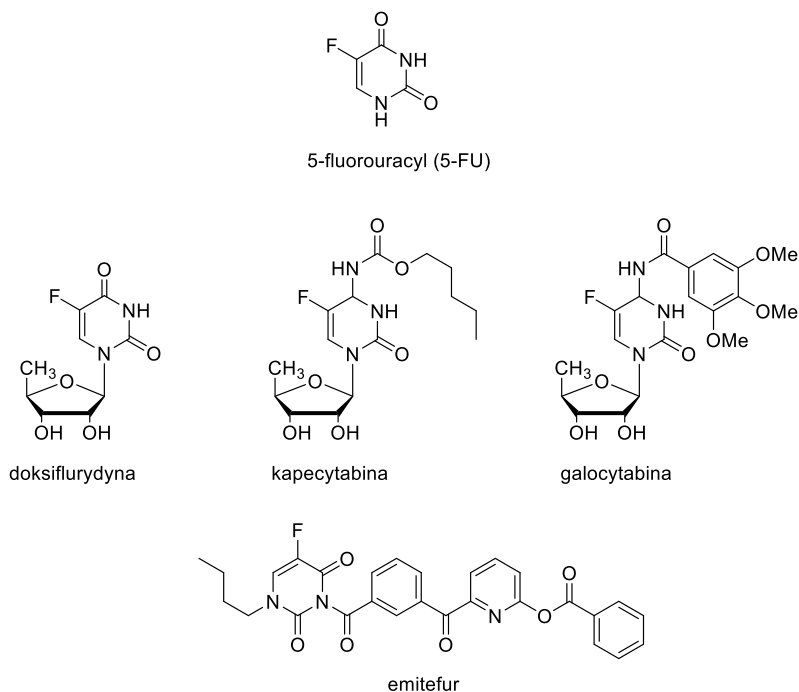


Fluorowane analogi pirymidynowe stosowane jako leki przeciwwirusowe



Rys. 1-13. Przykładowe nukleozydowe leki przeciwnowotworowe i antywirusowe zawierające fluor. Kolorem opisano w jakiej terapii dany lek jest stosowany.

Istnieje co najmniej kilkadziesiąt przykładów fluorowanych pochodnych nukleozydów stosowanych obecnie w terapiach antynowotworowych i antywirusowych. Kilka przykładów przedstawiono na Rys. 1-13. Ze względu na rodzaj zasady, z której został zbudowany analog, związki te można podzielić na pochodne pirymidynowe oraz purynowe. Reprezentatywne przykłady grupy pierwszej to 5-fluorouracyl, floksurydyna oraz gemcytabina, będące lekami przeciwnowotworowymi. Trifluorowana pochodna tymidyny ($\text{CF}_3\text{-T}$) jest lekiem wirusowym przeciw opryszczce. Jej mechanizm działania polega na wbudowaniu $\text{CF}_3\text{-T}$ do nowej nici DNA w trakcie replikacji. Wprowadzona grupa CF_3 blokuje oddziaływania wodorowe pomiędzy nićmi DNA, stąd zahamowany jest kolejny cykl replikacji materiału genetycznego. Emtrycytabina po przekształceniu w komórkach do 5'-trifosforanu emtrycytabiny jest inhibitorem odwrotnej transkryptazy ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV). W grupie należącej do analogów pirymidynowych znajduje się znakowana fluorem w pozycji 2'-arabinorybozydu klofarabina oraz jej analog znakowany na zasadzie azotowej, fludarabina (38).

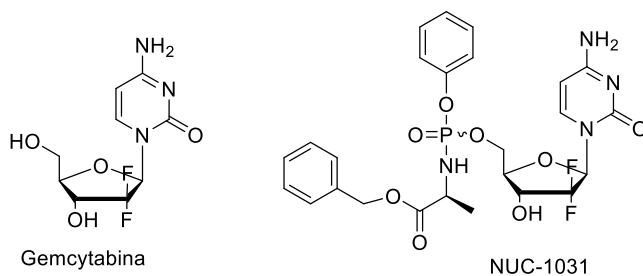


Rys. 1-14. Struktura 5-fluorouracylu oraz jej pochodnych jako proleków.

Najwcześniej opracowanym fluorowanym związkiem przeciwnowotworowym jest wciąż stosowany analog uracylu, tj. 5-fluorouracyl (5-FU). 5-FU został otrzymany przez Heidelbergera

i współpracowników w 1957 roku (2). W komórkach urydyna przekształcana jest do 5'-monofosforanu 2'-deoksyurudyny (dUMP), który następnie poprzez enzym, syntazę tymidylanową (TS), przekształcany jest do 5'-monofosforanu 2'-deoksytymidyny (dTMP) (39). dTMP z kolei jest niezbędny do prawidłowej replikacji DNA (40). Rolą 5-FU jest inhibicja TS, co prowadzi do niskiego poziomu dTMP w komórkach i tym samym do zakłócenia replikacji DNA i do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. 5-FU jest szeroko stosowany w leczeniu nowotworów skóry, piersi, jelita grubego czy żołądka. Niestety, 5-FU nie jest lekiem bez wad, ponieważ przy jego stosowaniu obserwuje się neurotoksyczne i kardiotoxyczne skutki uboczne, które wynikają głównie z braku selektywności fluorouracylu na komórki nowotworowe. Aby ograniczyć niepożądane działania 5-FU zaprojektowano szereg proleków (związków, które po podaniu pacjentowi są przekształcane przez komórki do formy aktywnej - 5-FU) opartych na strukturze fluorouracylu, takich jak doksylflurydyna, kapecytabina, galocytabina czy emitefur (41,42) (Rys. 1-14). Proleki 5-FU charakteryzują się zmianami strukturalnymi w obrębie fluorowanej zasady azotowej. Dzięki wprowadzonym modyfikacjom prolek jest podawany doustnie, a nie tak jak w przypadku aktywnej cząsteczki w postaci wlewu dożylnego lub dotętniczego. Drugą zaletą jest dobre absorbowanie proleku w stanie niezmiennym z układu pokarmowego, a dopiero w wątrobie lub komórkach nowotworowych cząsteczka jest enzymatycznie przekształcana w formę aktywną (5-FU) (43). W 1998 roku kapecytabina została zatwierdzona jako lek stosowany w chemioterapii nowotworów złośliwych, głównie w leczeniu raka jelita grubego. Kolejnym znanym przykładem fluorowanego leku stosowanego w terapii przeciwnowotworowej jest gemcytabina (2'-deoksy-2',2'-difluorocytydyna, dFdC) zatwierdzona w leczeniu raka trzustki, piersi czy jajników (44). Mechanizm działania dFdC nie jest ukierunkowany na inhibicję TS, ponieważ docelowo związek ten przekształcany jest w komórkach do pochodnej 5'-trifosforanowej, która po wbudowaniu do nowo syntetyzowanej nici DNA terminuje namnażanie materiału genetycznego, kierując komórkę na ścieżkę apoptozy. Niestety, zastosowania gemcytabiny są ograniczone na skutek słabego wchłaniania związku przez komórki, mało wydajnego przekształcania w aktywny metabolit przez kinazę deoksycytydynową oraz degradację (deaminację) w warunkach komórkowych. Ciekawym rozwiązaniem powyższych problemów jest przekształcenie gemcytabiny w podjednostkę amidofosforanową, tzw. podejście ProTide, które jest jednym z najbardziej obiecujących w strategii pronukleotydów (45). Polega ono na modyfikacji 5'-monofosforanu gemcytabiny poprzez zamaskowanie ładunków ujemnych

znajdujących się w grupie fosforanowej resztą aryloksylową oraz aminoestrem (Rys. 1-15). Takie rozwiązanie znacząco zwiększa szansę na przeniknięcie cząsteczki przez podwójną błonę lipidową komórek, a na skutek wewnątrzkomórkowego metabolizmu, forma amidofosforanowa przekształcana jest do 5'-monofosforanu dFdC, co ułatwia przekształcenie do 5'-trifosforanu (46), czyli aktywnej formy leku. Związek ten znany jest jako NUC-1031 lub Acelarin i obecnie przechodzi I fazę badań klinicznych (47,48).

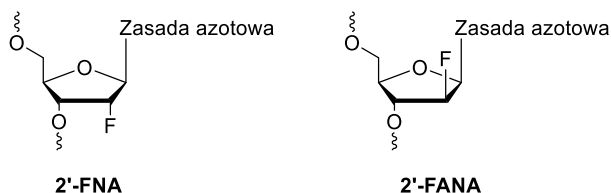


Rys. 1-15. Struktura gemcytabiny oraz jej pronukleotydu (NUC-1031).

Antysensowne oligonukleotydy (AON) są jednoniciowymi cząsteczkami DNA, które wiążą się z komplementarnymi oligomerami RNA, takimi jak mRNA czy miRNA na zasadzie parowania zasad azotowych według modelu Watsona-Cricka. Wytworzenie dupleksu pomiędzy AON a docelowym RNA hamuje funkcję danego RNA lub aktywuje proces jego degradacji katalizowany przez enzym RNAzę-H. Dzięki temu AON wykorzystuje się w hamowaniu, przywracaniu lub modyfikacji poziomu ekspresji białka poprzez kilka różnych mechanizmów (49). AON znalazły zastosowanie m.in. w tzw. terapiach antysensownych w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a (50), choroby Battena (51) czy rdzeniowego zaniku mięśni (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA) (52). Niestety, wadą AON zbudowanych z naturalnych nukleotydów jest ich podatność na degradację ze strony endo- oraz egzonukleaz (53). Zwiększenie czasu półtrwania w komórkach, a przede wszystkim zwiększanie powinowactwa krótkiego oligonukleotydu do RNA osiągnięto poprzez modyfikację mostka fosforanowego łączącego poszczególne nukleotydy oraz modyfikację rybozy. Do reprezentatywnych przykładów należy zamiana grupy fosforanowej na tiofosforanową (54) lub wprowadzenie grupy 2'-O-metylowej (2'-OMe) lub 2'-O-metoksy-etylowej (2'-MOE) (55).

Fluorowane analogi nukleotydów również odegrały na tym polu istotną rolę. Jedną z modyfikacji tzw. drugiej generacji antysensownych oligonukleotydów jest wprowadzenie atomu fluoru w pozycję 2' rybozy (FNA) (56). Ze względu na dużą elektroujemność fluoru,

modyfikacja 2'-F wymusza konformację *N* (C3'-endo) rybozy (27), co z kolei przyczynia się do powstania stabilnej formy dupleksu typu A, który okazał się odporny na działanie RNAzy-H. Badania krystalograficzne wykazały, że fluor w tym wypadku nie jest dobrym mimikiem grupy hydroksylowej, ponieważ zaburza oddziaływanie RNAzy-H z hybrydą FNA:RNA na tyle skutecznie, że uniemożliwia endonukleazie hydrolizę kwasu rybonukleinowego (57). Podsumowując, efektem wprowadzenia atomu fluoru jest znaczące zwiększenie stabilności termicznej dupleksu, a połączenie z modyfikacją tiofosforanową dodatkowo zwiększyło powinowactwo do RNAzy-H oraz odporność na degradację enzymatyczną, a tak modyfikowane oligonukleotydy antysensowne są przedmiotem badań klinicznych (58). Drugim przykładem oligonukleotydu antysensownego jest fluorowany w pozycji 2' arabinozyd (2'-FANA lub FANA). Grupa cukrowa w FANA przyjmuje konformację południową (C2'-endo, S), co zapewnia zwiększone powinowactwo oligonukleotydu do RNA, ale w przeciwieństwie do FNA, utworzona hybryda jest podatna na hydrolizę RNAzą-H (59). Ponadto, kompleks FANA:RNA strukturalnie bardziej zbliżony jest do dupleksu DNA:RNA, którego budowa przestrzenna plasuje się pomiędzy dupleksem typu A i B (60). Jednym z nowszych zastosowań FANA jest ich wykorzystanie w terapii anty HIV-1 (61).



Rys. 1-16. Budowa 2'-F-rybozydu (FNA) oraz 2'-F-arabinozydu (FANA).

Zwiększone powinowactwo deoksyrybonukleotydów zawierających 2'-F-rybozę oraz 2'-F-arabinozę do RNA zostało dokładnie przeanalizowane metodą magnetycznego rezonansu jądrowego i wynika z następujących faktów: a) fluor w pozycji 2' rybozy indukuje silniejsze wiązania wodorowe oraz silniejsze oddziaływania warstwowe pomiędzy zasadami azotowymi tworzącymi się według modelu Watsona-Cricka (62); b) fluor w pozycji 2' wprowadza efekt stabilizacji poprzez dodatkowe wiązania wodorowe typu FC-H...O (63). Wiązania te występują pomiędzy atomem wodoru znajdującym się przy atomie węgla C2' a atomem tlenu O5' i O4' sąsiadującego nukleotydu, c) we fluorowanych kwasach nukleinowych mogą występować dodatkowe bezpośrednie wiązania pseudo-wodorowe (C-H...F-C) (64). Wiązania te występują

między atomem fluoru a atomem wodoru związanym z węglem C8 adeniny w tym samym nukleozydzie.

Podsumowując, wprowadzenie atomu fluoru do nukleotydu lub kwasu nukleinowego wprowadza subtelne zmiany elektronowe i konformacyjne, które przekładają się na zmianę właściwości biologicznych tych cząsteczek, co często znajduje zastosowanie terapeutyczne. Jednak to nie wszystkie zalety fluorowanych oligonukleotydów. Wprowadzenie fluoru nadaje cząsteczce również nowe właściwości spektroskopowe, umożliwiające m.in. zastosowanie fluorowanych kwasów nukleinowych jako sond molekularnych w badaniach ^{19}F NMR.

1.2.4 Fluorowane oligonukleotydy jako sondy molekularne w badaniach ^{19}F NMR

Fluor jest jądrem magnetycznym o spinie $\frac{1}{2}$, charakteryzującym się wysokim współczynnikiem magnetogirycznym i może być z łatwością obserwowany w pomiarach metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Z tego powodu fluorowane małe cząsteczki, białka, a także nukleotydy i kwasy nukleinowe znalazły zastosowanie jako tzw. sondy molekularne do monitorowania procesów (bio)chemicznych (reakcje i równowagi chemiczne, reakcje enzymatyczne) i biofizycznych (zmiany konformacyjne białek, oddziaływanie między cząsteczkami, zmiany struktur drugo- i trzeciorzędowych kwasów nukleinowych) z użyciem metody ^{19}F NMR. Możliwość zastosowania fluorowanych oligonukleotydów jako sond molekularnych w badaniach ^{19}F NMR uwarunkowana jest dostępnością modyfikowanych nukleotydów czy kwasów nukleinowych, stąd potrzeba rozwijania metod syntetycznych.

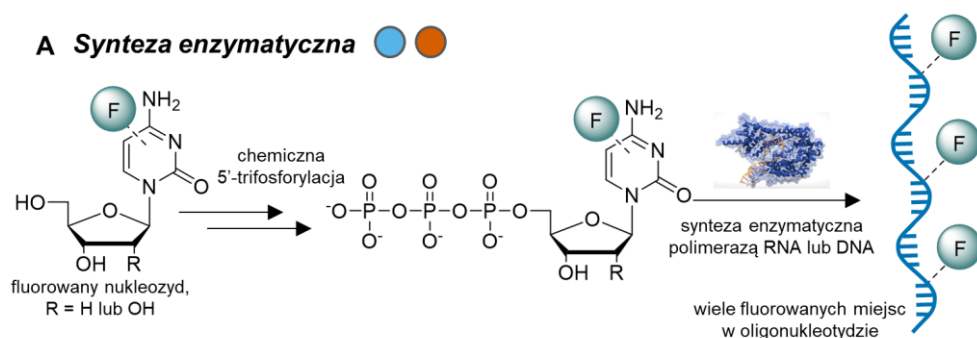
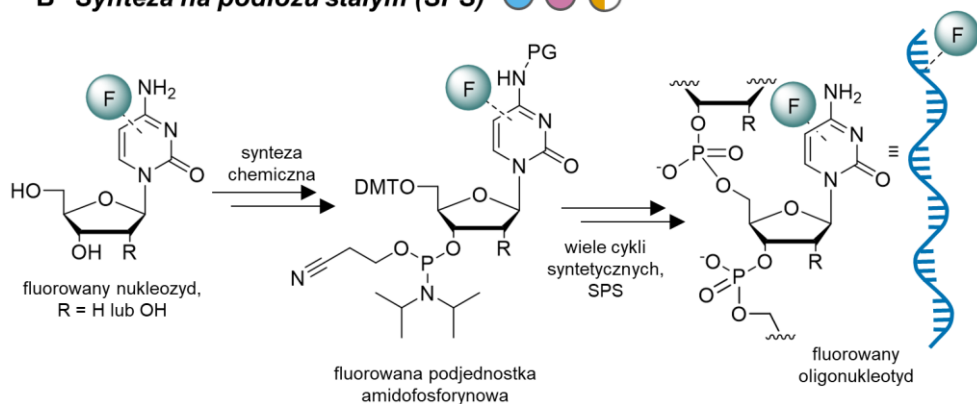
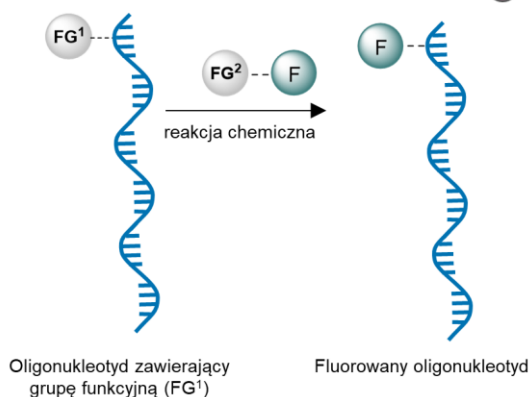
Wyróżnić można trzy podejścia syntetyczne, które umożliwiają otrzymanie fluorowanych kwasów nukleinowych (Rys. 1-17). Pierwszym z nich jest podejście enzymatyczne, które wykorzystuje polimerazy DNA lub RNA oraz fluorowane 5'-trifosforany nukleotydów (Rys. 1-17A). Warunkiem wykorzystania enzymów jest uzyskanie za pomocą metod chemicznych fluorowanego nukleotydu, który może ulec dalszym przemianom zarówno na drodze syntezy chemicznej, jak i syntezy enzymatycznej do 5'-trifosforanowych pochodnych nukleotydów (NTP). Fluorowane NTP mogą zostać następnie włączone do łańcucha polinukleotydowego z udziałem polimeraz. Koniecznością jest zaakceptowanie przez polimerazę zmodyfikowanego nukleotydu. Metoda ta pozwala na jednolite wyznakowanie łańcucha oligonukleotydowego, jednak ze względu na rygorystyczną specyficzność substratową enzymów, nie jest często wykorzystywana. Drugą i zarazem najpopularniejszą metodą otrzymywania fluorowanych oligonukleotydów jest synteza oligonukleotydów na podłożu stałym (ang. *solid-phase*

synthesis, SPS) (Rys. 1-17B). Zaletą SPS jest kontrola nad miejscem wprowadzenia fluorowego znacznika w sekwencji i kontrola nad liczbą wprowadzonych modyfikowanych nukleotydów. Wyzwaniem może być natomiast konieczność chemicznej syntezy substratów przeznaczonych do syntezy na podłożu stałym, tj. amidosforynów. W metodzie SPS stosuje się podłoża, do których przyłączony jest pierwszy nukleotyd (koniec 3'), dlatego wyzwaniem jest umieszczenie fluorowego znacznika na końcu 3'. Do wad można także zaliczyć maksymalną możliwą do otrzymania długość oligonukleotydu. Im dłuższa zaprojektowana sekwencja, tym niższa całkowita wydajność syntezy i konieczność stosowania dużych ilości substratów. Trzecim podejściem wprowadzenia znaczników fluorowych w obręb cząsteczki oligonukleotydu jest tzw. funkcjonalizacja post-syntetyczna (Rys. 1-17C), w której odpowiednio sfunkcjonalizowany oligonukleotyd (zawierający np. grupę alkinową, azydkową, sulfhydrylową) najpierw otrzymywany jest metodą SPS, a następnie, po odcięciu od podłoża stałego, poddawany jest dalszej reakcji. Metoda ta pozwala na miejscowo-specyficzne znakowanie oligonukleotydów na końcach 5' lub 3', jak i wewnątrz sekwencji.

Ze względu na budowę kwasów nukleinowych fluorowany znacznik może zostać umieszczony w obrębie:

- a) zasady azotowej (kategoria I),
- b) rybozy (kategoria II),
- c) jednego z końców nici oligonukleotydowej (kategoria III),

W kolejnych podrozdziałach zebrałem przykłady znakowanych fluorem cząsteczek RNA i DNA, które jednocześnie zostały wykorzystane w badaniach ^{19}F NMR jako sondy molekularne.

A Synteza enzymatyczna ● ●**B Synteza na podłożu stałym (SPS)** ● ● ●**C Funkcjonalizacja post-syntetyczna** ● ●**Legenda**

- F** --- podstawnik mono- lub polifluorowany
- FG** --- reaktywna grupa funkcyjna

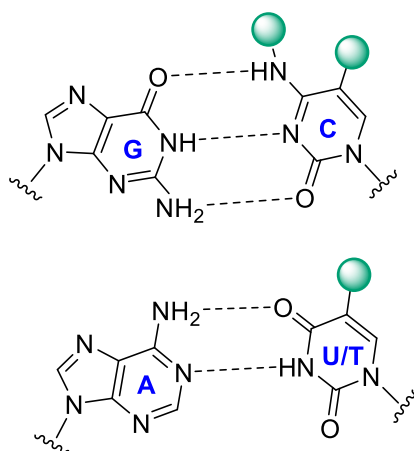
Zastosowania:

- wiele miejsc znakowania
- pojedyncze specyficzne znakowanie
- łatwe i selektywne znakowanie końca 5' lub 3'
- dowolna długość oligonukleotydu

Rys. 1-17. Podejścia syntetyczne umożliwiające otrzymywanie fluorowanych kwasów nukleinowych. A) Synteza enzymatyczna wykorzystująca fluorowane 5'-trifosforany nukleozydów oraz polimerazę DNA lub RNA; B) Synteza na fazie stałej, która wymaga fluorowanych podjednostek amidofosforynowych; C) Funkcjonalizacja post-syntetyczna oligonukleotydu. SPS (ang. *solid phase synthesis*) – synteza na podłożu stałym.

1.2.4.1 Fluor wprowadzony w obręb zasady azotowej - pirymidyny

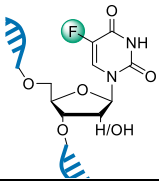
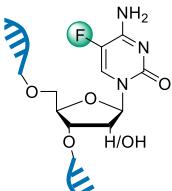
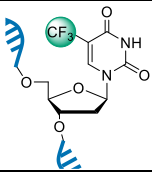
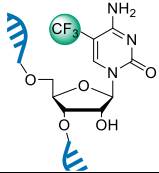
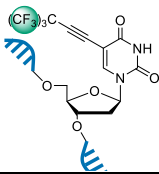
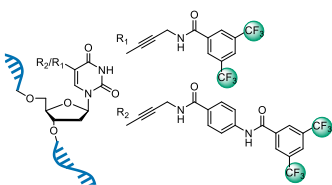
Zdecydowanie najwięcej przykładów fluorowanych kwasów nukleinowych obejmuje grupa związków, w której fluor wprowadzono w obręb pirymidyn (Tabela 1.3) oraz puryn (Tabela 1.4). Wszystkie podejścia syntetyczne przedstawione na Rys. 1-17 były stosowane do otrzymania oligonukleotydów z tej grupy. Osobną klasą związków zasługującą na wyróżnienie są takie, w których wprowadzona modyfikowana zasada azotowa pełniła jednocześnie rolę znacznika ^{19}F NMR jak i fluorescencyjnego.

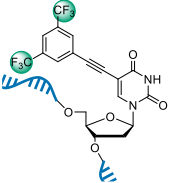
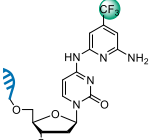
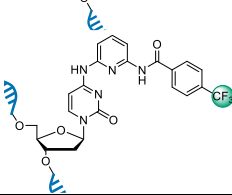


Rys. 1-18. Najczęściej eksplorowane miejsca wprowadzenia fluorowanych podstawników (zielone kółka) w obrębie pirymidyn w kontekście oddziaływań Watsona-Cricka.

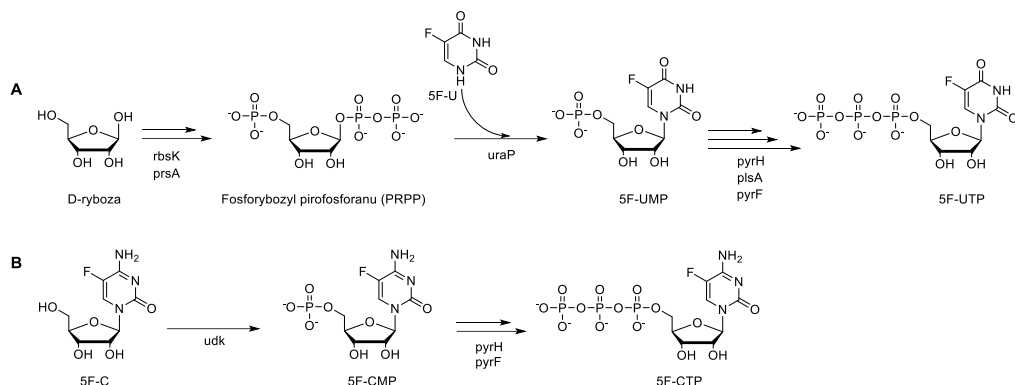
Pirymidyny najczęściej modyfikowane są w pozycji C5, co zostało zademonstrowane wieloma przykładami pochodnych uracylu (ONI.1, ONI.3, ONI.5-7, ONI16-17) oraz cytozyny (ONI.2, ONI.4). Znane są także dwa przykłady modyfikacji cytozyny w obrębie grupy 4-aminowej (ONI.8 i ONI.9). Takie umieszczenie modyfikacji minimalizuje wpływ steryczny wprowadzonego podstawnika, co tym samym uprawdopodabnia utworzenie poprawnych wiązań wodorowych stabilizujących struktury drugorzędowe kwasów nukleinowych (Rys. 1-18).

Tabela 1.3. Oligonukleotydy fluorowane w obrębie pirymidyny. Oznaczenia: ON – oligonukleotyd, SPS – synteza na podłożu stałym, E – synteza enzymatyczna, PM – modyfikacja post-syntetyczna, k.n. – kwas nukleinowy

ON.	Fluorowana podjednostka	Typ k.n.	Metoda syntezy	Zastosowanie w badaniach ^{19}F NMR	Ref.
Pirymidyny					
I.1		DNA/RNA	E SPS	- Badania zwiżania <i>hammerhead ribozyme</i> pod wpływem jonów Mg^{2+}	(65-71)
I.2		DNA/RNA	E SPS	- Zmiany struktur drugorzędowych oligonukleotydów, - Pomiary długodystansowych stałych sprzężenia, - Eksperymenty heterojądrowe NOE (^1H - ^{19}F i homojądrowe NOE (^{19}F - ^{19}F))	(65, 68, 69)
I.3		DNA	SPS	- Monitorowanie reakcji chemicznych indukowanych światłem, - Równowaga pomiędzy strukturami B-Z DNA	(72-75)
I.4		DNA	SPS	- Równowaga pomiędzy strukturami B-Z DNA	(74)
I.5		DNA/RNA	SPS	- Tworzenie dupleksów, - Oddziaływanie RNA z aminoglikozydem (wyznaczenie stałej dysocjacji)	(76-78)
I.6		DNA	PM	- Tworzenie dupleksów DNA, - Tworzenie niekomplementarnych DNA	(79)

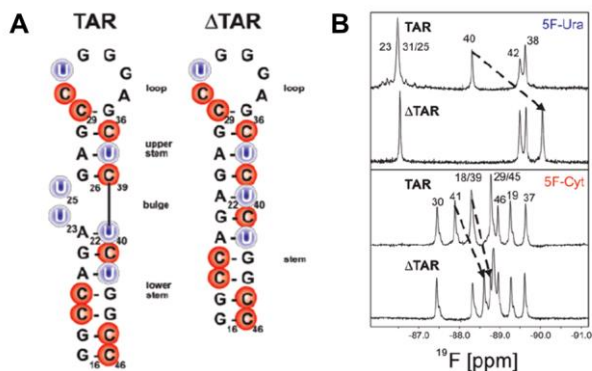
I.7		DNA	SPS	- Badania G-kwadrupleksów DNA	(80)
I.8		DNA	SPS	- Tworzenie dupleksów oraz tripleksów DNA	(81)
I.9					

Kwasy nukleinowe znakowane 5-fluorocytozyną (5F-C) lub 5-fluorouracylem (5F-U) otrzymano m.in. na drodze enzymatycznej z wykorzystaniem odpowiednich 5'-trifosforanów nukleozydów, które również otrzymano metodami chemoenzymatycznymi (Schemat 1-1) (65). Syntezę 5F-UTP rozpoczęto od rybozy, która była przekształcana poprzez kaskadę enzymów: rybokinazę *rbsK* (ang. *ribokinase*), syntetazę 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu *prsA* (ang. *5-phospho-D-ribosyl-R-1-pyrophosphate synthetase*) i fosforybozylotransferazę uracylu *uraP* (ang. *uracil phosphoribosyltransferase*). Powstały 5'-monofosforan-5-fluorourydyny przekształcono następnie do 5'-trifosforanu za pomocą kinazy nukleozydowo-monofosforanowej *pvrH* (ang. *nucleoside monophosphate kinase*), kinazy adenylanowej *plsA* (ang. *adenylate kinase*) oraz kinazy pirogronianowej *pvrF* (ang. *pyruvate kinase*). Przytoczona wydajność syntezy wyniosła 80% (0,8 mmol produktu końcowego), a ścieżkę syntezy przedstawia Schemat 1-1A.



Schemat 1-1. A) Schemat enzymatycznej syntezy 5F-UTP oraz B) 5F-CTP. Oba związki wykorzystano jako substraty polimerazy T7, która wbudowała fluorowane w ten sposób trifosforany nukleozydów do sekwencji RNA. Na podstawie pracy Hennig i wsp.(65)

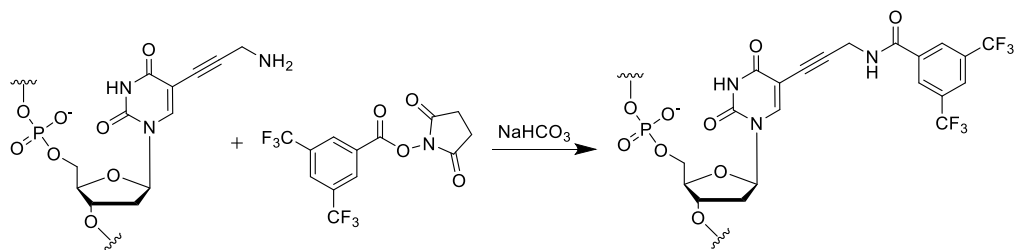
Uproszczoną ścieżkę syntezy enzymatycznej zastosowano do otrzymania 5F-CTP. W tym przykładzie substratem wyjściowym była 5-fluorocytydyna (5F-C), którą fosforylowano do nukleotydu kinazą urydynową *udk* (ang. *uridine kinase*), po czym powstały 5F-CMP enzymatycznie przekształcano do formy 5'-trifosforanowej, 5F-CTP. Wydajność całkowita syntezy wyniosła 78% (Schemat 1-1B). Zarówno 5F-CTP oraz 5F-UTP zostały wbudowane przez polimerazę T7 do RNA w procesie transkrypcji *in vitro*. Tym sposobem otrzymano 30-nt sekwencję wywodzącą się z elementu odpowiedzi transaktywacji ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV-2 TAR RNA), który przyjmuje strukturę drugorzędową spinki do włosów (ang. *hairpin*) wraz z wybrzuszeniem (ang. *bulged*). Metodą ^{19}F NMR monitorowano zmiany strukturalne pojawiające się przy zmianie pełnej sekwencji 30-nukletydowej (TAR) na sekwencję z dwiema delecjami (ΔTAR) (Rys. 1-19). Ponadto, metodą spektroskopii UV/VIS zarejestrowano widma absorpcji w funkcji temperatury, które wyraźnie wykazały, że podstawniki fluorowe nie zmieniają w istotny sposób termodynamicznej stabilności RNA ($T_m [\text{TAR}] = 350,5 \text{ K}$, $T_m [\text{5FU-TAR}] = 351,6 \text{ K}$, $T_m [\text{5FC-TAR}] = 351,2 \text{ K}$).



Rys. 1-19. Badania sekwencji HIV-2 TAR metodą ^{19}F NMR. A) Drugorzędowa reprezentacja sekwencji HIV-2 TAR posiadająca wybrzuszenie oraz ΔTAR bez wybrzuszenia. Kolorem oznaczono fluorowane nukleotydy. B) Widma ^{19}F NMR badanych sekwencji. Rysunek wykonano na podstawie pracy Hennig i wsp. (65)

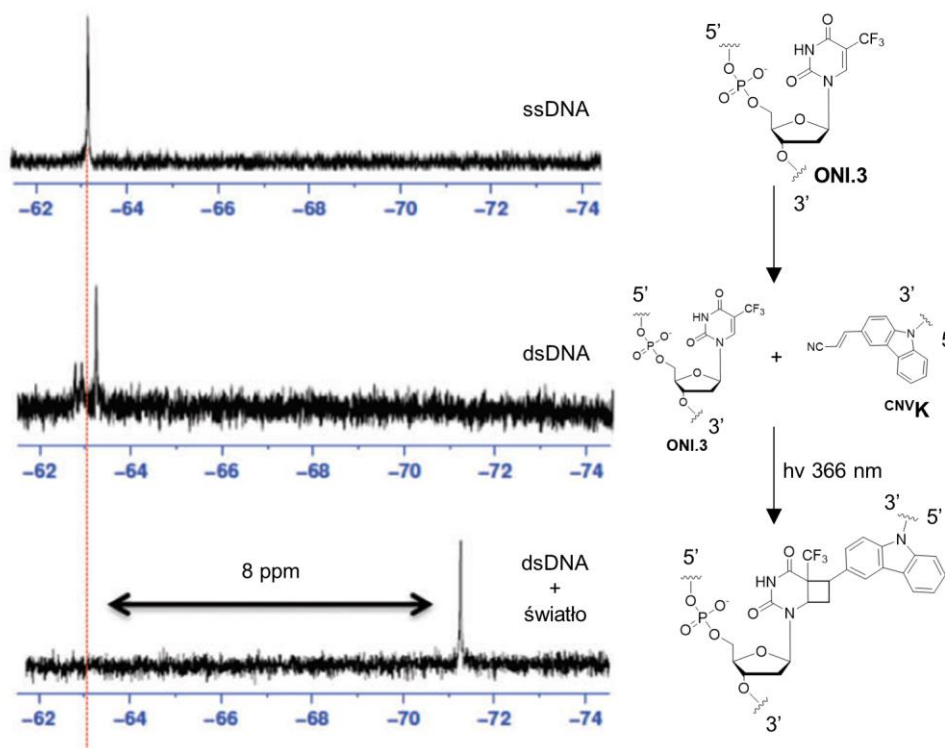
W przedstawionych powyżej badaniach zastosowanym znacznikiem spinowym był atom fluoru bezpośrednio połączony z zasadą azotową, co pociąga za sobą dwie konsekwencje. Po pierwsze, jeden atom fluoru wymusza konieczność zastosowania wyższych stężeń kwasów nukleinowych (większa ilość materiału badawczego), aby czas poświęcony na akwizycję widma był zadowalająco krótki. Ponadto, fluor w odległości równej bądź krótszej niż trzy wiązania od protonu (lub innego układu spinowego) sprzęga się z nim (sprężenie spinowo-spinowe), co objawia się na widmie sygnałem w postaci multipletu, którego intensywność obniżona jest o czynnik multipletowości (np. intensywność dubletu jest dwukrotnie zmniejszona w stosunku do singletu, tripletu trzykrotnie itd). Rozwiązaniem powyższych niedogodności jest zastosowanie znacznika zawierającego kilka równocennych atomów fluoru oraz odizolowanie układu spinowego. Przykładem takiego rozwiązania są oligonukleotydy ONI.3 oraz ONI.4 (Tabela 1.3), które wyznakowano w pozycji C5 pirymidyny grupą trifluorometylową (CF_3), co trzykrotnie zwiększa intensywność sygnału oraz eliminuje sprzężenia spinowo-spinowe z jądrami ^1H . Dodatkowe zwiększenie intensywności osiągnięto poprzez umieszczenie dwóch równocennych grup trifluorometylowych (ONI.6 i ONI.7) lub znacznika nonafluorowego (trzy grupy trifluorometylowe; ONI.5, Tabela 1.3) (76). Wiele oligonukleotydów otrzymano na drodze syntezy chemicznej na podłożu stałym z wykorzystaniem odpowiednich podjednostek amidofosforynowych (Rys. 1-17B). Jedynym przykładem wprowadzenia modyfikacji post-syntetycznie jest oligonukleotyd ONI.6. W trakcie syntezy na podłożu stałym otrzymano oligonukleotyd, którego podjednostki uracynowe zawierały modyfikację w postaci grupy 3-amino-1-propynylowej umieszczonej w pozycji C5 zasady azotowej. Po odcięciu

oligonukleotydu od złoża wykonano reakcję sprzęgania pomiędzy grupą aminową w pozycji 5 a estrem N-hydroksysukcynoimidowym (NHS) kwasu 3,5-bis(trifluorometylo)benzoesowego (79) (Schemat 1-2).



Schemat 1-2. Post-syntetyczne wprowadzenie znacznika fluorowego do sondy oligonukleotydowej (ONI.6) (79).

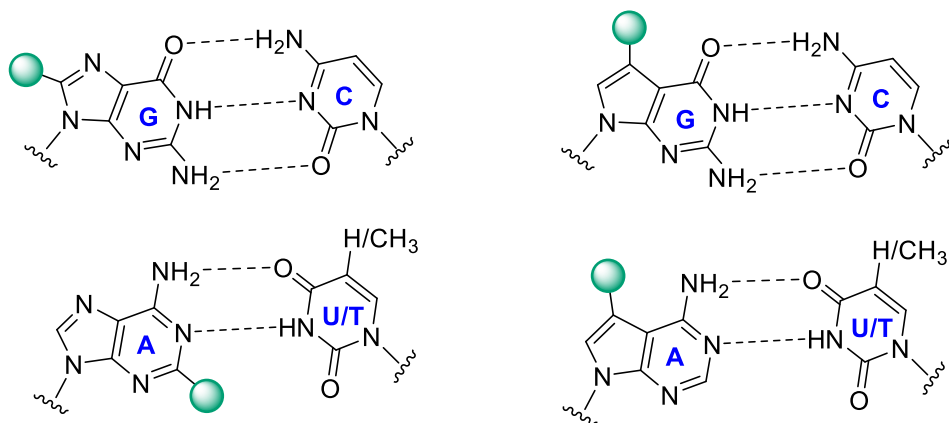
Fluorowane pirymidyny znalazły o wiele więcej zastosowań jako sondy molekularne w badaniach ¹⁹F NMR. Z użyciem tego typu związków monitorowano tworzenie się dupleksów i tripleksów DNA, badano niekomplementarność nukleotydową, monitorowano oddziaływania pomiędzy kwasem nukleinowym a ligandem czy obserwowano równowagę termodynamiczną pomiędzy strukturami B i Z DNA (Tabela 1.3). Do jednego z oryginalniejszych zastosowań zaliczyć można monitorowanie reakcji chemicznej indukowanej światłem. W pracy opublikowanej przez Nakamurę i Fujimoto (73) opisano eksperyment, w którym jedna nić DNA została wyznakowana 3-cyjano-winylokarbazolem (^{CNV}K), natomiast druga nić DNA (ONI.3) zawierała 5-trifluorourydynę. Obie nici były do siebie komplementarne, a po utworzeniu dupleksu DNA obserwowano niewielką zmianę przesunięcia chemicznego na widmie ¹⁹F NMR (Rys. 1-20). W wyniku krótkiego naświetlania (około 20 sekund) następowała reakcja fotochemiczna pomiędzy modyfikowaną pirymidyną a ^{CNV}K z utworzeniem wiązania kowalencyjnego, co skutkowało zmianą hybrydyzacji atomu węgla w pozycji C5 z sp² na sp³. Zmianie tej towarzyszyła znaczna zmiana przesunięcia chemicznego (~8 pm) grupy CF₃ w widmie ¹⁹F NMR (Rys. 1-20).



Rys. 1-20. Monitorowanie indukowanej światłem reakcji pomiędzy trifluorometylowanym oligonukleotydem a oligonukleotydem znakowanym 3-cyjano-winylokarbazolem (^{CNVK}). Rysunek wykonano na podstawie pracy Nakamura i wsp. (73).

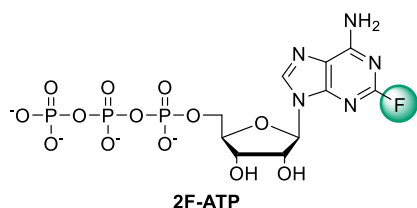
1.2.4.2 Fluor wprowadzony w obręb zasady azotowej - puryny

Opracowane do tej pory fluorowe modyfikacje puryn obejmują wprowadzenie znacznika spinowego w pozycji C8 guanozyny, C2 adenozyzny oraz C9 analogów puryn: 7-deazaguanozyny oraz 7-deazaadenozyzny (Rys. 1-21).



Rys. 1-21. Pary zasad Watsona-Cricka oraz miejsca wprowadzania modyfikacji fluorowych w obrębie puryn (zielone kółka).

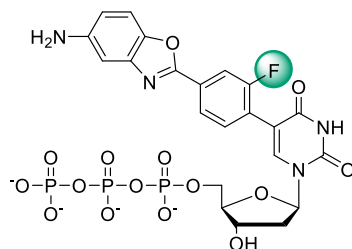
Do syntezy oligonukleotydów fluorowanych w obrębie puryn zastosowano zarówno metody enzymatyczne, jak i syntezę na podłożu stałym. W syntezach enzymatycznych wykorzystano polimerazę RNA T7 i polimerazę DNA KOD XL, które włączały fluorowane podjednostki 5'-trifosforanów nukleozydów do nici kwasu nukleinowego (Rys 1-22). Wykorzystanie 5'-trifosforanu 2-FATP umożliwiło wyznakowanie sekwencji HIV-2 TAR (82). Badania UV/VIS przeprowadzone w celu porównania stabilności termodynamicznej nici niefluorowanej i fluorowanej pokazały, iż fluorowa modyfikacja nieznacznie obniża temperaturę mięknięcia struktury drugorzędowej RNA (82). Oznacza to, że 2-fluoro-adenozyna (2-FA) powoduje tylko łagodne perturbacje struktury helikalnej RNA, przy czym oddziaływanie z komplementarnym uracylem zostaje zachowane.

Hennig i wsp., *JACS*, **2004**

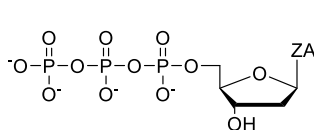
Polimeraza: RNA T7

Sochor i wsp., *JBiomolNMR*, **2016**

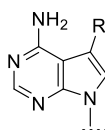
Polimeraza: P266L mutant RNA T7

Riedl i wsp., *JOC*, **2012**

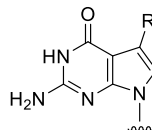
Polimeraza: KOD XL

Olszewska i wsp. *JOC*, **2017**

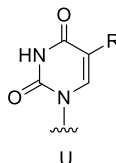
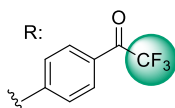
Polimeraza: KOD XL



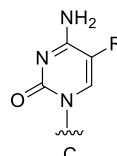
7-dazaA



7-dazaG



U



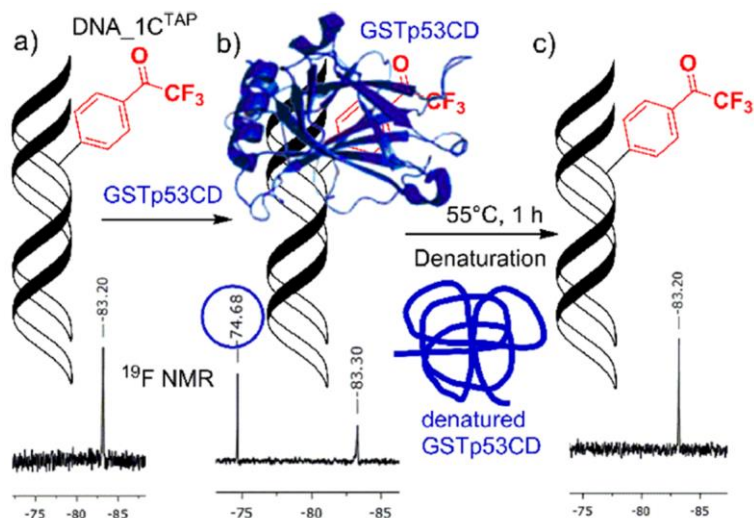
C

Rys. 1-22. Fluorowane 5'-trifosforany nukleozydów jako substraty dla wybranych polimeraz RNA (RNA T7) oraz polimeraz DNA (KOD XL).

Modyfikacja 2-FA została także wprowadzona w obręb 73-nukleotydowego rybosprzętnika (ang. *riboswitch*) (83), a zaprojektowaną sondą molekularną monitorowano oddziaływanie z ligandami. Rybosprzętniki RNA są strukturalnymi elementami regulacji genów, które zlokalizowane są w regionie niekodującym RNA (UTR) (84). Nazwa rybosprzętnik wynika z funkcji tego odcinka RNA, który aktywuje lub wygasa ekspresję genów poprzez zmiany konformacyjne RNA powstałe na skutek oddziaływania z niskocząsteczkowym ligandem (85). W przytaczanej pracy fluorowany rybosprzętnik wykorzystano jako sondę molekularną do monitorowania oddziaływania z hipoksantyną (83).

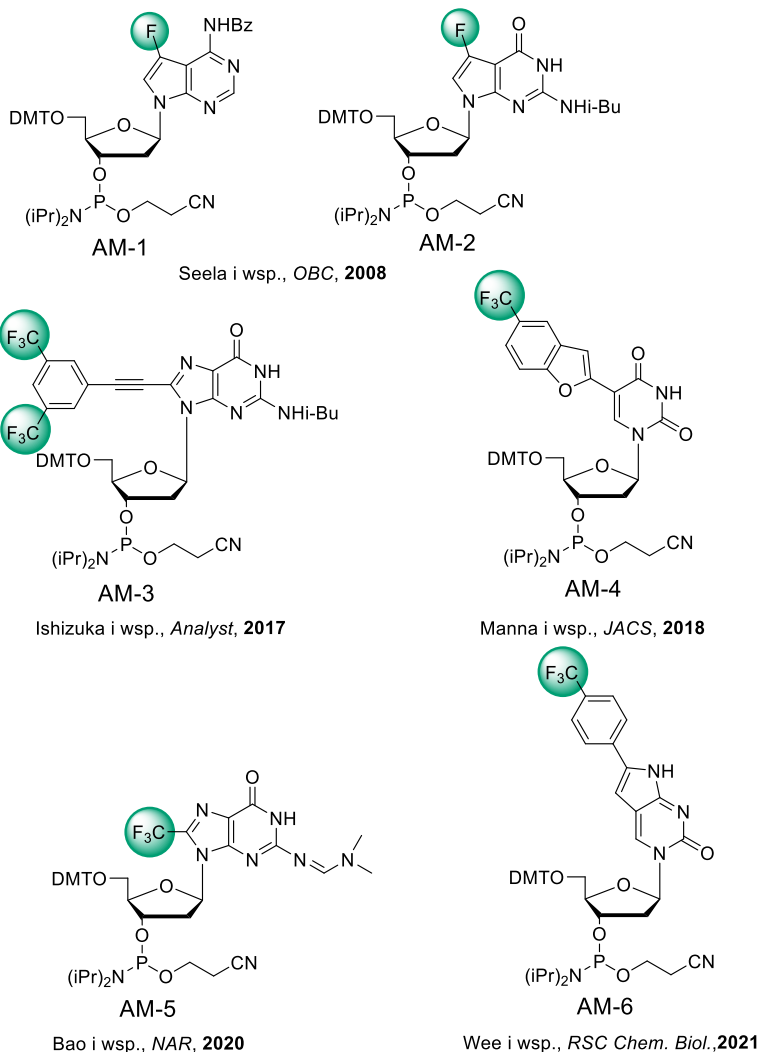
Serię zasad azotowych znakowanych trifluoroacetofenonem (TAP) opublikowano w pracy Olszewska i wsp.(86). Wybrana modyfikacja zwiększyła trzykrotnie intensywność sygnału na widmie ^{19}F NMR w porównaniu do nukleotydów zawierających jeden atom fluoru. Ponadto, trifluorometyloketony są wysoce reaktywne w reakcji addycji nukleofilowej, na przykład w reakcji z grupą hydroksylową seryny. Próbowano przeprowadzić reakcję sieciowania krzyżowego pomiędzy łańcuchem DNA znakowanym za pomocą TAP a mutantem białka p53

(GSTp53CD), jednak nie udało się zaobserwować oczekiwanego produktu. Dzięki zmianie przesunięcia chemicznego sygnałów na widmie ^{19}F NMR stwierdzono natomiast, że modyfikowany oligonukleotyd oddziałuje z białkiem (Rys. 1-23).



Rys. 1-23. Monitorowanie oddziaływania pomiędzy dupleksem DNA wyznakowanym TAP, a białkiem GSTp53CD metodą ^{19}F NMR. a) Rysunek poglądowy oraz widmo ^{19}F NMR DNA_1C^{TAP}. b) Związanie się DNA z białkiem. Na widmie ^{19}F NMR zaobserwowano pojawienie się nowego sygnału. c) Widmo ^{19}F NMR po termicznej denaturacji kompleksu DNA-białko. Rysunek zaczerpnięto z pracy Olszewska i wsp. (86).

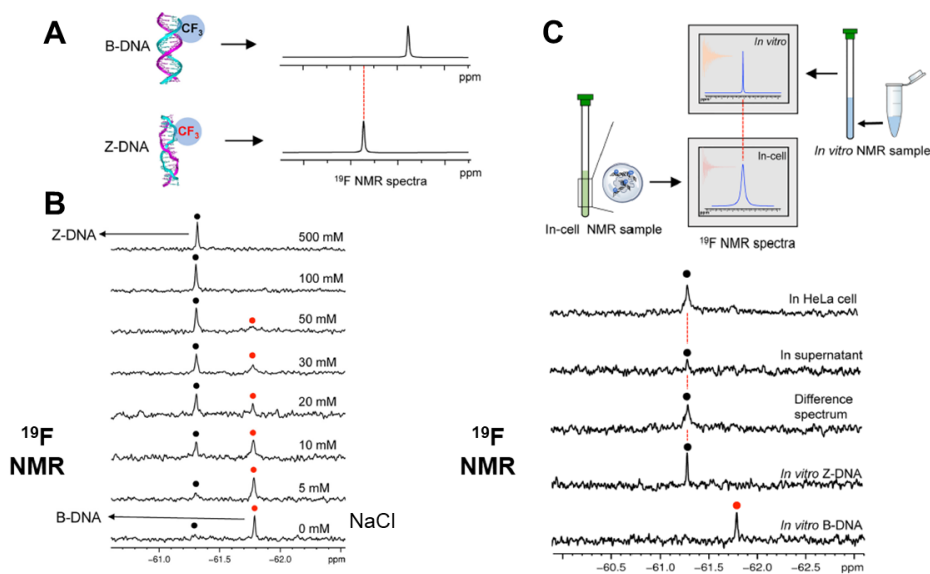
Fluorowane puryny (Tabela 1.4) otrzymywano także metodą na podłożu stałym, co wymagało uprzedniego otrzymania bloków budulcowych przedstawionych na Rys. 1-24. Reprezentatywnymi przykładami są amidofosforyny 7-fluoro-7-deaza-2'-deoksyadenozyny (AM-1) oraz 7-fluoro-7-deaza-2'-deoksyguanozyny (AM-2), które otrzymano z wydajnością 77%. Fluor w pozycji 7 puryny zwiększył stabilność dupleksów DNA oraz wymusił bardziej selektywne parowanie zasad azotowych w porównaniu do DNA zbudowanych z puryn 7-deaza. Niestety, w badaniach dupleksów DNA metodą ^{19}F NMR nie zaobserwowano znaczących różnic w przesunięciach chemicznych pomiędzy pojedynczą nicią DNA a dupleksem DNA, dlatego modyfikacja 7-fluoro-7-deaza nie pozwala na obserwację tworzenia się struktury drugorzędowej DNA (87).



Rys. 1-24. Podjednostki amidofosforynowe zawierające fluorowane zasady azotowe (przeważnie puryny) wykorzystane w syntezie na podłożu stałym. Oznaczenia: Bz – grupa benzoilowa, i-Bu – grupa izobutyrylowa, iPr – grupa izopropylowa.

Do interesujących przykładów fluorowych sond molekularnych można zaliczyć oligonukleotydy DNA wyznakowane 8-trifluoro-2'-deoksyguanozyną ($^{\text{F}}\text{G}$) (88). Wprowadzenie trifluorometylu w pozycję ósmą 2'-deoksyguanozyny miało wpływ na właściwości fizykochemiczne cząsteczki, modulując konformację 2'-deoksyguanozyny z *anty* na *syn*, co miało stabilizujący wpływ na powstanie dupleksu DNA typu Z. Z-DNA pełni kluczową rolę podczas ekspresji genów i rekombinacji genetycznej, dlatego zaprojektowanie sond molekularnych umożliwiających zidentyfikowanie formy DNA w eksperymentach *in vitro* oraz

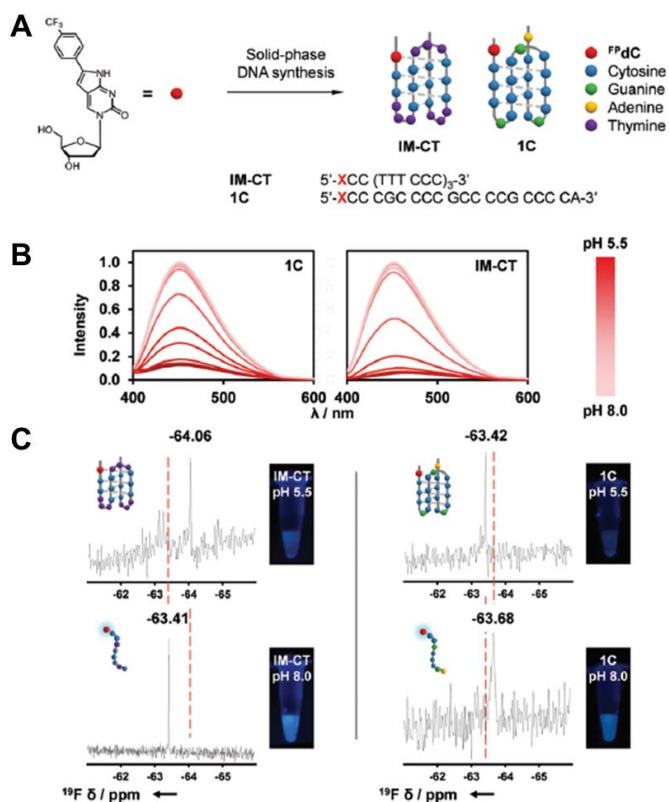
in vivo wydaje się bardzo atrakcyjne. Struktury B-DNA i Z-DNA są od siebie różne pod względem ułożenia przestrzennego zasad azotowych w podwójnej helisie, co wiąże się z różnym otoczeniem chemicznym grupy trifluorometylowej. Ponadto, wpływ na formę DNA w roztworze ma między innymi jego siła jonowa, którą można kontrolować za pomocą stężenia chlorku sodu. Dlatego na widmach ^{19}F NMR 12-nt dupleksu DNA obserwowano dwa sygnały odpowiadające dwóm formom DNA (co dodatkowo potwierdzono metodą dichroizmu kołowego, CD) (Rys. 1-25A i B). Ponadto, dupleks $\text{d}(\text{CGC}^{\text{F}}\text{GCG})_2$ transfekowano do komórek HeLa i zarejestrowano widmo ^{19}F NMR zawiesiny komórek. Porównanie przesunięć chemicznych uzyskanych podczas eksperymentów *in vitro* oraz w linii komórkowej pozwoliło na potwierdzenie występowania formy Z-DNA w komórkach (Rys. 1-25C) (88).



Rys. 1-25. Eksperymenty ^{19}F NMR badania przejść struktur B-Z DNA *in vitro* i *in vivo*. A) Idea eksperymentu. B) Widma ^{19}F NMR sekwencji $\text{d}(\text{CGC}^{\text{F}}\text{GCG})_2$ zarejestrowane w 1 mM buforze fosforanowym pH 7.0 z różnym stężeniem NaCl. C) Koncepcja eksperymentu *in vivo* oraz zestawienie widm ^{19}F NMR. Rysunek wykonano na podstawie pracy Bao i wsp. (88)

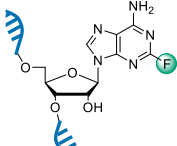
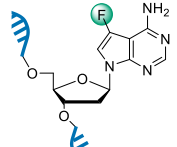
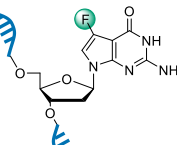
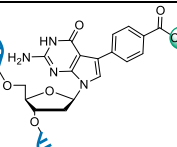
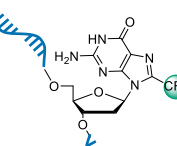
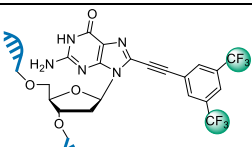
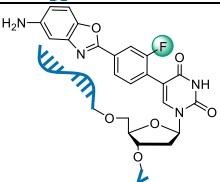
W roku 2021 ukazała się praca opisująca zastosowanie fluorowanych oligonukleotydów jako sond bifunkcyjnych (89). Autorzy stworzyli modyfikację, która łączyła w sobie właściwości znacznika ^{19}F NMR oraz znacznika fluorescencyjnego. Opracowana modyfikacja to pochodna cytydyny podstawiona w pozycji 5 grupą trifluorometylofenylopirolową ($^{\text{F}}\text{PdC}$) (Rys. 1-26A). Metodą syntezy na podłożu stałym nukleotyd $^{\text{F}}\text{PdC}$ włączono w nić DNA bogatą w cytozyny, tworzącą w roztworach wodnych o niskim pH struktury *i*-motywu. Są to

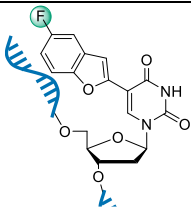
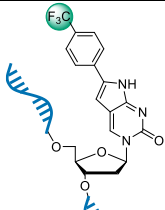
niekanoniczne struktury drugorzędowe DNA, zbudowane z czterech oddziałujących ze sobą nici, które stabilizowane są wiązaniami wodorowymi pomiędzy hemiprotonowanymi parami cytozyn (90). Ostatnie badania wykazały bezpośrednią obecność *i*-motywów w jądrach komórek ludzkich (91), w związku z tym struktury tego typu zyskały wiele uwagi jako potencjalne regulatory ekspresji genów. Oligonukleotydy IM-CT oraz 1C zawierające modyfikację ^{FP}dC (Rys. 1-26A) wykazywały znaczne zmiany w intensywności fluorescencji (Rys. 1-26B) oraz w przesunięciach chemicznych ¹⁹F NMR, dzięki czemu możliwe było wykrycie obecności *i*-motywów (Rys. 1-26C) (89).



Rys. 1-26. Badania tworzenia struktur *i*-motywów za pomocą fluorowanych sond oligonukleotydowych. A) Graficzne przedstawienie *i*-motywów IM-CT, 1C oraz umiejscowienie modyfikowanej cytydyny. B) Widma emisji fluorescencji w różnych pH. λ_{wz} = 374 nm dla FDdC i 1C, λ_{wz} = 365 nm dla IM-CT. C) Widma ¹⁹F NMR próbek w różnych pH oraz zdjęcia roztworów w świetle UV.

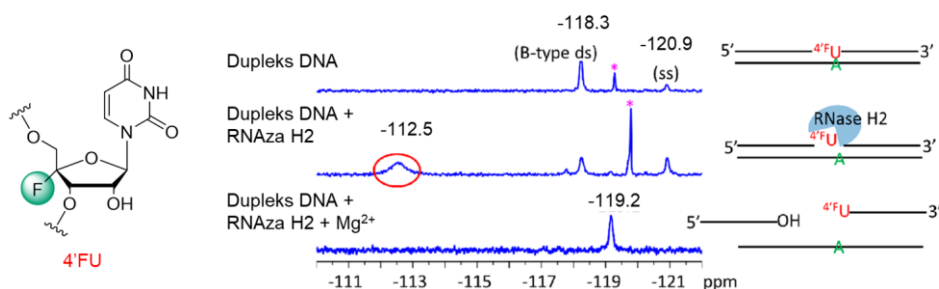
Tabela 1.4. Oligonukleotydy fluorowane w obrębie puryny. Oznaczenia: SPS – synteza na podłożu stałym, E – synteza enzymatyczna, PM – modyfikacja post-syntetyczna.

ON.	Fluorowana podjednostka	Typ k.n.	Metoda syntezy	Zastosowanie w badaniach ^{19}F NMR	Ref.
Puryny					
I.10		RNA	E	- Oddziaływania ryboprzełącznik RNA-białko - Monitorowanie reakcji enzymatycznych	(82, 83)
I.11		DNA	SPS	- Tworzenie dupleksów DNA - Badania stabilności dupleksów	(87)
I.12					
I.13		DNA	E	- Oddziaływanie DNA-białko	(86)
I.14		DNA	SPS	- Równowaga pomiędzy strukturami B-Z DNA	(88)
Zasady azotowe bifunkcyjne – ^{19}F NMR + fluorescencja					
I.15		DNA	SPS	- Badania G-kwadrupleksów DNA	(92)
I.16		DNA	E	- Zmiany struktur drugorzędowych DNA	(93)

I.17		DNA	SPS	- Badania G-kwadrupleksów DNA - Badania <i>in vitro</i>	(94)
I.18		DNA	SPS	- Badanie struktur <i>i</i> -motywów	(89)

1.2.4.3 Fluorowany podstawnik wprowadzony w obręb rybozy

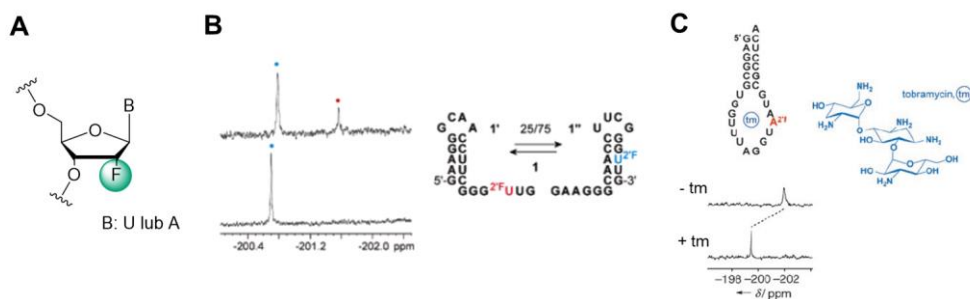
Fluorowane pochodne oligonukleotydów można otrzymać również poprzez wprowadzenie znacznika w obrębie rybozy (Tabela 1.5). Otrzymanie tego typu polimerów realizuje się głównie metodą syntezy na podłożu stałym. Metody enzymatyczne nie są często wykorzystywane, ponieważ modyfikacja w obrębie cukru zaburza oddziaływanie z polimerazami, przez co nie włączają one fluorowanych nukleotydów do łańcucha oligonukleotydowego. Pojedynczy atom fluoru został wprowadzony w pozycję 2' (ONII.1) lub 4' (ONII.2) rybozy poprzez zastąpienie grupy hydroksylowej lub atomu wodoru. Nie jest to najlepsza strategia projektowania sond do NMR, ponieważ fluor ulega sprzężaniu z protonami, przez co widmo ^{19}F NMR jest trudniejsze do odczytania, a co ważniejsze, intensywność sygnałów jest mniejsza o czynnik multipletowości. Aby rozwiązać ten problem, podobnie jak w przykładach opisywanych w poprzednim rozdziale, stosuje się łączniki, które izolują sprzęgające się ze sobą układy spinowe.



Rys. 1-27. Monitorowanie procesu hydrolizy wiązania fosfodiesterowego przez RNAzę H2 metodą ^{19}F NMR. Z lewej strony przedstawiono strukturę modyfikacji wprowadzonej w obręb oligonukleotydu. W środkowej części zaprezentowano widma ^{19}F NMR roztworu dupletu DNA po dodaniu enzymu (czerwone kółko zaznacza sygnał powstały na skutek związania się RNAzy z dupleksem) oraz po aktywacji enzymu jonami magnezu. Zmiana przesunięcia chemicznego -118,3 ppm vs. -119,2 ppm świadczy o zmianie otoczenia chemicznego atomu fluoru, a w tym wypadku o zmianach struktury w wyniku przebiegu reakcji enzymatycznej. Rysunek wykonany na podstawie pracy Li i wsp.(95). Gwiazdka oznacza niezidentyfikowane zanieczyszczenie.

Wprowadzenie fluoru w obrębie rybozy może być korzystne ze względu na efekt stereoelektronowy. Obecność atomu o wysokiej elektroujemności wpływa na konformację rybozy, a tym samym moduluje oddziaływania wewnątrz- oraz międzycząsteczkowe. Niedawno (2020 r.) opublikowane badania (95) opisują otrzymanie stabilnych nici RNA, w których jedna z zasad azotowych zawierała fluor w pozycji 4' rybozy (ONII.2, 4FU). Aby umożliwić wbudowanie tak fluorowanego nukleozydu do oligonukleotydu metodą chemiczną, na drodze siedmioetapowej syntezy, otrzymano stabilny chemicznie

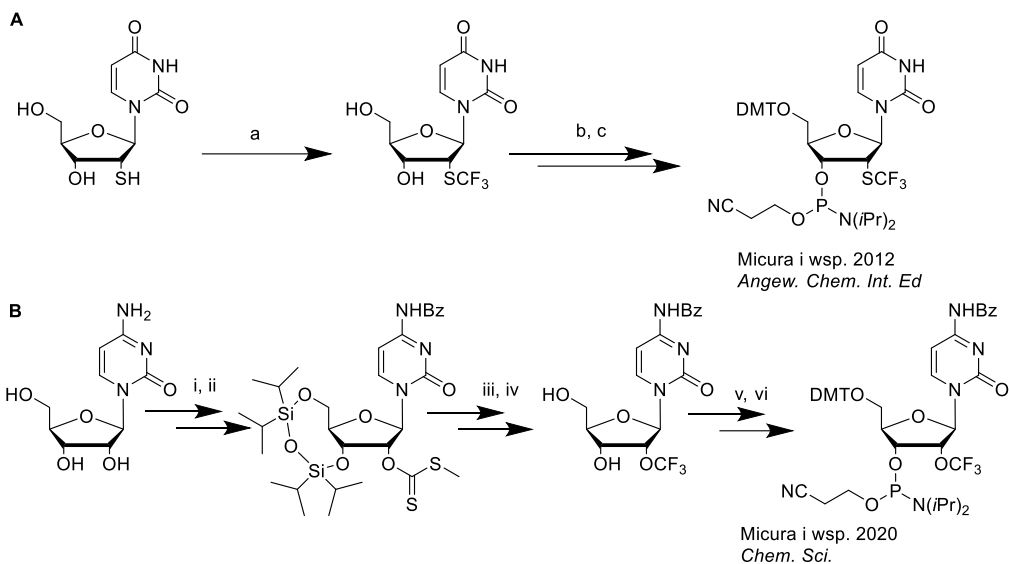
amidofosforyn z wydajnością całkowitą 18%. Badania NMR oraz biofizyczne wykazały, że fluor w pozycji 4' wymusza konformację północną (C3'-endo) rybozy, co jednak nie prowadzi do zaburzeń w strukturze RNA. Co ciekawe, w przeciwieństwie do oligonukleotydów 2'F-RNA (FNA), modyfikacja 4'FU nie wymaga usunięcia grupy 2'OH, która jest niezbędna do pełnienia prawidłowej funkcji biologicznej przez RNA. W konsekwencji, dupleks DNA, w którym w jednej z nici umieszczono 4'FU, był rozpoznawany przez enzym RNAzę H2 jako substrat, a przebieg reakcji enzymatycznej monitorowano metodą ^{19}F NMR (Rys. 1-27). W tej samej pracy 20-nukleotydowe RNA znakowane 4'FU zostało wykorzystane do badania zmian konformacyjnych bistabilnego oligonukleotydu przyjmującego strukturę drugorzędową spinki do włosów. Podobne wyniki zaprezentowano w pracy Kreutz i wsp.(96), gdzie spinkę znakowano nukleotydami 2'FU lub 2'FG (Rys. 1-28B). Rozwinięciem badań nad strukturami typu *hairpin* jest monitorowanie wiązania się RNA z antybiotykami aminoglikozydowymi, tobramycyną oraz streptomycyną metodą, ^{19}F NMR (Rys. 1-28C) (97).



Rys. 1-28. A) Struktura modyfikacji 2'F. B) Rozpoznanie dwóch różnych struktur drugorzędowych DNA bistabilnej „spinki” za pomocą modyfikacji 2'FU. Rysunek wykonano na podstawie Kreutz i wsp.(96); C) Monitorowanie wiązania się tobramycyny z aptamerem RNA wyznakowanym 2'FA. Rysunek wykonano na podstawie Kreutz i wsp.(97)

Kolejne przykłady sond molekularnych fluorowanych w obrębie rybozy zostały rozwinięte w stosunku do modyfikacji 2'F czy 4'F poprzez zastąpienie pojedynczych atomów fluoru podstawnikami trifluorometylowymi: - jako znacznik fluorowy zastosowano grupę trifluorometylową, która ze względu na obecność trzech równocennych atomów fluoru pozwoliła na zastosowanie niższych stężeń oligonukleotydów w badaniach, co jednocześnie wyeliminowało ewentualne problemy z agregacją biocząsteczek oraz obniżyło ilości potrzebnego materiału; - odizolowano układ spinowy fluoru poprzez zastosowanie tzw. „spacerów”, czyli atomów lub grup atomów oddzielających fluor od protonów (czy innych układów spinowych aktywnych w NMR), takich jak siarka (ONII.3), grupa triazolowa (ONII.4-

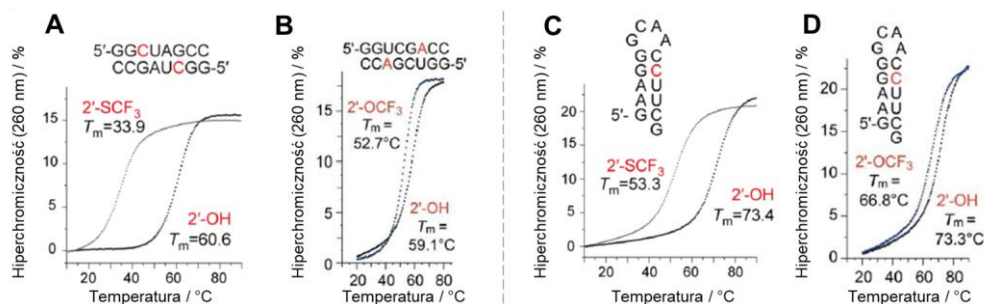
ONII.5), grupa fenylowa (ONII.6) czy atom tlenu (ONII.7). Synteza amidofosforynu zawierającego podstawnik 2'-S-CF₃ została przedstawiona na Rys. 1-29A. Substratem do syntezy była 2'-deoksy-2'-merkaptourydyna, którą poddano reakcji z elektrofilowym odczynnikiem trifluorometylującym znanym pod nazwą reagenta Togni II(98). Regioselektywna trifluorometylacja grupy tiolowej została osiągnięta z 80% wydajnością. Kolejne etapy syntezy objęły zabezpieczenie grupy 5'OH eterem dimetoksytrytylowym (DMT) i następczą konwersję do amidofosforynu. Całkowita wydajność syntezy wyniosła 60%.



Rys. 1-29. Schemat syntezy amidofosforynów trifluorowanych w pozycji 2' rybozy. A) Wprowadzenie modyfikacji 2'-S-CF₃; a) 3,3-dimetylo-1-trifluorometylo-1,2-benziodoksol (reagent Togni II), CH₃OH, -78°C → RT, 16h, 80%; b) DMT-Cl, DMAP, pirydyna, RT, 16h, 81%; c) chlorek fosforoamidu-(2-cyanoetyl)-N,N-diizopropylu, N-etyldiizopropylamina, CH₂Cl₂, RT, 2,5h, 93%. Całkowita wydajność 60%. B) Wprowadzenie modyfikacji 2'-OCF₃. i) TIPDS/Cl₂, pirydyna, RT, 5h, 86%; ii) tBuLi, CS₂, CH₃I, THF, -75°C → RT, 18h, 77%; iii) bezwodnik benzoesowy, DMF, RT, 16h, 90%; iv) NBH, HF w pirydynie, CH₂Cl₂, -75°C → 0°C, 3h, 16%; v) DMTCl, DMAP, pirydyna, RT, 16h, 86%; vi) chlorek fosforoamidu-(2-cyanoetyl)-N,N-diizopropylu, N-etyldiizopropylamina, 1-metylimidazole, CH₂Cl₂, RT, 2h, 92%. Całkowita wydajność 7,5%.

Na łamach trzech publikacji naukowych opisano wpływ grupy 2'-S-CF₃ na stabilność struktur drugorzędowych RNA oraz wykazano wszechstronne zastosowania tak modyfikowanych RNA w badaniach ¹⁹F NMR. Odnotowano, iż podstawnik 2'-S-CF₃ wymusza konformację C2'-endo (S) rybozy, co powoduje destabilizację dupleksów RNA (obniżenie temperatury mięknienia od 5,5°C do ponad 25°C) oraz struktur typu „spinka do włosów”, przy czym efekt ten jest mniejszy gdy modyfikowany nukleozyd znajduje się poza obszarem duplesu (99). Zmiana stabilności jest tłumaczona zaburzeniem planarnej struktury zasad azotowych, co tym samym prowadzi

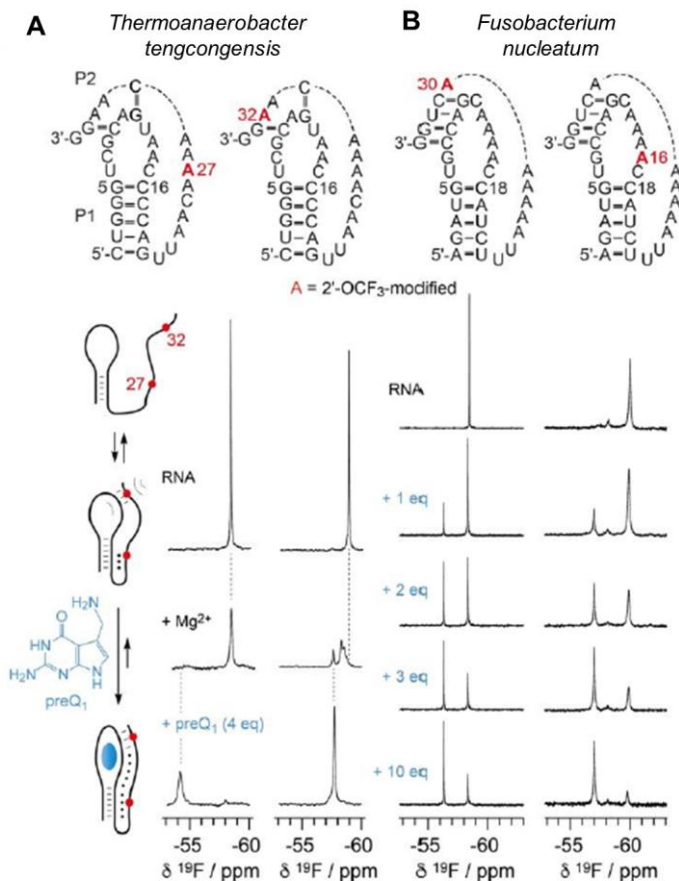
do osłabienia oddziaływań warstwowych (ang. *stacking*) i wiązań wodorowych pomiędzy zasadami (100). Dla porównania warto przytoczyć przykład modyfikacji 2'-O-CF₃ rybozy, który został opisany przez tę samą grupę badawczą 8 lat po publikacji wyników dotyczących modyfikacji 2'-S-CF₃. Autorzy prac zaznaczyli dość wymagającą i wieloetapową, a co za tym idzie, charakteryzującą się również niską wydajnością ścieżkę syntezy podjednostek amidofosforynowych, w której analog 2'OCF₃-C^{bz}-CEP otrzymano z wydajnością całkowitą na poziomie 7,5% (Rys. 1-29B). Analogicznie jak w poprzednich pracach wykonano badania wpływu modyfikacji 2'-O-CF₃ na stabilność dupleksów RNA. Jednak w tym przypadku nie obserwowano znaczącego obniżenia temperatur mięknienia dupleksów, co oznacza mniejszą destabilizację podwójnych nici RNA niż w przypadku 2'-S-CF₃ (Rys. 1-30) Ponownie można to wytłumaczyć konformacją jaką przyjmuje ryboza, a badania ¹H NMR jasno wskazały na formę C3'-endo (N), która jest korzystana dla zachowania oddziaływań warstwowych pomiędzy zasadami azotowymi.



Rys. 1-30. Badania UV/VIS stabilności dupleksów RNA składających się z dwóch pojedynczych nici (A i B) oraz z pojedynczej nici przyjmującej strukturę spinki do włosów (C i D). Można zaobserwować wyraźne różnice w wartościach temperatur mięknienia dla wprowadzonych modyfikacji 2'-S-CF₃ oraz 2'-O-CF₃. Rysunek wykonano na podstawie publikacji Micura i wsp.(99,101)

Pomimo znaczących różnic we właściwościach termodynamicznych RNA znakowanych 2'-S-CF₃ oraz 2'-O-CF₃ wykonano szereg badań ¹⁹F NMR, w których za pomocą obu modyfikacji monitorowano procesy zmian strukturalnych RNA, oddziaływania RNA-białko czy oddziaływania RNA-ligand. Ponadto rozwinięto metodę syntezy amidofosforynów o podjednostki pirymidynowe znakowane 2'-S-CF₃ oraz 2'-O-CF₃, co umożliwia wyznaczkowanie wszystkich czterech zasad azotowych budujących RNA (101,102). Metodą ¹⁹F NMR monitorowano wiązanie się liganda, 7-aminoetylo-7-deazaguaniny (preQ₁) ze modyfikowanym ryboprzełącznikiem (ang. *riboswitch*), który jest małym aptamerem RNA występującym w bakteriiach *Thermoanaerobacter tengcongensis* oraz *Fusobacterium nucleatum*. Związanie

się liganda (preQ₁) stabilizuje strukturę aptameru, co było obserwowane dzięki zmianom w przesunięciach chemicznych na widmach ¹⁹F NMR (101) (Rys. 1-31).

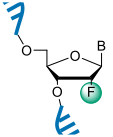
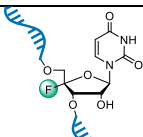
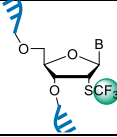
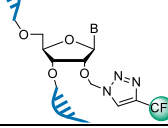
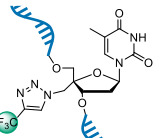
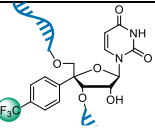
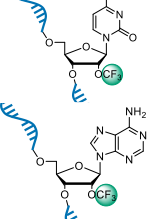


Rys. 1-31. Monitorowanie oddziaływania RNA-ligand metodą ¹⁹F NMR. A) Struktura drugorzędowa ryboprzełącznika preQ₁-I bakterii *Thermoanaerobacter tengcongensis* z zaznaczoną na czerwono pozycją 2'-OCF₃; B) Struktura drugorzędowa ryboprzełącznika preQ₁-I bakterii *Fusobacterium nucleatum* z zaznaczoną na czerwono pozycją 2'-OCF₃; Po lewej stronie przedstawiono schematyczny model fałdowania wspomaganego aptamerami pseudowężła RNA i stabilizacji poprzez wiązanie małej cząsteczki 7-aminometylo-7-deazaguaniny (preQ₁) (zaznaczona na niebiesko). W środkowej części zaprezentowano widma ¹⁹F NMR. Rysunek wykonano na podstawie pracy Micura i wsp.(101).

Dwa niniejsze podrozdziały zawierają wiele przykładów struktur i zastosowań fluorowanych kwasów nukleinowych w badaniach biofizycznych. Jak pokazano, wprowadzenie modyfikacji w obrębie zasady azotowej lub rybozy wywiera zmiany w strukturze modyfikowanego nukleozydu, które mogą mieć negatywny wpływ na stabilność i oddziaływania DNA i RNA. Rozwiązaniem tych problemów może być wprowadzenie

fluorowanego elementu w większej odległości od struktur stabilizujących podwójne helisy czy interakcje z białkami i ligandami, co zostanie opisane w kolejnym podrozdziale.

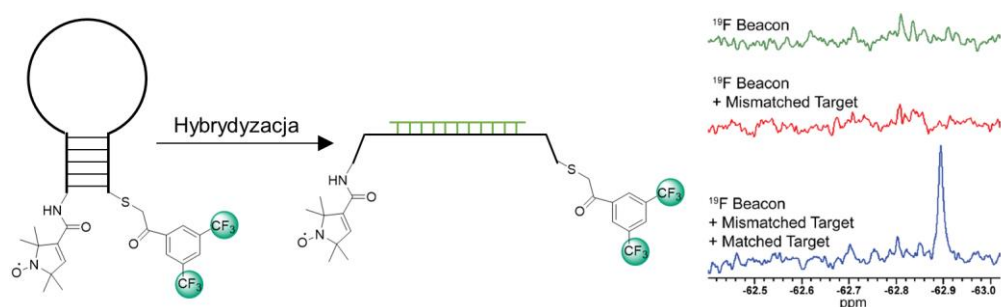
Tabela 1.5. Oligonukleotydy fluorowane w obrębie rybozy. Oznaczenia: SPS – synteza na podłożu stałym, E – synteza enzymatyczna.

ON.	Fluorowana podjednostka	Typ k.n.	Metoda syntezy	Zastosowanie w badaniach ^{19}F NMR	Ref.
II.1		RNA	SPS/E	- Eksperymenty enzymatyczne - Hybrydyzacje nici oligonukleotydowych, - Wyznaczenie czasów T_2, T_1 - Dynamika struktur drugorzędowych RNA - Oddziaływanie z ligandami	(95-97,103,104)
II.2		RNA	SPS	- Zmiany strukturalne RNA - Monitorowanie reakcji enzymatycznej z RNAzą-H	(95)
II.3		RNA	SPS	- Zmiany struktur drugorzędowych RNA - Oddziaływanie RNA-białko	(99,102,105)
II.4		RNA	SPS	- Zmiany strukturalne RNA - Badania G-kwadrupleksów oraz struktur typu <i>hairpin</i>	(106,107)
II.5		DNA	SPS	- Badania dupleksów oraz tripleksów DNA, - Oddziaływanie pomiędzy DNA a antybiotykami aminoglikozydowymi np. neomycyną	(108)
II.6		RNA	SPS	- Zmiany strukturalne RNA - Badania G-kwadrupleksów oraz struktur typu <i>hairpin</i>	(106)
II.7		RNA	SPS	- Zmiany strukturalne RNA - Oddziaływanie RNA z ligandem	(101)

1.2.4.4 Fluor wprowadzony na końcu nici oligonukleotydowej

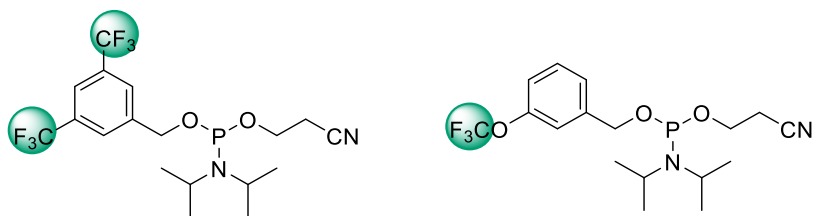
W ostatniej kategorii zebrano nieliczne przykłady oligonukleotydów wyznakowanych fluorem na końcu 5' lub 3' nici polimeru (Tabela 1.6). Jedynym przykładem znakowania na końcu 3' jest deoksyrybonukleotyd ONIII.1, który otrzymano z komercyjnie dostępnych substratów. Metoda syntezy została zaadaptowana z metod post-translacyjnej modyfikacji białek, gdzie wykorzystuje się naturalnie występujące reaktywne grupy funkcyjne (NH_2 , SH , OH) (109). Modyfikacje tych grup mogą zostać przeprowadzone w warunkach wodnych lub częściowo wodnych, co dodatkowo ułatwia i zwiększa wydajność syntezy. W przypadku oligonukleotydu ONIII.1 przeprowadzono reakcję pomiędzy grupą tiolową umieszczoną na końcu 3' oligonukleotydu a 2-bromo-1-[3,5-di(trifluorometyl)fenylo]etan-1-onem (TFB). W reakcji tej, przebiegającej według mechanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$, grupa tiolowa pełni rolę nukleofila reagującego z elektrofilowym halogenkiem alkilowym. Do zalet tej metody syntezy autorzy zaliczają dostępność handlową zarówno TFB, jak i modyfikowanego siarką oligonukleotydu. Kolejnymi zaletami są wysoka reaktywność grupy tiolowej oraz, co najważniejsze, obecność sześciu (dwie grupy CF_3) równocennych magnetycznie atomów fluoru, co zwiększa stosunek sygnału do szumu na widmach ^{19}F NMR (110). Zaprojektowany oligonukleotyd pełnił funkcję sondy molekularnej w postaci tzw. molekularnej latarni (ang. *molecular beacon*, *MBC*). MBC to sekwencja nukleotydów przyjmująca w roztworze postać spinki do włosów o funkcji sondy hybrydizacyjnej (111). Molekularne latarnie standardowo zbudowane są z pary fluoroforów zdolnych do wykazywania zjawiska transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET, ang. *Förster resonance energy transfer*). Sonda tego typu zawiera fluorofor "donorowy" na jednym końcu oligonukleotydu i „akceptorowy” fluorofor lub wygaszacz na drugim końcu. W swoim natywnym stanie spinki do włosów, w którym oba fluorofory są blisko siebie, obserwuje się niską fluorescencję donora ze względu na transfer energii do wygaszacza. Gdy dojdzie do linearyzacji sondy molekularnej (na skutek hybrydizacji z innym oligonukleotydem lub pod wpływem wysokiej temperatury) donor i wygaszacz oddalają się od siebie, a fluorescencja tego pierwszego zostaje przywrócona. W przytoczonej pracy podobną logikę zastosowano do stworzenia sondy ^{19}F NMR. Mechanizm „wygaszania” sygnału ^{19}F NMR oparto na zjawisku wzmocnionej relaksacji paramagnetycznej (PRE, ang. *paramagnetic relaxation enhancement*). Poszerzenie sygnału na widmie ^{19}F NMR następuje na skutek oddziaływania dipolarnego pomiędzy grupą chemiczną zawierającą niesparowany elektron (rodnik) a spinem jądrowym fluoru. Oddziaływanie to powoduje bardzo duże przyspieszenie relaksacji układu spinowego,

czego konsekwencją jest skrócenie czasów relaksacji (T_1 i T_2) i poszerzenie sygnału NMR. Podobnie jak w przypadku FRET, efekt PRE zależy od dystansu pomiędzy znacznikami z maksymalną efektywną odległością wynoszącą 35 Å (112). Oddalenie się od siebie niesparowanego elektronu i układu spinowego na odległość większą niż 35 Å przywraca sygnał na widmie ^{19}F NMR (Rys. 1-32). Sonda wyznakowana TFB została wykorzystana do badania zmian hybrydyzacyjnych. Innym przykładem wykorzystującym ten sam mechanizm obserwacji zmian struktury oligonukleotydów jest sonda wyznakowana fluorem na końcu 5' (ONIII.2), a rodnikiem na końcu 3'. Idea zastosowania jest ta sama, natomiast synteza została wykonana całkowicie na podłożu stałym (113).



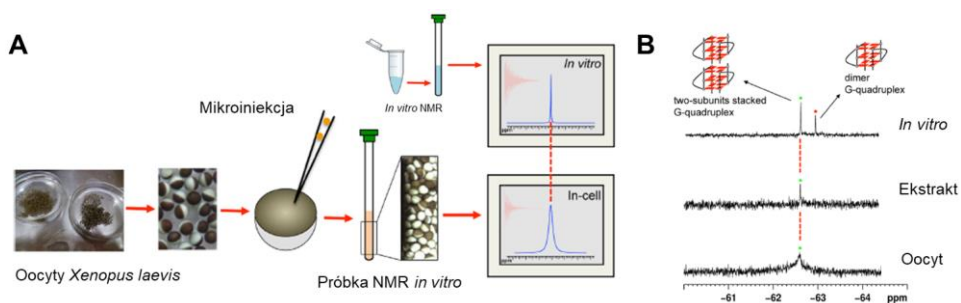
Rys. 1-32. Mechanizm działania sondy molekularnej wykorzystującej zjawisko PRE. Po lewej stronie struktura „molecular beacon”. Po prawej stronie zaprezentowano widma ^{19}F NMR. Od góry: widmo sondy molekularnej w strukturze „molecular beacon”, widmo ^{19}F NMR po dodaniu niekomplementarnej sekwencji oligonukleotydowej oraz widmo ^{19}F NMR po dodaniu sekwencji pasującej oraz przywrócenie sygnału ^{19}F NMR na skutek oddalenia się od siebie rodnika i znacznika fluorowego. Zaczerpnięto z pracy Dempsey i wsp. (110).

Do dobrze opisanych i ciekawych przykładów znaczników fluorowych można zaliczyć również modyfikację końca 5' oligonukleotydów grupą 3,5-bis-(trifluorometylo)fenylową (ONIII.3, ONIII.4.1) oraz (trifluorometoksy)fenylową (ONIII.4.2). Syntezy takich sond molekularnych dokonano z wykorzystaniem odpowiednich podjednostek amidofosforynowych włączanych na ostatnim cyklu syntezy kwasu nukleinowego na podłożu stałym (Rys. 1-33).



Rys. 1-33. Struktury amidofosforynów wykorzystanych do znakowania 5' końca oligonukleotydów RNA oraz DNA.

Znacznik fluorowy wbudowano do sekwencji RNA bogatej w guaniny zdolnej do tworzenia G-kwadrupleksów (ONIII.3). Metodą ^{19}F NMR monitorowano procesy tworzenia się struktur G-kwadrupleksów oraz oddziaływania G-kwadrupleksów z białkami oraz ligandami(114). Autorzy posunęli się o krok dalej, gdyż wykonali zestaw eksperymentów *in vitro* obejmujących identyfikację G-kwadrupleksów RNA oraz wyżej rzędowych G-kwadrupleksów (dwie podjednostki) w komórkach oocytów żaby *Xenopus* (115) (Rys. 1-34). Kolejna praca tej samej grupy badawczej opublikowana w 2020 roku (116) opisuje zastosowanie podobnych znaczników fluorowych, jednak położonych bliżej zasad azotowych (brak linkera, jedynie obecność jednej grupy fosforanowej). Dzięki temu możliwe było monitorowanie bardziej subtelnych zmian w strukturach oligonukleotydów. Sondę ONIII.4.1 oraz ONIII.4.2 wykorzystano do monitorowania tworzenia się G-kwadrupleksów DNA oraz RNA, jak i do monitorowania tworzenia się hybryd G-kwadrupleksów składających się z nici rybonukleotydu i deoksyrybonukleotydu. Badania wykonano również w komórkach HeLa (116).

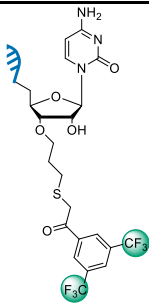
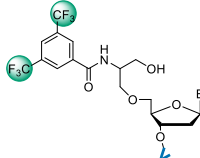
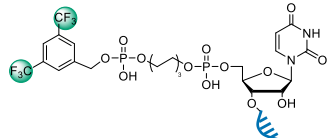
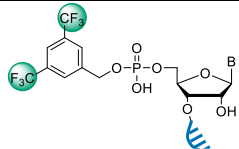
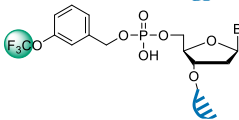
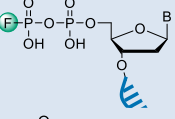
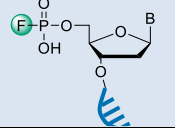


Rys. 1-34. A) Schemat eksperymentu *in vitro* identyfikacji struktur G-kwadrupleksów w komórkach oocytów za pomocą ^{19}F NMR. W eksperymentach wykorzystano sondę ONIII.3; B) Widma ^{19}F NMR uzyskane w trakcie eksperymentu. Rysunek wykonany na podstawie Bao i wsp. (115).

Do znaczników znajdujących się na 5' końcu nici oligonukleotydowej zaliczają się także grupy fluorofosforanowa i fluorodifosforanowa (FP oraz FPP), które są tematem niniejszej

rozprawy doktorskiej. Ich synteza oraz zastosowania jako sond molekularnych w badaniach ^{19}F NMR zostanie przedstawiona w rozdziałach opisujących wyniki badań własnych.

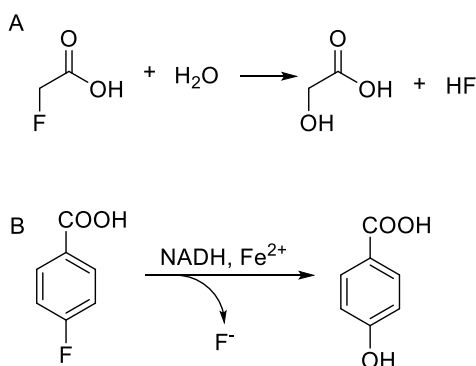
Tabela 1.6. Oligonukleotydy fluorowane na końcu 5' lub 3' nici. Oznaczenia: SPS – synteza na podłożu stałym, E – synteza enzymatyczna.

ON.	Fluorowana podjednostka	Typ k.n.	Metoda syntezy	Zastosowanie w badaniach ¹⁹ F NMR	Ref.
III.1		RNA	PM	- Sonda hybrydacyjna "molecular beacon"	(110)
III.2		DNA	SPS	- Sonda hybrydacyjna "molecular beacon"	(113)
III.3		RNA	SPS	- Zwijanie się G-kwadrupleksów - Oddziaływanie G-kwadrupleks-ligand	(114,115)
III.4.1		DNA/RNA	SPS	- Tworzenie hybryd G-kwadrupleksów DNA/RNA - Badania <i>in vitro</i> w komórkach HeLa	(116)
III.4.2					
FPPON		DNA	SPS/PM	Opisane w niniejszej rozprawie (wiele zastosowań)	(117,118)
FPON					

1.3 Wykorzystanie związków fluorowanych jako substratów reporterowych

1.3.1 Monitorowanie reakcji enzymatycznych za pomocą fluorescencji

Istnieje niewiele przykładów na biologiczną syntezę *de novo* związków fluoroorganicznych. Przyczyną tego może być m. in. bardzo silna solwatacja jonów fluorkowych w wodzie, przez co jest on trudno dostępny biochemicznie. Fluorowane związki organiczne są syntetyzowane przez bakterie z rodzaju *Streptomyces* oraz niektóre rośliny (119), a lista znanych naturalnych analogów zawierających fluor jest bardzo krótka i ogranicza się do około dwunastu cząsteczek (120). Stabilne chemicznie fluorowane związki mogą być aktywne biologicznie w środowisku komórkowym i mogą ulegać transformacjom do metabolitów, a w tym do jonów fluorkowych. Przykładami enzymatycznej hydrolizy wiązania C-F są: - przekształcenie przez dehalogenazę fluoroocetanową fluoroocetanu do glikolanu i jonów fluorkowych (121) (Rys. 1-35A); - przekształcenie przez dehalogenazę 4-fluorobenzoesanową 4-fluorobenzoesu do jonów fluorkowych i 4-hidroksibenzoesu (122) (Rys. 1-35B).

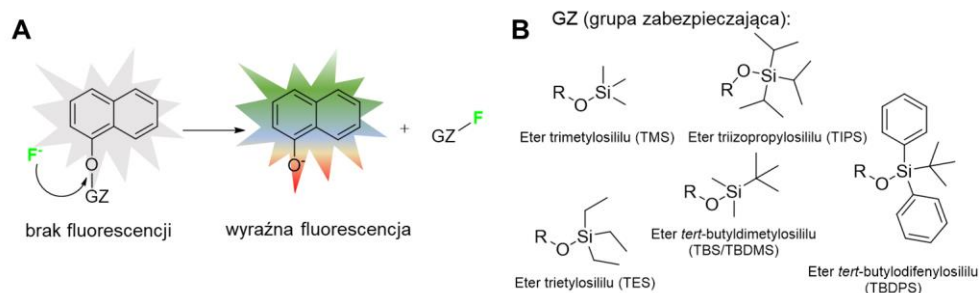


Rys. 1-35. Enzymatyczna hydroliza wiązania C-F.

Hydrolizie enzymatycznej ulegają także chemicznie otrzymane fluorowane związki (123), a wśród nich znajdują się analogi nukleotydów modyfikowane fluorem w łańcuchu fosforanowym takie jak AMPF, ADPF, ATPF, UMPF i GTPF (Tabela 1.8).

Fluorowane związki mogą być metabolizowane z uwolnieniem fluorków, a zjawisko to może zostać użyte do monitorowania tych przemian. Z tego powodu związki, które ulegają reakcjom enzymatycznym z uwolnieniem fluorków, są kolejnym rodzajem fluorowanych sond molekularnych. Obecnie stosowane metody oznaczania fluorków w roztworach wodnych i wodno-organicznych wykorzystują elektrody jonoselektywne (124), chromatografię jonowymienną (125) czy spektroskopię ¹⁹F NMR, jednak są one czasochłonne oraz wymagają

zastosowania zaawansowanej aparatury badawczej. Co więcej, ani metody NMR, ani elektrochemiczne nie pozwalają na miniaturyzację aparatury do takiego poziomu, aby umożliwić obserwowanie procesów biologicznych *in vivo*. Rozwiązaniem powyższych problemów jest zastosowanie metod kolorymetrycznych czy fluorescencyjnych, które charakteryzują się wysoką czułością z dolnym limitem detekcji na poziomie nanomoli oraz możliwością do wyznaczania ilości jonów fluorkowych w komórkach, co zostało omówione szeroko w pracy przeglądowej Zhou i wsp. (126). Jedną z grup sensorów fluorkowych opartą jest na reakcji chemicznej zachodzącej pomiędzy jonami fluorkowymi a kwasami Lewisa. Strategia tego podejścia obejmuje faworyzowaną fluorkami reakcję hydrolizy wiązania Si-O lub Si-C z utworzeniem wiązania Si-F, co wynika z dużej różnicy energii dysocjacji wiązań (odpowiednio 69, 103 oraz 147 kcal/mol²). Reakcje, w których tworzy się wiązanie krzem-fluor kosztem wiązań krzem-tlen i krzem-węgiel zachodzą szybko i nieodwracalnie. Etery siliłowe ($R_1R_2R_3Si-O-R_4$ gdzie R_{1-4} to grupa alkilowa lub aryłowa) są szeroko stosowane jako podstawniki blokujące grupy hydroksylowe w cząsteczkach o właściwościach fluorescencyjnych.



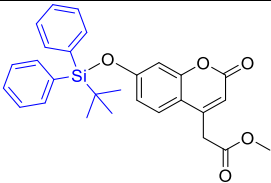
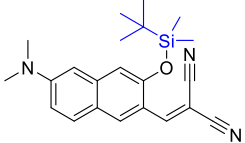
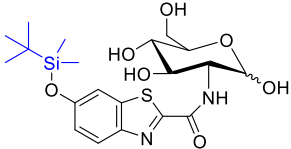
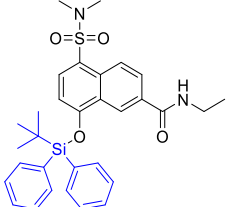
Rys. 1-36. A) Schematyczne przedstawienie działania fluorescencyjnych sond fluorogenicznych; B) Przykłady stosowanych grup zabezpieczających.

Mechanizm chemosensorów fluorescencyjnych opartych o wykorzystanie eterów siliłowych jest bardzo prosty. Związek z zablokowaną grupą hydroksylową nie wykazuje właściwości fluorescencyjnych (wynika to z braku obecności ładunku ujemnego na grupie hydroksylowej, co powoduje osłabienie sprzężenia elektronów π w układzie aromatycznym fluoroforu) lub właściwości te są zmienione, np. inna długość fali emisji promieniowania. W obecności fluorków dochodzi do ich reakcji z atomem krzemu. Wiązanie Si-O zostaje zerwane, grupa

² Luo, Y.-R. Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997

hydroksylowa zostaje uwolniona, a konsekwencją jest powrót właściwości fluorescencyjnych chemosensora (następuje odtworzenie sprzężonego układu elektronów π). Idea działania sensorów fluorkowych wraz ze strukturami najpopularniejszych eterów siliłowych została przedstawiona na Rys. 1-36. Sondy fluorkowe różnią się między sobą budową chemiczną, w której można wyróżnić fluorofor (grupę funkcyjną lub układ pierścieni aromatycznych zdolnych do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o określonej długości fali) oraz grupę zabezpieczającą. Różna struktura sondy wpływa na limit detekcji jonów fluorkowych, wymagany czas inkubacji z jonami, jak i rozpuszczalnik, w którym dochodzi do reakcji chemicznej. Reprezentatywne przykłady zebrano w Tabela 1.7.

Tabela 1.7. Przykłady sond czułych na jony fluorkowe.

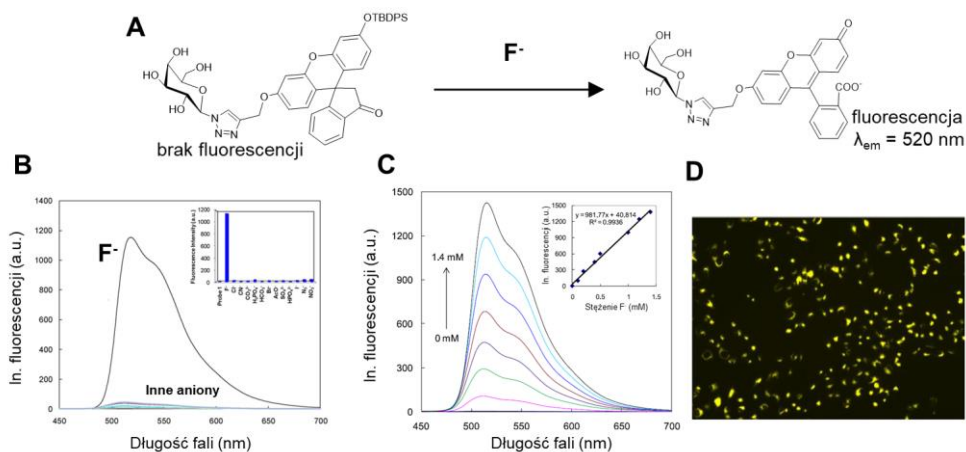
Struktura chemiczna sondy ^[a]	Dolny limit detekcji jonów fluorkowych	Czas ^[b]	Rozpuszczalnik	Referencja
	300 μ M	4h	HEPES ^[c]	Kim i wsp. (2009)(127)
	210 μ M	60 min	CH ₃ CN:HEPES (2:8)	Kim i wsp. (2012)(128)
	100 μ M	5 min	PBS ^[d]	Ke i wsp. (2013)(129)
	4 μ M	15 min	Dioksan:HEPES (1:1)	Zhou i wsp. (2015)(130)

^[a]niebieskim kolorem zaznaczono grupę zabezpieczającą hydroksyl, ^[b] czas potrzebny do reakcji fluorków z sondą;

^[c] HEPES - składnik buforujący ^[d] PBS - Sól fizjologiczna buforowana fosforanem.

Dobra sonda fluorogeniczna powinna spełniać kilka warunków i są to: - selektywność tylko wobec jonów fluorkowych, - rozpuszczalność sondy w warunkach wodnych lub z dodatkiem niewielkiej ilości fazy organicznej, - stabilność chemiczna sondy przez okres znacznie przekraczający czas trwania reakcji z fluorkami; - niski limit detekcji (wysoka czułość); -

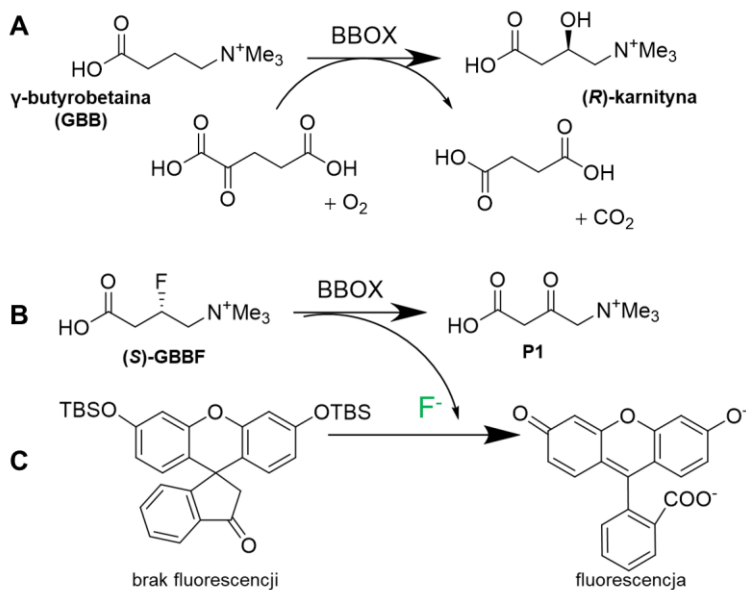
możliwość detekcji nie tylko organicznych soli fluorkowych (TBAF), ale przede wszystkim soli sodowych (NaF) oraz liniowa zależność fluorescencji od stężenia jonów fluorkowych w jak największym zakresie. Wydaje się, że wszystkie powyższe warunki spełnione zostały dla chemosensora, w którym fluoroformem była fluoresceina zabezpieczona grupą TBDPS (eter *tert*-butylo-difenylosililu). Zwiększoną rozpuszczalność w wodzie oraz biokompatybilność zapewniło połączenie fluoresceiny z heksozą poprzez łącznik triazolowy (131) (Rys. 1-37). Zaprojektowana sonda wykazała selektywność wobec jonów F^- , limit detekcji na poziomie 0,38 mg/L, a nawet możliwość detekcji zmian gołym okiem od stężenia jonów F^- 1,5 mg/L. Chemosensor wykorzystano do oznaczenia ilościowego fluorków w rzece Dongijang (Prowincja Guangdong, Chiny) oraz do obrazowania komórek HepG2 (komórki nowotworu wątrobowo komórkowego) (131).



Rys. 1-37. A) Reakcja chemosensora z jonami fluorkowymi; B) Selektywność. Widmo emisji fluorescencji sondy w obecności jonów F^- oraz innych anionów (Cl^- , CN^- , CO_3^{2-} , $H_2PO_4^{2-}$, HCO_3^- , Br^- , AcO^- , SO_4^{2-} , I^- , N_3^- oraz NO_3^-) w zakresie stężeń od 1,2 mM do 200 mM; B) Liniowa zależność intensywności fluorescencji od stężenia jonów F^- (0–1,4 mM NaF); C) Obraz fluorescencyjny komórek HepG2 po 1h inkubacji. $\lambda_{wz} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$. Rysunek wykonano na podstawie pracy Wei i wsp.(131)

Oznaczanie ilości jonów fluorkowych w mediach wodnych to nie jedyne zastosowanie chemosensorów fluorkowych. Sondy te z powodzeniem zastosowano do monitorowania postępu reakcji enzymatycznej, w której jednym z produktów są fluorki. Przykładem chemosensora użytego do monitorowania postępu hydrolizy enzymatycznej jest ponownie pochodna fluoresceiny. W badaniach opisanych przez Rydzik i wsp. (132) opracowano eksperyment wysokoprzepustowy oparty na detekcji jonów fluorkowych uwalnianych w trakcie enzymatycznej przemiany fluorowanego substratu z enzymem dioksygenazą

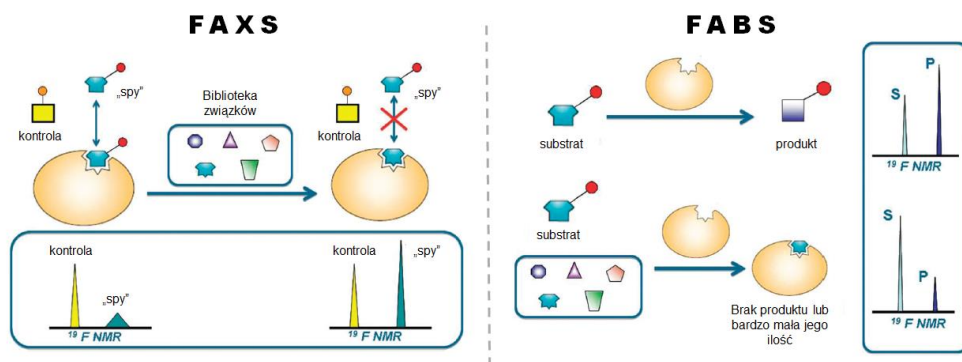
γ -butyrobetainy (BBOX) przy użyciu sondy *tert*-butylodimetylosililo-fluoresceiny. BBOX jest oksygenazą zależną od 2-oksoglutaranu (2OG) i katalizuje ostatni etap biosyntezy karnityny z γ -butyrobetainy (GBB) (Rys. 1-38A). BBOX jest ważna dla rozwoju klinicznie użytecznych inhibitorów oksygenaz zależnych od 2OG, ponieważ ich inhibicja może mieć efekty terapeutyczne. Przykładowo propionian 3-(2,2,2-trimetylohydrazyny) (THP), który jest używany w leczeniu anginy oraz stosowany w przypadku zawału mięśnia sercowego, oddziałuje z BBOX w komórkach (133,134). Badacze syntetycznie przygotowali fluorowe pochodne GBB, gdzie jedna z nich okazała się dobrym substratem dla BBOX i jest to pochodna kwasu butanowego (3S)-3-fluoro-4-(trimetyloaminy) ((S)-GBBF). W wyniku reakcji (S)-GBBF z BBOX następuje reakcja hydroksylacji do produktu P1 oraz uwolnienie jonów F^- (Rys. 1-38B), które w kolejnym etapie eksperymentu reagują z sondą fluorogeniczną i możliwy jest pomiar intensywności fluorescencji (Rys. 1-38C). Eksperyment zaadaptowano do formatu wysokoprzepustowego poszukiwania inhibitorów, tj. reakcje enzymatyczne i reakcje z sondą fluorogeniczną prowadzono na płytkach 96-dółkowych (132).



Rys. 1-38. A) Ostatni etap biosyntezy (*R*)-karnityny, w którym bierze udział enzym BBOX; B) Enzymatyczne przekształcenie nienaturalnego fluorowego substratu przez enzym BBOX; C) Reakcja powstałych fluorków z sondą fluorogeniczną.

1.3.2 Monitorowanie reakcji enzymatycznych metodą ^{19}F NMR

Wysokoprzepustowe metody badawcze HTS (ang. *High Throughput Screening*) są nieodłącznym etapem poszukiwania leków. Metody HTS umożliwiają identyfikację związków biologicznie czynnych, co oznacza wskazanie cząsteczki, która najsilniej oddziałuje, a tym samym wywiera największy wpływ na zadany obiekt terapeutyczny. Obiektem tym często są białka o aktywności katalitycznej (enzymy), dla których poszukuje się związków hamujących ich funkcję lub białka, które nie są enzymami, ale ich związanie się z lekiem indukuje zmiany w funkcjonowaniu komórek. Metody HTS oparte są często o bardzo czułe techniki pomiarowe, takie jak spektrofлуorymetria lub radiometria (135). Podejścia te napotykają jednak kilka problemów takich jak konieczność wprowadzenia dużego znacznika fluorescencyjnego, trudności w znakowaniu radioaktywnym i fluorescencyjnym cząsteczek biologicznych czy niebezpieczeństwa związane z radioaktywnością. Dlatego opracowywane są nowe, wydajne, szybsze i mniej inwazyjne (w kontekście wpływu na oddziaływania międzycząsteczkowe) metody, a jedną z nich jest zastosowanie spektroskopii ^{19}F NMR. Spektroskopia ^{19}F NMR umożliwia badanie zarówno oddziaływań międzycząsteczkowych jak i śledzenie procesów biochemicznych, co opisywane jest przez dwie oddzielne metody badawcze. Pierwszą metodą jest FAXS (136) (ang. *fluorine chemical shift anisotropy and exchange for screening*), a drugą FABS (137) (ang. *fluorine atoms for biochemical screening*). Obie metody są wykorzystywane do screeningu opartego o ligandy, screeningu funkcjonalnego oraz screeningu bibliotek związków (138).



Rys. 1-39. Schematyczne przedstawienie metody FAXS i FABS.

FAXS to metoda oparta o zjawisko, w którym badana cząsteczka wypiera ligand z jego białkowego kompleksu na zasadzie konkurencji o miejsce wiązania. W tym celu wykorzystuje się dwie molekuly wyznakowane atomem/atomami fluoru. Pierwsza z nich to tzw. cząsteczka

reporterowa (ang. *spy molecule*), która posiada słabe powinowactwo do badanego białka oraz druga, która pełni funkcję cząsteczki kontrolnej i nie posiada powinowactwa do badanego białka (Rys. 1-39). Po związaniu się z białkiem szerokość linii sygnału ^{19}F NMR cząsteczki reporterowej zwiększa się. Zmiana szerokości połówkowej sygnału ($W_{1/2}$) związana jest ze skróceniem czasu relaksacji T_2 (czas relaksacji magnetyzacji poprzecznej):

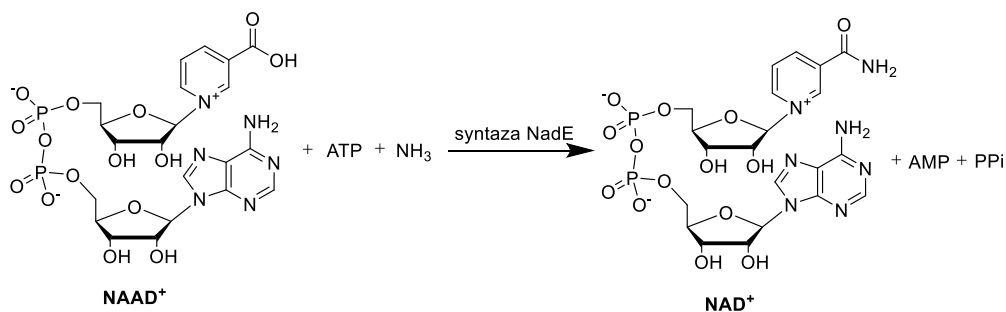
$$W_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2} \quad (1.3.1)$$

Zgodnie z równaniem 1.3.1, dla T_2 wyrażanego w sekundach, szerokość połówkowa sygnału jest odwrotnie proporcjonalna do czasu relaksacji spin-spin (T_2). Znaczne skrócenie czasu relaksacji poprzecznej występuje, gdy rezonujące jądra zmieniają periodycznie swoją częstość Larmora, a zmiana tej częstości wynika z procesów wewnątrzcząsteczkowych takich jak przeniesienie protonu, zmiana konformacji czy tautomeria walencyjna³. Dlatego sygnały dużych makromolekuł (lub ligandów, które są z nimi związane), w których prawdopodobieństwo występowania tych procesów jest większe, będą znacznie poszerzone w porównaniu z sygnałami małocząsteczkowych ligandów w roztworze bez białek. Zasada ta stosowana jest nie tylko do monitorowania oddziaływania białko-ligand, ale także kwas nukleinowy-białko lub kwas nukleinowy-ligand. W typowym eksperymencie FAXS do badanego roztworu, który zawiera badany cel (białko), molekułę kontrolną i reporterową dodaje się innego związku (pochodzącego np. z biblioteki związków o potencjalnych właściwościach inhibitorowych). Jeżeli badany związek ma powinowactwo do białka, wypiera on cząsteczkę reporterową, a na widmie ^{19}F NMR obserwujemy wzrost intensywności jej sygnału. Badane ligandy nie muszą być znakowane atomem fluoru.

Metoda FABS może być stosowana w przypadku białek, które wykazują aktywność enzymatyczną i oparta jest na ocenie postępu reakcji enzymatycznej metodą ^{19}F NMR. Do przeprowadzenia eksperymentu FABS wymagany jest związek wyznakowany fluorem, który jest substratem dla badanego enzymu. W wyniku reakcji enzymatycznej powstający produkt ma odmienną strukturę chemiczną od substratu, a otoczenie chemiczne wokół atomu fluoru zmienia się, co w konsekwencji możemy obserwować na widmie ^{19}F NMR poprzez pojawienie się sygnału od produktu reakcji o innym przesunięciu chemicznym niż substrat (Rys. 1-39). Metoda ta może być stosowana do badania przesiewowego inhibitorów reakcji

³ Günther, Harald "NMR Spectroscopy Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry"

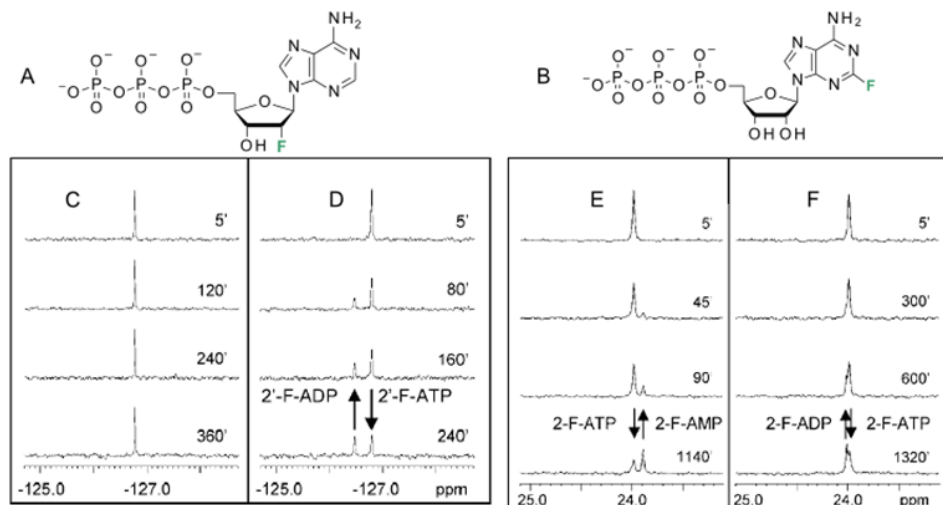
enzymatycznych, które mogą mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne jako leki hamujące procesy chorobotwórcze. Obie przedstawione metody są do siebie podobne, jednak metoda FAXS umożliwia badanie wszystkich białek, dla których znany jest fluorowany ligand, natomiast w metodzie FABS dodatkowo niezbędna jest aktywność enzymatyczna badanego białka.



Rys. 1-40. Reakcja enzymatyczna przekształcenia NAAD⁺ w NAD⁺. PPi - difosforan

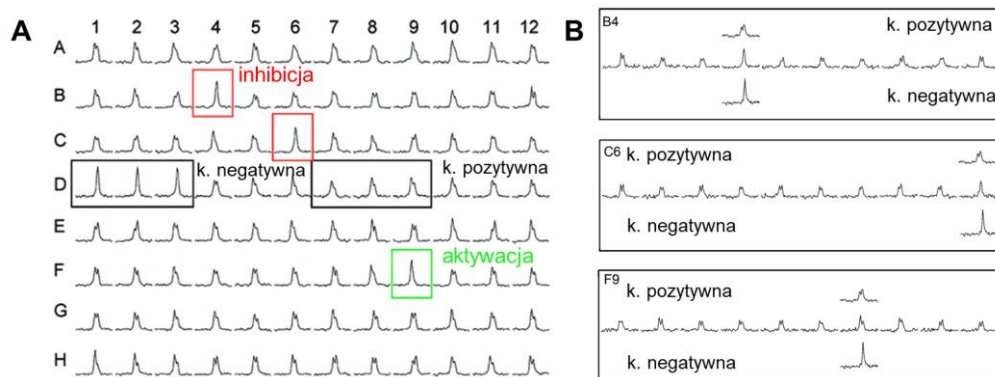
Metodę FABS wielokrotnie stosowano do poszukiwania inhibitorów reakcji enzymatycznych. Przykładami są zastosowania związków fluorowanych jako sond molekularnych z wykorzystaniem metody ¹⁹F NMR (139,140). Swoje zastosowanie w tej dziedzinie znalazły również nukleotydy. Syntaza dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NadE) katalizuje zależną od adenozyntrifosforanu (ATP) reakcję przekształcenia dinukleotydu adeninowego kwasu nikotynowego (NAAD⁺) do jego amidu, tj. dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺) (141) (Rys. 1-40). W trakcie tej reakcji ATP przekształcany jest do AMP oraz nieorganicznego difosforanu (PPi). W jednej z prac podjęto się opracowania metody poszukiwania inhibitorów tej reakcji enzymatycznej i innych reakcji wykorzystujących ATP jako źródło energii, w oparciu o fluorowane substraty i technikę ¹⁹F NMR (142). Pierwszą zbadaną sondą był analog ATP zawierający fluor w pozycji 2' rybozy (2'-F-ATP, Rys. 1-41A). Jak zaprezentowano na Rys. 1-41C sygnał na widmie ¹⁹F NMR pochodzący od 2'-F-ATP nie zmieniał się, co oznacza, że wprowadzona modyfikacja nie była akceptowana przez syntazę NadE i związek nie ulegał hydrolizie. Użyteczność 2'-F-ATP jako sondy molekularnej zaprezentowano na przykładzie innego enzymu, tj. kinazy PDK1 (kinazy katalizują reakcję przeniesienia grupy fosforanowej ze związku wysokoenergetycznego, np. ATP na docelowy substrat), która przekształcała trifosforan nukleozydu do 2'-F-ADP, a cały proces monitorowano w czasie metodą ¹⁹F NMR na podstawie zmieniającej się intensywności sygnałów substratu i produktu oraz ich różnego przesunięcia chemicznego (Rys. 1-41D). Drugą zbadaną sondą był analog ATP z atomem fluoru w pozycji 2 adeniny, 2F-ATP (Rys. 1-41B). 2F-ATP okazał się substratem

zarówno dla NadE, jak i PDK1. Ponownie proces hydrolizy substratu monitorowano techniką ^{19}F NMR na podstawie różnic w przesunięciach chemicznych sygnałów 2F-ATP i 2F-AMP (Rys. 1-41E, reakcja z NadE) oraz 2F-ATP i 2F-ADP (Rys. 1-41F, reakcja z PDK1).



Rys. 1-41. Fluorowane analogi ATP jako sondy molekularne w badaniach metodą ^{19}F NMR (142). A) Analog 2'-F-ATP, B) Analog 2F-ATP, C) Reakcja 2'-F-ATP z NadE, D) Reakcja 2'-F-ATP z PDK1, E) Reakcja 2F-ATP z NadE, F) Reakcja 2F-ATP z PDK1. Rysunek zaczerpnięty z pracy Stockman i wsp. (142).

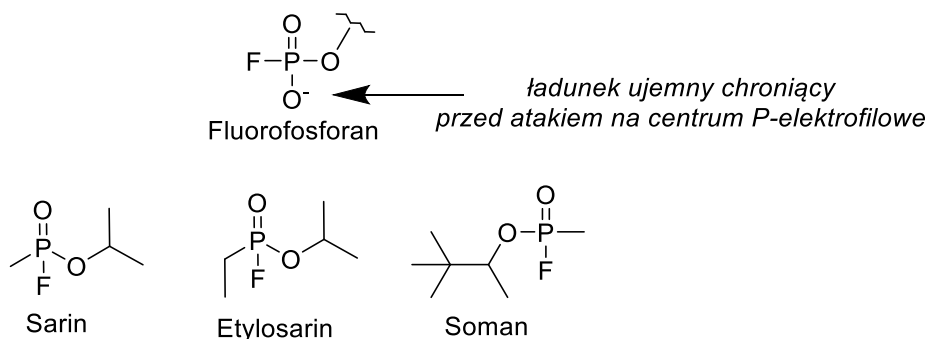
Następnie 2F-ATP wykorzystano jako sondę molekularną do identyfikacji inhibitorów kinazy PDK1. Zbadano bibliotekę związków składającą się z 900 cząsteczek. Eksperyment wykonano na płytce 96-dołkowej. W każdym z 90 dołków znajdowały się mieszaniny 10 cząsteczek, 2F-ATP, PDK1 oraz bufor. Dodatkowo przeprowadzono 3 kontrole negatywne (dezaktywowany enzym) oraz 3 kontrole pozytywne (reakcje bez inhibitorów), a dla tych drugich poziom przereagowania 2F-ATP do 2F-ADP wyniósł około 60%. Po wygaszeniu reakcji, mieszaniny przenoszono do probówek NMR i rejestrowano widma ^{19}F NMR. Przebieg reakcji określano na podstawie stosunku sygnałów (pól powierzchni) cząsteczek reporterowych. Dla reakcji, w których nie zaobserwowano hydrolizy substratu stwierdzano inhibicję procesu, a dla reakcji, w których substrat uległ całkowitemu przekształceniu stwierdzano aktywację (Rys. 1-42A). W ten sposób zawężono liczbę potencjalnie aktywnych cząsteczek z 900 do 30. Aby zidentyfikować, który związek jest inhibitorem, a który aktywatorem przeprowadzono 30 oddzielnych reakcji enzymatycznych, które również analizowano metodą ^{19}F NMR, co ostatecznie pozwoliło na zidentyfikowanie dwóch inhibitorów oraz jednego aktywatora (Rys. 1-42B).



Rys. 1-42. A) Wynik ^{19}F NMR badania przesiewowego 900 cząsteczek jako potencjalnych inhibitorów kinazy PDK1. B) Wyniki ^{19}F NMR reakcji enzymatycznych z pojedynczymi cząsteczkami wyselekcjonowanymi na podstawie eksperymentu przesiewowego. Badane związki wchodziły w skład mikstur cząsteczek będących w dołkach B4, C6 oraz F9. Rysunek zaczerpnięto z pracy Stockman i wsp. (142).

1.4 Fluorofosforan jako modyfikacja grupy fosforanowej

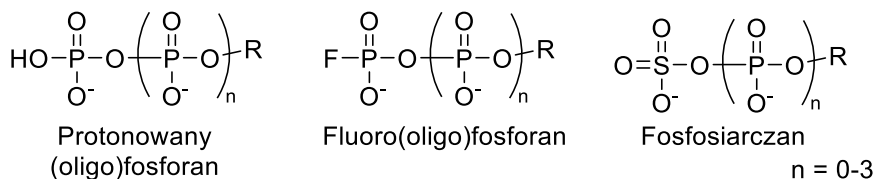
Aniony fluorofosforanowe są jednymi z analogów anionów fosforanowych i są ugrupowaniami stabilnymi chemicznie. Niemniej jednak, wiązanie P-F często kojarzone jest z wysoką niestabilnością i podatnością na substitucję, co jest prawdziwe w przypadku związków pozbawionych ładunku ujemnego w modyfikowanej reszcie fosforanowej, np. diestrów fluorofosforanowych czy monoestrów fluorofosfonianowych. Zamaskowanie ładunków ujemnych wokół atomu fosforu znacząco zwiększa jego elektrofilowość. Pochodne tego typu natychmiast reagują z nukleofilami, np. grupą hydroksylową znajdującą się w centrum aktywnym acetylocholiny (seryna), tworząc wiązanie kowalencyjne, co w konsekwencji prowadzi do blokady funkcji acetylocholinoesterazy i paraliżu funkcji komórek (143). Związki fosfonianowe zawierające wiązanie P-F takie jak sarin, etylosarin czy soman były stosowane jako gazy bojowe (Rys. 1-43).



Rys. 1-43. Różnice w budowie strukturalnej pomiędzy stabilnym chemicznie fluorofosforanem a reaktywnymi związkami fluorofosforanowymi.

W przypadku fluorofosforanu sytuacja jest wręcz odwrotna. Obecność ujemnie naładowanego atomu tlenu bezpośrednio związanego z atomem fosforu prowadzi do zmniejszenia elektrofilowości atomu fosforu oraz odpycha elektrostatycznie potencjalne nukleofile, czyniąc wiązanie P-F znacznie mniej reaktywnym. W trakcie kilkuletniej pracy z tymi związkami nie zauważyłem braku stabilności chemicznej 5'-fluorofosforanów nukleozydów, zarówno w wodzie, jak i w buforach o różnym pH. Wprowadzenie atomu fluoru w obręb terminalnego fosforanu tworzy analog, który jest izostrukuralny i izoelektronowy w stosunku do niemodyfikowanych nukleotydów. Fluor zastępuje ujemnie naładowany atom tlenu, przez co fluorofosforan przyjmuje mniejszy ładunek wypadkowy w fizjologicznym pH, a tym samym powinowactwo do kationów dwuwartościowych metali jest mniejsze. W rezultacie, 5'-fluorofosforanowe analogi nukleotydów mogą być rozważane jako mimiki protonowanych

5'-(oligo)fosforanów lub 5'-fosfosiarczanów i mogą stać się nukleotydowymi substratami dla enzymów rozpoznających te grupy związków (Rys. 1-44).

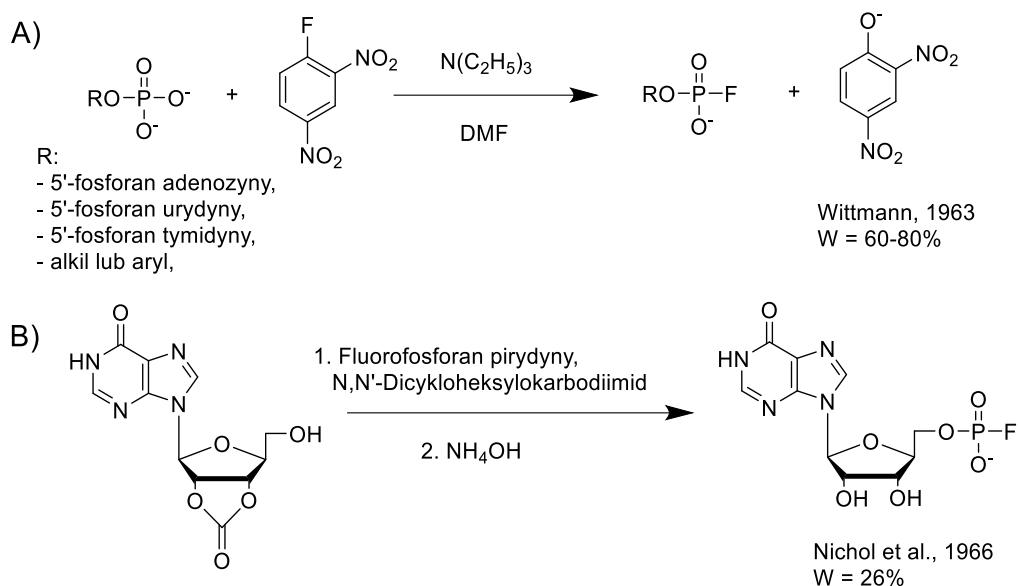


Rys. 1-44. Porównanie struktury łańcucha fluorofosforanowego nukleotydów i związków pokrewnych strukturalnie występujących w przyrodzie. R odnosi się do 5'-nukleozydu.

Jedną z konsekwencji wprowadzenia fluoru w obręb fosforanu jest zabranie jednego ładunku ujemnego z cząsteczki, lecz jednocześnie zostaje wprowadzony atom o największej elektroujemności. Wysoka elektroujemność atomu fluoru oraz obecność trzech wolnych par elektronowych na powłokach walencyjnych powoduje powstanie efektów elektronowych w cząsteczce, w skład której wchodzi fluor (144). Wysoka elektroujemność tego atomu powoduje bardzo silny efekt indukcyjny kierowania gęstości elektronowej ku sobie, co sprzyja tworzeniu wiązania typu sigma, σ . Energia wiązania między fluorem a fosforem wynosi -439 kJ/mol i jest to wyjątkowo silne wiązanie, biorąc pod uwagę jego pojedynczy charakter. Wpływ na dużą energię potrzebną do rozerwania wiązania chemicznego P-F można wytłumaczyć charakterem zwrotnym/redonorowym wiązania (ang. *back bonding*), w którym elektrony π fluoru skierowane są w stronę pustych orbitali *d* atomu fosforu (145). Efektem wiązania zwrotnego zawsze jest zwiększenie rzędu oraz wzmocnienie i zmniejszenie długości wiązania pomiędzy atomami. W kontekście biologicznym znaczenie ma też rozmiar fluoru. Jego promień van der Waalsa wynosi 1,35 Å (według Paulinga), co plasuje fluor pomiędzy atomem wodoru (1,20 Å) a atomem tlenu (1,40 Å) (146), dlatego obecność fluoru w fosforanie nie powoduje dodatkowych zawałd sterycznych. Ponadto, modyfikowany fluorofosforanem nukleotyd może wciąż być zaangażowany w oddziaływania hydrofilowe z wodą, które są kluczowe w przekształceniach enzymatycznych biomolekuł, włączając w to zdolność fluoru do tworzenia wiązań wodorowych (147). W dalszych podrozdziałach zostaną omówione przykłady enzymów, które akceptują 5'-fluorofosforanowe analogi nukleotydów jako substraty.

1.5 Metody syntezy fluorofosforanowych analogów nukleotydów

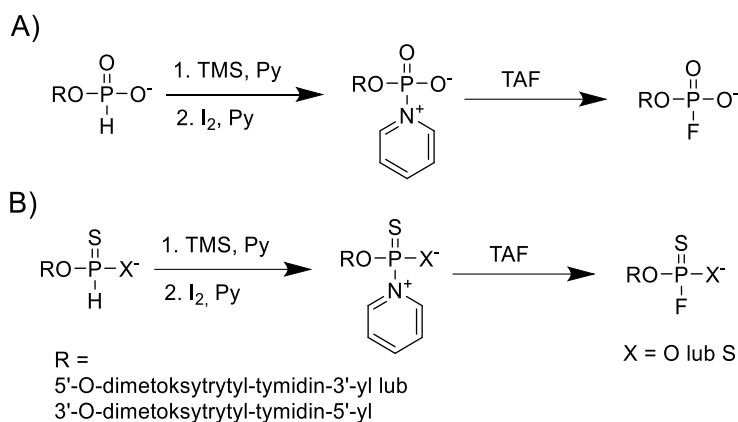
Znanych jest kilka podejść syntetycznych umożliwiających otrzymanie 5'-fluorofosforanów nukleozydów. Najwcześniejszy przykład został opisany na początku lat 60-tych ubiegłego wieku przez Wittmanna (148). Metoda ta polega na fluorowaniu 5'-fosforanów nukleozydów za pomocą 2,4-dinitrofluorobenzenu w obecności tributyloaminy w DMF (Schemat 1-3A). Innym przykładem jest kondensacja 2',3'-cyklicznych nukleozydów z fluorofosforanem pirydyny w obecności N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (149) (Schemat 1-3B). Metodą tą otrzymano 5'-fluorofosforan inozyny z wydajnością 26%. Kolejna metoda umożliwiająca otrzymywanie 5'-fluorofosforanów takich związków jak 3'-azydo-3'-deoksytymidyna, 3'-fluoro-3'-deoksytymidyna oraz 3'-deoksytymidyna w skali gramowej, polega na reakcji nukleozydów z kwasem fluorofosforowym w obecności chlorku 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonylu (150).



Schemat 1-3. A) i B) Przykładowe metody syntezy 5'-fluorofosforanowych nukleozydów.

Do prostych i wydajnych metod syntezy można zaliczyć utlenianie monoestrów H-fosfonianów (III) nukleozydów za pomocą roztworu jodu w pirydynie. W pierwszym etapie reakcji tworzy się addukt pomiędzy fosforanem (V) i pirydyną, a następnie w obecności nukleofilowego trihydrofluorku trietyloaminy (TAF) powstaje fluorofosforan. Takie podejście pozwoliło na wydajną syntezę 5'- oraz 3'-fluorofosforanów nukleozydów (Schemat 1-4A), a wykorzystanie jako substratu H-tiofosfonianu nukleozydu umożliwiło otrzymanie

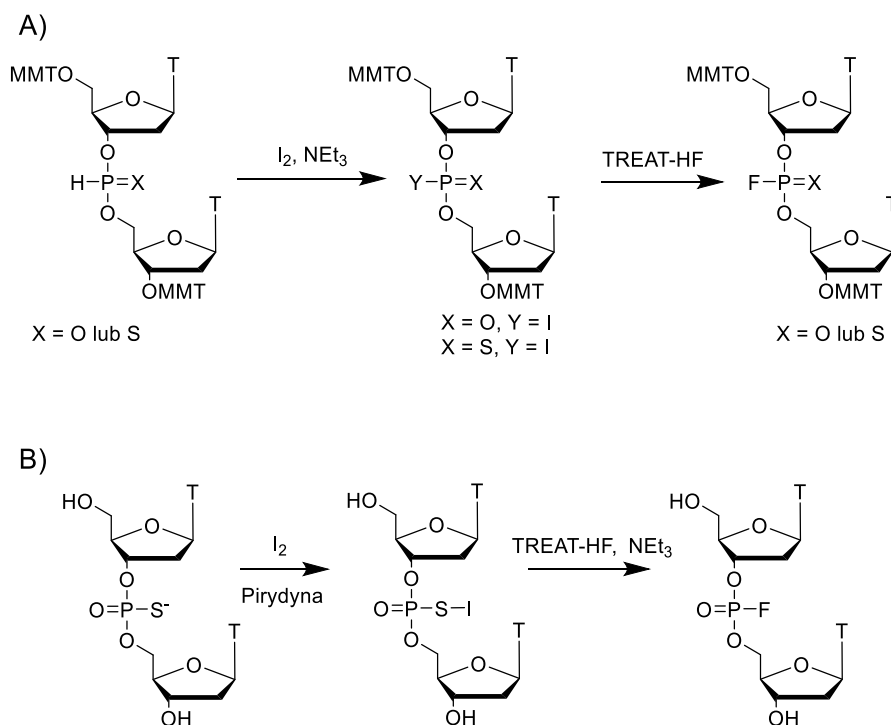
ugrupowania fluoro(tio)fosforanowego (151,152) (Schemat 1-4B). Uzyskanie fluorowanego produktu zostało potwierdzone metodami NMR, a w szczególności ^{31}P NMR, gdzie na zarejestrowanych widmach porównano położenia sygnałów oraz ich strukturę subtelną. Atom fosforu obecny w substracie H-fosfonianowym charakteryzował się przesunięciem chemicznym $\delta_{\text{P}} = 2,99$ ppm oraz stałą sprzężenia spinowo-spinowego $^1J_{\text{H-P}} = 613$ Hz (dublet), natomiast zmiana stopnia utlenienia atomu fosforu wraz z wprowadzeniem atomu fluoru przesunęła sygnał na widmie do wartości $\delta_{\text{P}} = -6,28$ ppm (dublet; $^1J_{\text{F-P}} = 930$ Hz). Również dla analogu fluoro(tio)fosforanowego zaobserwowano zmianę przesunięcia chemicznego ($\delta_{\text{P}} = 55,12$ ppm) i stałej sprzężenia ($^1J_{\text{F-P}} = 1049$ Hz (dublet)).



Schemat 1-4. A) Otrzymanie fluorofosforanu nukleozydu poprzez utlenianie H-fosfonianu jodem w pirydynie w obecności TAF. Grupa TMS została wykorzystana do zamaskowania ładunku ujemnego na atomie tlenu, zwiększając tym samym reaktywność fosfoestru. B) Modyfikacja syntezy przedstawionej w punkcie A), która prowadzi do analogów fluoro(tio)fosforanowych.

Podobne podejście syntetyczne wykorzystano w syntezie dinukleotydów zawierających ugrupowanie fluorofosforanowe. Substratem wyjściowym były diestry H-fosfonianowe zawierające atom tlenu lub siarki. Podobnie jak w powyższych przykładach, H-fosfoniany ulegały wydajnej reakcji utleniania w obecności jodu i trietyloaminy. Utworzony związek pośredni, diester jodofosforanowy lub jodotiofosforanowy, reagował wydajnie z nukleofilowym trihydrofluorkiem trietyloaminy z utworzeniem kolejno diestru fluorofosforanowego lub diestru fluoro(tio)fosforanowego (Schemat 1-5A) (153). Kolejnymi etapami przekształcania związków przedstawionych na Schemat 1-5A jest usuwanie grup ochronnych z zasad azotowych nukleotydów poprzez długotrwałe traktowanie wodnym roztworem amoniaku. Wiązanie P-F w analogach diestrów fosforanowych (w przeciwieństwie do monoestrów) jest wiązaniem dość labilnym chemicznie, więc fluor może ulec reakcji

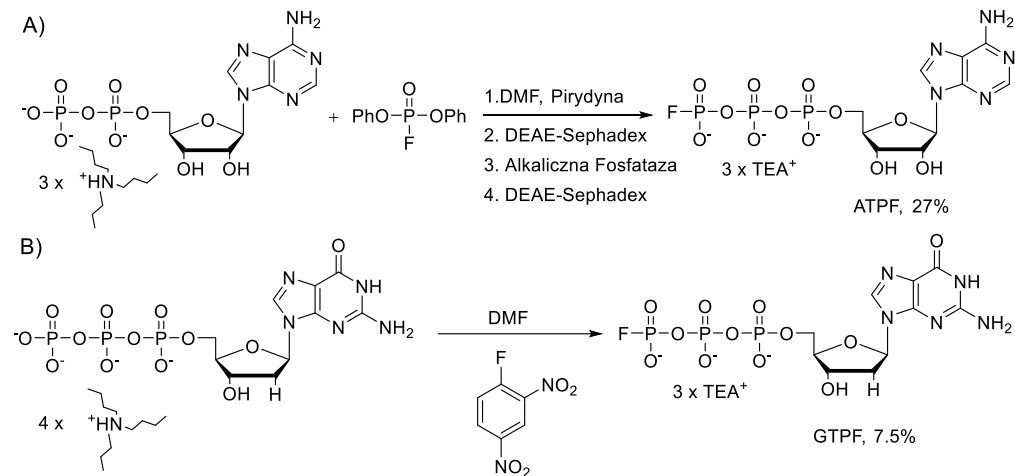
substytucji nukleofilowej w trakcie procesu odbezpieczania. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie labilnych grup ochronnych lub zmodyfikowanie ścieżki syntezy. Dobrym rozwiązaniem okazała się synteza stabilnego chemicznie dinukleotydu zawierającego ugrupowania tiofosforanowe lub seleniofosforanowe, w których zarówno atom siarki, jak i selenu znajdował się w pozycji niemostrkowej. Utworzenie fluorofosforanu było możliwe na skutek chemoselektywnej reakcji siarki (lub selenu) z jodem z prawdopodobnym utworzeniem produktu przejściowego jodku oksafosforanosulfenylu (lub oksafosforanoselenylu), który kolejno ulegał substytucji nukleofilowej na atomie fosforu (Schemat 1-5B) (154,155).



Schemat 1-5. Synteza dinukleotydów posiadających diestrowe ugrupowanie fosforanowe lub fosforo(tio)lanowe. A) Metoda wykorzystująca utlenianie H-fosfonianu; B) Otrzymywanie fluorofosforanu ze stabilnego chemicznie fosforo(tio)lanu. MMT – monometoksytrytyl, TAF – trihydrofluorek trietylaominy.

Znane są także przykłady syntezy fluorofosforanowych pochodnych nukleotydów z wydłużonym mostkiem fosforanowym. 5'-Fluorotrifosforan adenozyiny (ATPF) po raz pierwszy otrzymano w wyniku reakcji 5'-difosforanu adenozyiny z P¹-difenylu-P²-fluoropirofosforanem z wydajnością 30% (156) (Schemat 1-6A). Do otrzymania

5'-fluorotrifosforanu guanozyny (GTPF) wykorzystano 2,4-dinitrofluorobenzen (odczynnik Sangera), który przereagowano z solą trietyloamoniową GTP w obecności tributylaminy, jednak wydajność izolowanego produktu nie przekroczyła 10% (157) (Schemat 1-6B).



Schemat 1-6. A) Synteza 5'-fluorotrifosforanu adenozyiny (ATPF) i B) synteza 5'-fluorotrifosforanu guanozyiny (GTPF).

1.6 Enzymy akceptujące fluorofosforan jako substrat

Obiektami badań niniejszej pracy były enzymy, których rola w komórkach ściśle powiązana jest z metabolizmem nukleotydów i kwasów nukleinowych. Niedobory tych białek lub ich nadaktywność często prowadzą do różnego rodzaju schorzeń, dlatego są one ciągłym obiektem badań, a małowcząsteczkowe związki pełniące rolę inhibitorów są pożądane jako potencjalne terapeutyki. Niektóre białka hydrolizujące nukleotydy mają także zdolność do hydrolizowania ich fluorofosforanowych analogów. Tabela 1.8 podsumowuje znane enzymy, które akceptują modyfikację fluorofosforanową w nukleotydach. Natomiast w poniższych podrozdziałach zostały opisane białka, do których będę odnosił się w wynikach badań własnych i są to fosfodiesteraza z jadu węża (PDE-I), ludzki enzym dekapujący DcpS oraz ludzki i roślinny enzym Fhit.

Tabela 1.8. Zestawienie enzymów akceptujących modyfikację fluorofosforanową w nukleotydach.

Związek	Enzym	Funkcja enzymu	Aktywność	Ref.
ATPF AMPF	Fosfodiesteraza z jadu węża (PDE-I)	Egzonukleolityczna degradacja nukleotydów na 3' końcu; hydroliza 5'-oligofosforanów nukleotydów do 5'-monofosforanów	Rozcinanie do AMP i PPF Rozcinanie do AMP i fluorku	(156)
ATPF	Polimeraza RNA zależna od DNA u <i>E.coli</i>	Polimeryzacja RNA na matrycy DNA	Substrat w transkrypcji odcinków poli d(A-T) jako analog ATP	(158)
ATPF AMPF	Fhit (ludzki lub <i>Arabidopsis thaliana</i>)	Pirofosfataza z rodziny HIT; Hydrolaza Ap ₃ A; ludzkie białko Fhit jest supresorem nowotworowym	Rozcinanie do AMP i PPF Rozcinanie do AMP i fluorków	(159)
AMPF	Różne białka z rodziny HIT z roślin i zwierząt: hFhit, AtFhit, Tb-HIT45, AtHint1, EChinT, i AtAptx	Różne hydrolazy z rodziny HIT. Aptx usuwa AMP z uszkodzonych hybryd DNA-RNA; Mutacje w ludzkim genie <i>APT</i> X są wynikiem ataksji; białko Hint1 jest supresorem nowotworowym	Rozcinanie do AMP i fluorków z różnymi wydajnościami	(160)
UMPF	Fosfataza alkaliczna i fosfataza kwaśna 5'-nukleotydaza	Hydrolizuje 5'-monofosforany nukleotydów do nukleozydu i ortofosforanu	Odporny na działanie enzymów Hydroliza do urydyny	(161)

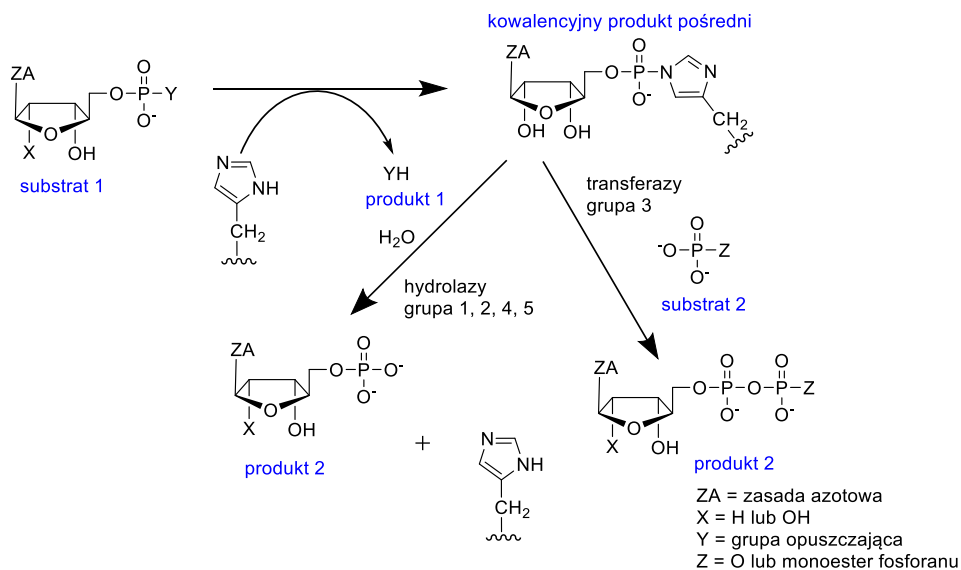
ADPF	Kinaza adenozy- nosfosiarczanowa (ATP:APS 3'- fosfotransferaza)	Synteza 5'-fosfosiarczanu 3'- fosfoadenozyny (PAPS, źródło „aktywnego siarczanu” w komórce) z 5'-fosfosiarczanu adenozyny (APS)	Jest substratem, z którego powstaje PADPPF, analog PAPS.	(162)
5'- fluorofos- foran AZT	odwrotna transkryptaza HIV; fosfodiesteraza obecna w ekstraktach komórkowych	Synteza DNA HIV na matrycy RNA Hydroliza wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych nukleotydów	Inhibuje replikację wirusa HIV, aktywnym związkiem jest AZT- MP uwalniany z AZT-MPF przez komórkową fosfodiesterazę	(163)
GTPF	Ras, białko wiążące GTP	Zaangażowane w transdukcję sygnałową; hydroliza GTP do GDP	Ras-katalizowana hydroliza GTPF, jest prawie tak samo szybka jak dla GTP	(157)

1.6.1 Fosfodiesteraza z jadu węża I (PDE-I)

Fosfodiesteraza (PDE-I) z jadu grzechotnika diamentowego (*Crotalus adamanteus*) jest enzymem modelowym wykorzystywanym do opracowywania enzymatycznych metod wysokoprzepustowych i badania białek z grupy fosfodiesteraz oraz pirofosfataz. PDE-I jest hydrolazą, która oligonukleotydowe substraty przekształca w 5'-monofosforany nukleotydów. Egzonukleaza ta hydrolizuje zarówno cząsteczki DNA, jak i RNA od ich końca 3', ale jest również zdolna do hydrolizy 5'-difosforanów (NDP) oraz 5'-trifosforanów nukleotydów (NTP). W literaturze odnaleźć można przykłady pokazujące, że PDE-I akceptuje jako substraty różnego rodzaju nukleotydy i ich analogi, m.in. ATP, cAMP czy fosforan bis-*p*-nitrofenylu (164). Aktywność PDE-I jest zależna od jonów dwuwartościowych metali takich jak magnez czy wapń i jest całkowicie hamowana w obecności EDTA, który chelatując jony metali dezaktywuje enzym.

1.6.2 Białka z rodziny HIT

Grupa białek z rodziny triad histydynowych (HIT, ang. *Histidine Triad Proteins*) to wewnątrzkomórkowe, przeważnie dimeryczne enzymy, których centra katalityczne wiążą grupy fosforanowe nukleotydów oraz oligonukleotydów (165). Do rodziny białek HIT zaliczanych jest pięć enzymów, spośród których cztery z nich to fosfohydrolazy: HINT (ang. *Histidine triad nucleotide-binding protein*), Fhit (ang. *Fragile histidine triad protein*), Aprataksyna oraz enzym DcpS (ang. *scavenger decapping protein*). Każdy z enzymów po związaniu substratu tworzy kowalencyjny produkt pośredni, przy czym wiązanie to tworzy się pomiędzy grupą fosforanową substratu a środkową (drugą) grupą histydynową obecną w charakterystycznym dla tej rodziny białek motywie. Motyw HIT, His- ϕ -His- ϕ -His- ϕ - ϕ (gdzie ϕ to aminokwas hydrofobowy) pełni rolę centrum katalitycznego, atakując fosforan α substratu z uwolnieniem grupy odchodzącej (Rys. 1-45). Piątym enzymem zaliczanym do białek HIT jest transferaza przeniesienia grupy fosforanowej GALT (ang. *Galactose-1-phosphate uridylyltransferase*) (Tabela 1.9).



Rys. 1-45. Ogólny mechanizm hydrolizy substratów przez enzymy z rodziny HIT. W pierwszym etapie enzymy tworzą z substratem kowalencyjny produkt pośredni z uwolnieniem grupy opuszczającej Y (szczegółowe przykłady znajdują się w Tabeli 1.9). Dla hydrolaz produkt pośredni jest hydrolizowany do 5'-monofosforanu nukleozydu, natomiast w przypadku transferaz 5'-monofosforanowy nukleozyd przenoszony jest na substrat 2 zawierający grupę fosforanową.

Tabela 1.9. Zestawienie fosfohydrolaz i fosfotransferaz rodziny białek HIT ze względu na substraty.
Tabela wykonana na podstawie Brenner, 2014 (166)

Grupa	Enzym	Substrat 1	Substrat 2	Grupa opuszczająca Y (produkt 1)	Produkt 2
1	HINT	AMP-lizyna	woda	lizyna	AMP
2	Fhit	ApppA	woda	ADP	AMP
3	GALT	UDP-Glc	Gal-1-P	Glc-1-P	UDP-Gal
4	Aprataksyna	AppDNA	woda	pDNA	AMP
5	DcpS	m ⁷ GpppN	woda	ppN	m ⁷ GMP

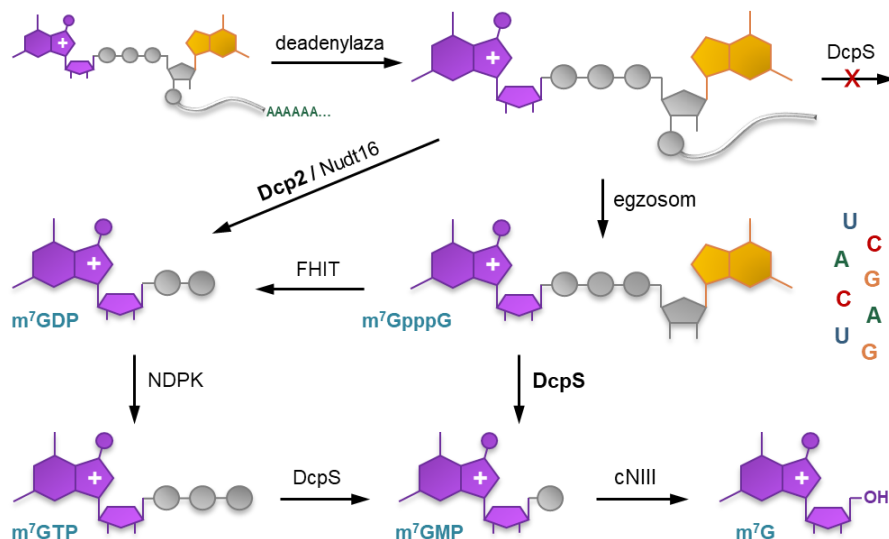
Oznaczenia: AMP – 5'-monofosforan adenozy, ADP – 5'-difosforan adenozy, ApppA – 5'5'-trifosforan diadenozy, Gal-1-P – galaktozo-1-fosforan, glukoza-1-fosforan, UDP-Gal – galaktozo 5'-difosforan urydyny.

Białka HIT pochodzenia roślinnego, drożdżowego i ich ludzkie homologi zostały dobrze przebadane (165,167). Niestety, związek pomiędzy aktywnością enzymatyczną danego enzymu a pełnioną przez niego funkcją biologiczną pozostaje często niejasny, dlatego białka te są wciąż obiektem badań. O ich istotnej roli w procesach życiowych świadczy m.in. to, iż enzymy z rodziny HIT występują zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych, w tym u człowieka (168), co oznacza, że motyw triady histydynowej został zachowany w procesie ewolucji.

1.6.2.1 Enzym dekapujący mRNA (DcpS)

Białko DcpS (ang. *decapping scavenger*) jest białkiem z rodziny HIT, które jest enzymem zaangażowanym w proces degradacji mRNA u organizmów eukariotycznych, w tym u ludzi. Egzozom degradowuje mRNA poczynawszy od końca 3', w wyniku czego uwalniane są dinukleotydy lub krótkie oligonukleotydy reszty końca 5' mRNA, które zawierają strukturę zwaną kapem (ang. *cap*), składającą się z 7-metyloguanozyny połączonej mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem mRNA (Rys. 1-46). Kap degradowany jest przez enzym DcpS, który hydrolizuje wiązanie pomiędzy fosforanami γ i β , uwalniając 5'-monofosforan 7-metyloguanozyny (m⁷GMP) i drugi produkt, który jest odpowiednio 5'-difosforanem nukleotydu (ppN) lub krótkiego oligonukleotydu (ppN₁N₂...). Aktywność enzymu DcpS jest uważana za niezbędną dla homeostazy komórki, gdyż nadmierne nagromadzenie reszt kapu uwolnionych z mRNA w trakcie degradacji 3'→5' mogłoby niekorzystnie wpływać na inne kluczowe procesy komórkowe zależne od kapu, a zatem mieć efekt toksyczny. DcpS lokalizuje się zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym, gdzie prawdopodobnie zaangażowany jest w składanie genów (ang. *splicing*) (169). W literaturze

istnieją sugestie, że rola DcpS w komórce może być bardziej ogólna i wykracza poza jego dobrze scharakteryzowaną funkcję degradacji mRNA od końca 3' (169).

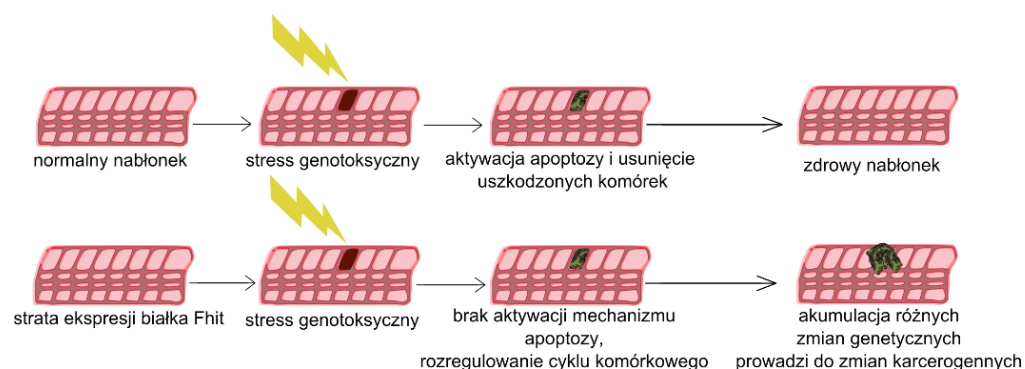


Rys. 1-46. Degradacja mRNA, w której biorą udział enzymy DcpS oraz Fhit. Rysunek zapożyczono z pracy Warmiński i wsp.(170)

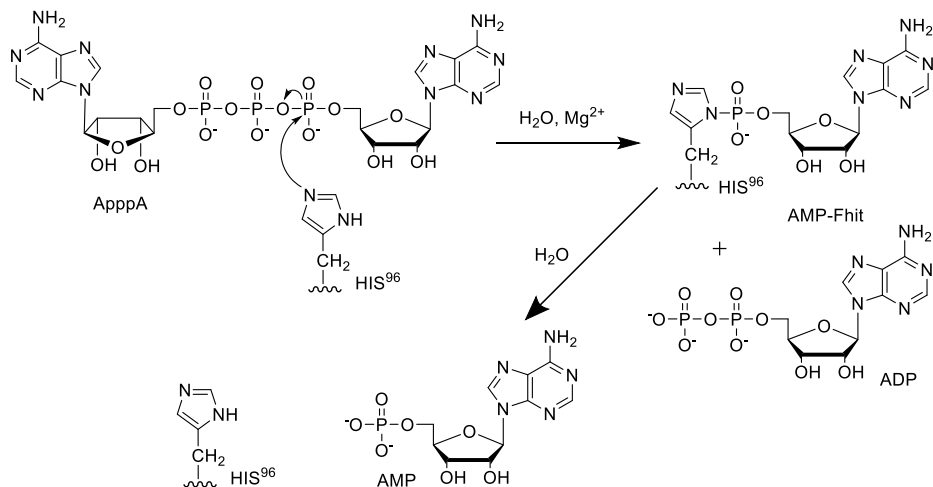
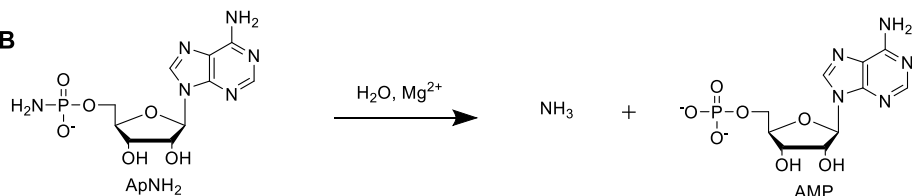
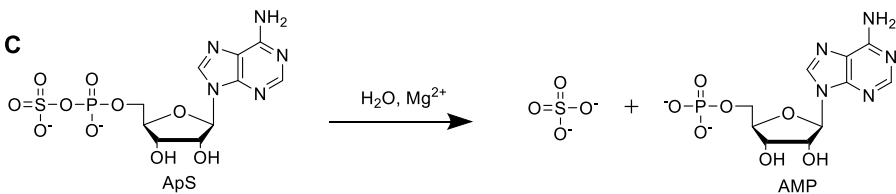
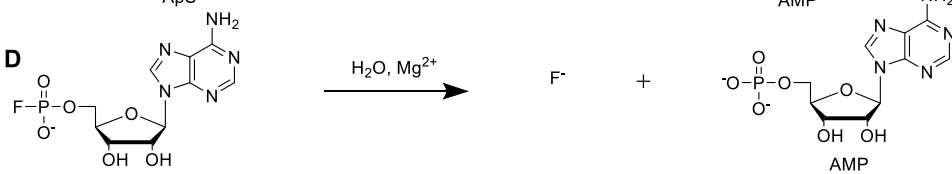
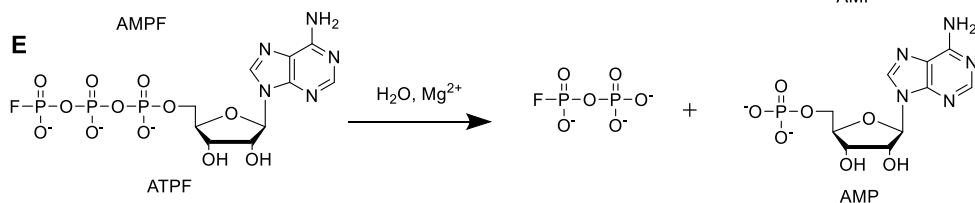
W roku 2008 doniesiono, że hamowanie aktywności DcpS za pomocą małowcząsteczkowych inhibitorów może przynieść efekt terapeutyczny w rdzeniowej atrofii mięśniowej (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA). SMA jest powszechnie występującą chorobą neurodegeneracyjną występującą średnio raz na 6000 urodzeń (171). Jest spowodowana niskim poziomem białka SMN (ang. *Survival Motor Neuron*), które kodowane jest przez geny SMN. Doniesiono, że pochodne chinazolin są silnymi inhibitorami enzymu DcpS, a jeden ze związków - RG3039, poprawia działanie funkcji motorycznych u myszy z SMA (172). Do niedawna modyfikowane chinazoliny były jedyną klasą związków o udokumentowanej aktywności przeciwko DcpS, a pomimo trwających badań przedklinicznych i klinicznych, wciąż nie ma skutecznego kandydata na lek łagodzący objawy SMA. Dlatego opracowywanie nowych metod wysokoprzepustowych do poszukiwania inhibitorów DcpS wciąż jest pożądane.

1.6.2.2 Supresor nowotworowy – enzym Fhit

Ludzkie białko Fhit (ang. *Fragile Histidine Triad Protein*, EC 3.6.1.29) jest supresorem nowotworowym z rodziny HIT, odgrywającym bardzo ważną rolę w indukcji apoptozy, kontroli cyklu komórkowego oraz wrażliwości komórek na czynniki powodujące powstawanie uszkodzeń w łańcuchu DNA. Aktywność Fhit kontrolowana jest przez małowiązujące nukleotydy (173). Białko jest kodowane przez gen składający się z dziesięciu egzonów, znajdujący się w łamliwym regionie ludzkiego chromosomu 3, 3p14.2 (174). Fhit jest stosunkowo niewielkim białkiem, składającym się z 147 aminokwasów o masie całkowitej polimeru około 17 kDa, a jego formą aktywną jest homodimer (175). Fhit ma właściwość katalityczną – jest hydrolazą diadenozyno tri- oraz tetrafosforanów. Naturalnym substratem jest trifosforan diadenozyny (ApppA), który jest przekształcany do 5'-monofosforanu adenozy (AMP) oraz 5'-difosforanu adenozy (ADP). Reakcja ta biegnie dwuetapowo z utworzeniem kowalencyjnego nietrwałego związku pośredniego pomiędzy AMP oraz Fhit (Rys. 1-48A) (176). Białko Fhit, poza naturalnymi substratami (Ap_nA) hydrolizuje również ApNH₂, ApS, fluoromonofosforan adenozy (AMPF) oraz fluorotrifosforan adenozy (ATPF) (177) (Rys. 1-48 B-E). Stosunkowo szeroka specyficzność substratowa enzymu Fhit stwarza możliwość opracowania testów enzymatycznych z wykorzystaniem odpowiednio zmodyfikowanych substratów.



Rys. 1-47. Schemat reprezentujący jak utrata aktywności białka Fhit może doprowadzić do nowotworzenia. Rysunek wykonany na podstawie publikacji Campiglio et al. (178).

A**B****C****D****E**

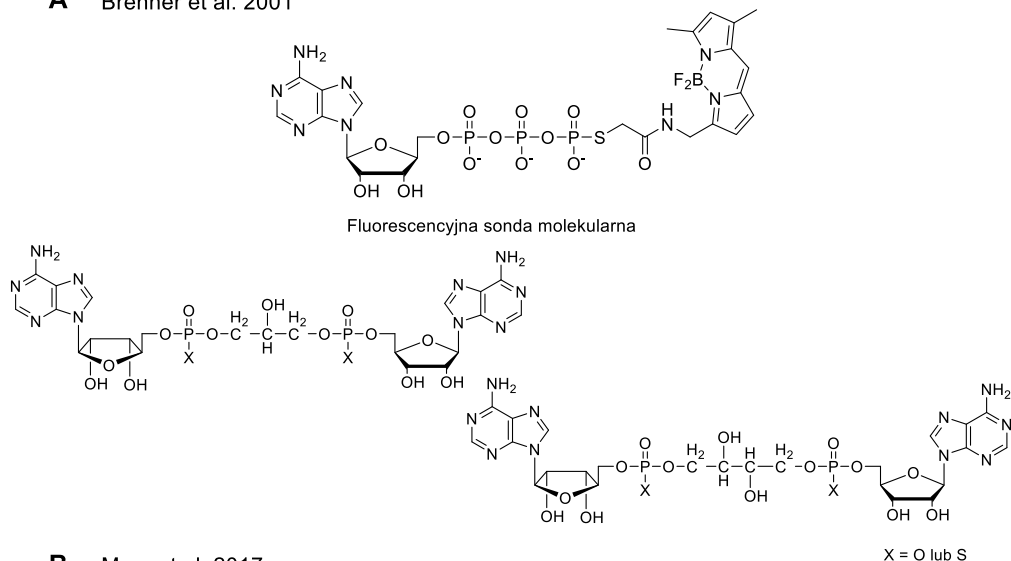
Rys. 1-48. A) Schemat dwuetapowej reakcji hydrolizy ApppA przez Fhit. Etap I to nukleofilowy atak pary elektronowej azotu histydyny 96 (HIS⁹⁶) na atom atomu fosforu i utworzenie produktu pośredniego AMP-Fhit oraz uwolnienie ADP. Etap II to nukleofilowy atak cząsteczki wody na atom fosforu i uwolnienie AMP oraz wolnego enzymu. B-D) Szeroka specyficzność substratowa enzymu Fhit na przykładach kilku modyfikowanych analogów adeninowych.

Poza aktywnością katalityczną białko Fhit uważane jest za supresor nowotworowy, ponieważ jego brak lub obniżony poziom został zaobserwowany w wielu typach nowotworów oraz w różnych liniach komórek rakowych (179) (Rys. 1-47). Zahamowanie powstania nowotworu poprzez nadmierną ekspresję białka Fhit w nerkach, żołądku, płucach jest dobrym dowodem na to, że białko Fhit jest autentycznym supresorem namnażania się komórek rakowych (180). Wykazano również, że przywrócenie ekspresji białka Fhit w liniach komórek rakowych Fhit⁻ prowadzi do indukcji apoptozy zależnej od kaspaz (181). Supresji onkogenezy komórek płucnych towarzyszy indukcja apoptozy (182), natomiast badania nad myszami wykazały, iż inaktywacja białka Fhit powoduje powstanie guza żołądka oraz guza gruczołów łojowych, co przypomina zespół Muir-Torre (rak jelita, żołądka, powstanie cyst łojowych) (183).

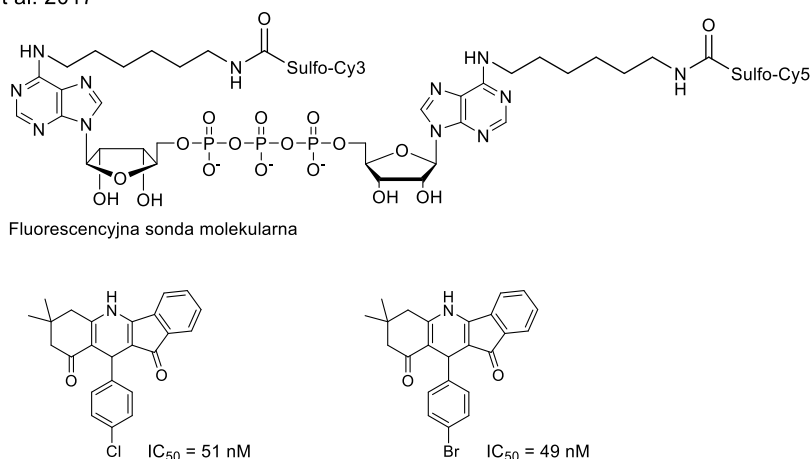
Aktywność hydrolityczna Fhit nie ma wpływu na jego zdolności jako supresora nowotworowego, co zostało dokładnie przebadane (180). Wykazano natomiast, że aktywną formą białka jest kompleks enzym-substrat (gdzie substrat to nukleotyd np. Fhit-Ap₃A), który jest sygnałem do rozpoczęcia indukcji apoptozy (180). Natomiast hydroliza tego kompleksu prowadzi do przejścia białka w stan nieaktywny. Wtedy kończy się przekazywanie sygnału, co sugeruje, że żywotność cząsteczki sygnałowej (a ściślej jej kompleksu z enzymem) jest kluczem do wywołania apoptozy komórki nowotworowej. Dlatego wydaje się, że małowiązujące inhibitory enzymu Fhit mogą być cennymi narzędziami do wyłączenia supresji nowotworowej wywoływanej przez kompleks tego białka. Właściwość hydrolazy może zostać wykorzystana do oznaczania aktywności białka Fhit oraz poszukiwania związków wiążących się w miejscu aktywnym enzymu. W 2017 roku opublikowano pracę, w której opisano wysokoprzepustową metodę przesiewową opartą o sondę fluorescencyjną wykorzystującą zjawisko FRET (ang. Förster Resonance Energy Transfer) (Rys. 1-49B) (184,185). Zaprojektowany eksperyment pozwolił na wykonanie badań przesiewowych ponad 15 tysięcy cząsteczek oraz wyłonił inhibitory, spośród których najlepszy charakteryzuje się wartością IC_{50} na poziomie 50 nM. Za sukces można uznać identyfikację tak silnego inhibitora, jednakże wśród badanych związków nie było analogów pochodzenia nukleotydowego, których poznanie mogłoby się znacznie przyczynić do wyjaśnienia roli Fhit w komórkach. Drugim opisywanym w literaturze eksperymentem poszukiwania inhibitorów enzymu Fhit opartym o sondę fluorescencyjną jest praca opublikowana w 2001 roku przez zespół Brenner i wsp. Autorzy wykorzystali syntetycznie uzyskaną sondę adeninową z umieszczonym na terminalnym fosforanie znacznikiem fluorescencyjnym BODIPY (186), a inhibitorów poszukiwano wśród

analogów AppppA, w których zmodyfikowany został mostek fosforanowy łączący oba nukleozydy (187) (Rys. 1-49A). Do dziś nie wyjaśniono mechanizmu regulacji aktywności katalitycznej Fhit oraz roli kompleksu Fhit-App₃A w indukcji apoptozy.

A Brenner et al. 2001



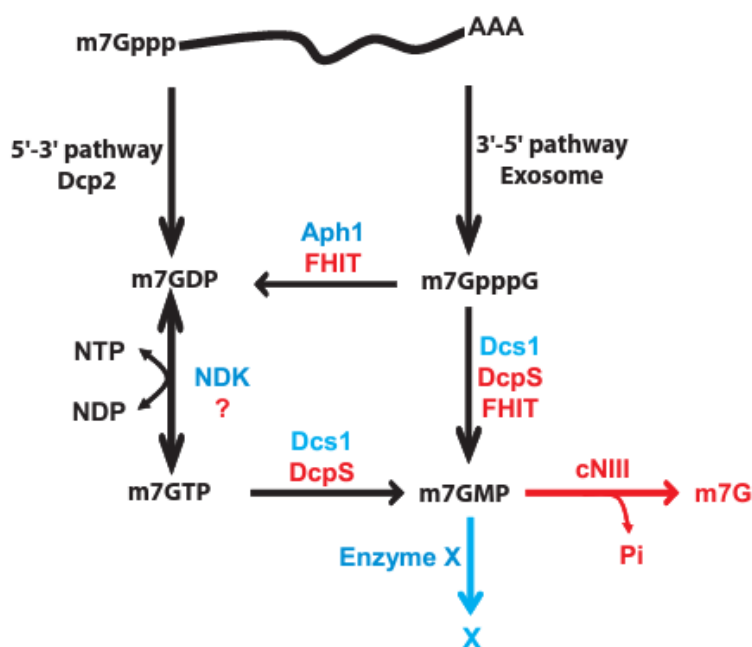
B Marx et al. 2017



Rys. 1-49. Związki fluorescencyjne wykorzystane jako sondy molekularne w poszukiwaniach cząsteczek hamujących aktywność Fhit. A) Sonda ApppBODIPY oraz przykładowe zidentyfikowane inhibitory. B) Sonda typu FRET oraz najsilniejsze zidentyfikowane inhibitory.

Białko Fhit, będące hydrolazą diadenozyno polifosforanów, pełni także rolę enzymu kontrolującego poziom dinukleotydów Ap_nA (gdzie n to liczba grup fosforanowych), w komórkach. W literaturze odnajduje się doniesienia, że enzym Fhit katalizuje reakcje rozpadu m⁷GpppG, który jest dinukleotydem powstającym w wyniku wewnątrzkomórkowej

degradacji mRNA (188). Przeprowadzono badania na komórkach drożdżowych, w których wyciszono gen białka odpowiadającego za degradację m⁷GpppG (dcs1, będący homologiem ludzkiego DcpS). Nie zaobserwowano akumulacji dinukleotydu, a jego hydrolizę. Dalsze badania wykazały, że enzymem odpowiadającym za hydrolizę m⁷GpppG jest białko Aph1, będące homologiem ludzkiego Fhit. Autorzy pracy porównali aktywność Aph1 i Fhit, z której wynioskowali, że oba enzymy hydrolizują m⁷GpppG. Ludzki Fhit wiązał m⁷GpppG zarówno od strony metylowanej guanozyny, jak i guanozyny, uwalniając porównywalną ilość tych związków jako produktów (w stosunku 1:1) (188). Zaobserwowana aktywność dekapująca Fhit sugeruje, że może on brać udział w ścieżce degradacji mRNA w komórkach, jednak mechanizm ten nie jest dokładnie znany (Rys. 1-50).



Rys. 1-50. Ścieżki degradacji mRNA oraz eliminacji (di)nukleotydów powstałych w trakcie tego procesu. Na schemacie zaznaczono enzymy biorące udział w przekształcaniu nukleotydów i dinukleotydów. Kolorem niebieskim zaznaczono zaangażowane enzymy drożdżowe, a kolorem czerwonym enzymy ludzkie. Rysunek zaczerpnięty z pracy Seraphin i wsp. (188).

1.7 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego zostało odkryte przez dwie grupy uczonych pracujących niezależnie w Stanach Zjednoczonych. Byli to Edward M. Purcell, Howard C. Torrey i Richard V. Pound z Uniwersytetu Harwardzkiego oraz Felix Bloch, William W. Hansen oraz Martin Packard z Uniwersytetu w Stanford w Kalifornii. Na przełomie lat 45-46 ubiegłego wieku jako pierwsi zaobserwowali fenomen NMR w cieczach i ciałach stałych, a już w 1952 roku Bloch i Purcell zostali laureatami nagrody Nobla za swoje odkrycie. Metoda NMR zarówno pod względem technologicznym, jak i praktycznym jest rozwijana do dnia dzisiejszego o czym świadczy technika obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI, ang. *Magnetic Resonance Imaging*) stosowana powszechnie w medycynie.

1.7.1 Podstawy fizyczne magnetycznego rezonansu jądrowego

Jeden z postulatów fizyki kwantowej mówi o tym, że cząstki obdarzone ładunkiem elektrycznym, takie jak elektrony lub protony posiadają właściwość zwaną *spinem* (I), która powoduje powstanie dwóch różnych poziomów energetycznych po wprowadzeniu ich w zewnętrzne pole magnetyczne. Cząstka mająca ładunek elektryczny i moment pędu posiada moment magnetyczny oznaczany μ . Związek pomiędzy momentem magnetycznym a spinem jądrowym jest proporcjonalny i powiązany przez współczynnik magnetogiryczny γ ($T^{-1} s^{-1}$). Jądra atomowe posiadające niezerowy spin zbudowane są z nieparzystej liczby nukleonów. Spiny przyjmują wartość wielokrotności $1/2$ ($I = 1/2, 1, 3/2$ itd.). Jednakże jądra najczęściej wykorzystywane do analiz metodą spektroskopii NMR mają spin $1/2$. Istotne właściwości niektórych wybranych jąder zostały podane w Tabeli 1.10. Jak można zauważyć, im wyższy współczynnik magnetogiryczny tym wyższa czułość w technice NMR. Najczulszym jądrem jest atom wodoru, a za nim kolejno fluor oraz fosfor. Niestety, najczęściej występujący w układach biologicznych izotop węgla ^{12}C posiada spin równy zero, przez co nie jest on aktywny w technice NMR. Spin równy $1/2$ przynależy natomiast do izotopu węgla ^{13}C , co kwalifikuje go do badania za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego. Naturalne występowanie tego izotopu jest bardzo niskie (1,1%), przez co wymagane są bardzo duże ilości materiału badawczego lub znakowanie cząsteczek tym izotopem węgla.

Tabela 1.10. Właściwości wybranych jąder atomowych ważnych w technice NMR.

Izotop	Spinowa liczba kwantowa, I	Naturalna abundancja (%)	γ ($10^7 \text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$)*	Czułość (odnosi się do izotopu ^{13}C)	Częstotliwość rezonansowa ($^1\text{H} = 100 \text{ MHz}$) (MHz)
^1_1H	1/2	99,99	26,7522	5870	100
^2_1H	1	0,01	4,1066	0,006	15,35
$^{13}_6\text{C}$	1/2	1,1	6,7283	1	25,15
$^{15}_7\text{N}$	1/2	0,36	-2,7126	0,02	10,14
$^{19}_9\text{F}$	1/2	100	25,1623	4890	94,09
$^{31}_{15}\text{P}$	1/2	100	10,8394	391	40,48

* jednostką w układzie SI jest radian na sekundę na tesłę

Opis kwantowo-mechaniczny jąder atomowych przewiduje, że indywiduum obdarzone ładunkiem orientuje się w zewnętrznym polu magnetycznym w taki sposób, że jego energia jest jak najmniejsza, ale poza tym może on przyjąć dowolną orientację, co nie jest dokładnym rozwiązaniem. Opisuując powyższe zdarzenie za pomocą fizyki kwantowej uznaje się, że spinowe i magnetyczne liczby kwantowe są skwantowane, co ma swoje konsekwencje w istnieniu dwóch orientacji, jakie mogą przyjmować jądra o spinie 1/2 (stany własne α i β). Moment magnetyczny może być ustawiony zgodnie lub przeciwnie do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego B_0 . Bardziej precyzyjnie, składowa Z momentu magnetycznego może być zorientowana zgodnie lub przeciwnie do kierunku pola magnetycznego (zakładając, że pole magnetyczne jest wzdłuż osi Z). Powoduje to powstanie dwóch oddzielnych poziomów energetycznych, z mniejszą energią (poziom podstawowy) dla ułożenia równoległego i z energią wyższą (poziom wzbudzony) dla ułożenia antyrównoległego. Różnica pomiędzy poziomem podstawowym a poziomem wzbudzonym jest proporcjonalna do indukcji pola magnetycznego, co zapisuje się wzorem:

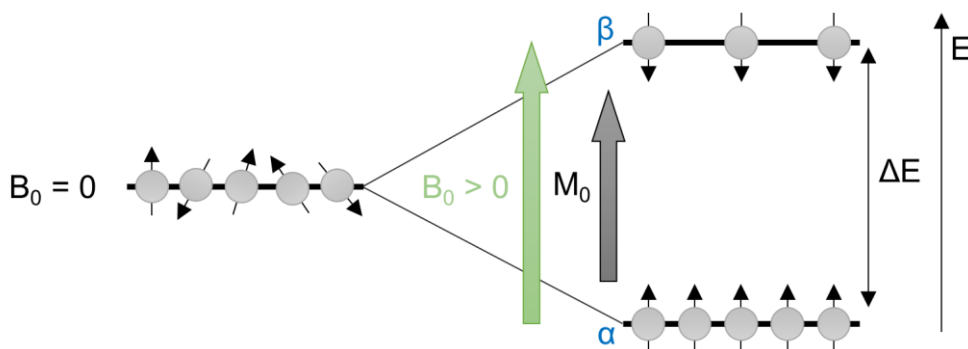
$$\Delta E = \gamma \hbar B_0, \quad (1.7.1)$$

gdzie γ to wspomniany współczynnik magnetogiryczny (funkcjonuje także pod nazwą żyromagnetyczny), $\hbar$ to stała Diracka ($\hbar/2\pi$), a B_0 to pole magnetyczne. Różnica energii pomiędzy stanami α i β nazwana jest rozszczepieniem jądrowym Zeemana. Rozpatrując grupę protonów umieszczonych w polu magnetycznym B_0 , część z nich przyjmie stan własny o niższej energii, a część stan własny o energii wyższej, jednak zawsze jest jakaś różnica obsadzeń.

Dystrybucję protonów pomiędzy poziomem podstawowym, a poziomem wzbudzonym opisuje się równaniem Boltzmann'a:

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = \exp \frac{-\Delta E}{kT}, \quad (1.7.2)$$

gdzie N_{α} i N_{β} to liczba jąder atomowych w stanie podstawowym oraz wzbudzonym, ΔE to różnica energii pomiędzy tymi stanami, k to stała Boltzmann'a, a T to temperatura wyrażona w kelwinach (K). W badanym układzie zawsze znajduje się więcej spinów o niższej energii ($N_{\alpha} > N_{\beta}$), co z kolei powoduje powstanie makroskopowego wypadkowego momentu magnetycznego, zwanego magnetyzacją próbki, M . Ponieważ zewnętrzne pole magnetyczne z definicji wskazuje kierunek $+z$, wektor magnetyzacji w równowadze termicznej jest równoległy do osi Z (Rys. 1-51).



Rys. 1-51. Energetyczne ułożenie spinów jądrowych o spinowej liczbie kwantowej $1/2$ bez zewnętrznego pola magnetycznego ($B_0 = 0$) oraz w obecności zewnętrznego pola magnetycznego $B_0 > 0$. Rozszczepienie poziomów energetycznych i ułożenie spinów na niższym poziomie energetycznym (stan własny α , zorientowanie równoległe do B_0) oraz wyższym poziomie energetycznym (stan własny β , zorientowanie antyrównoległe do B_0). ΔE jako różnica energii niezbędna do wzbudzenia spinów. Równoległe ułożenie się spinów w stosunku do pola magnetycznego jest energetycznie korzystniejsze, stąd powstanie wypadkowego momentu magnetycznego μ . M_0 , wypadkowy moment wektora magnetyzacji skierowany równoległe do pola B_0 .

Wracając do równania 1.7.1, różnicę energii można opisać za pomocą warunku częstotliwości Bohra, który jest prawem mówiącym, że częstotliwość promieniowania emitowanego lub absorbowanego podczas przejścia układu atomowego pomiędzy dwoma stanami stacjonarnymi jest równa różnicy energii tych stanów podzielonej przez stałą Plancka⁴, co można zapisać z pomocą poniższego wzoru:

⁴ McGraw-Hill Dictionary of Scientific & Technical Terms, 6E, Copyright © 2003 by The McGraw-Hill Companies, Inc.

$$\Delta E = h\nu_0. \quad (1.7.3)$$

Podstawiając wzór 1.7.1 do 1.7.3 otrzymuje się następującą zależność:

$$h\nu_0 = \gamma\hbar B_0. \quad (1.7.4)$$

Rozwiązując dla $\hbar = h/2\pi$

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.7.5)$$

oraz przyjmując częstotliwość ν_0 mierzoną w Hz, można skorzystać z częstości kołowej równej $\omega_0 = 2\pi\nu_0$:

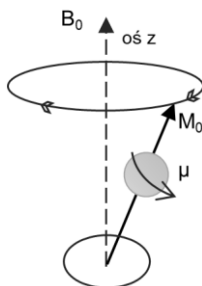
$$\omega_0 = \gamma B_0. \quad (1.7.6)$$

Równanie 1.7.5 uwzględniające częstotliwość lub równanie 1.7.6 uwzględniające częstość kołową wyrażoną w radianach opisują tzw. warunki rezonansu, w których energia dostarczona w postaci fal elektromagnetycznych w zakresie radiowym idealnie pasuje do różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym a wzbudzonym.

Do powyższych rozwiązań można dojść, rozważając podejście klasyczne protonu umieszczonego w polu magnetycznym B_0 . Proton posiada własny moment pędu (P), który z kolei powoduje powstanie momentu magnetycznego (μ) takiego naładowanego indywiduum, a obie wartości są powiązane wspomnianym już współczynnikiem magnetogirycznym:

$$\mu = \gamma P. \quad (1.7.7)$$

W polu magnetycznym B_0 wektorowa składowa momentu magnetycznego (M_0) układa się wzdłuż pola magnetycznego, natomiast moment pędu powoduje, że składowa M_0 zaczyna się poruszać ruchem kołowym wokół osi B_0 . Ruch ten nazywany jest precesją (Rys. 1-52), a jego częstotliwość (częstotliwość precesji lub częstotliwość Larmora ω_0 (rad/s)) jest właściwością, którą mierzymy w spektroskopii NMR (równanie 1.7.6).



Rys. 1-52. Ruch precesyjny jądra atomowego o liczbie spinowej 1/2, posiadającego własny moment magnetyczny μ w zewnętrznym polu magnetycznym B_0 . Prędkość kołowa opisana jest za pomocą wzoru 3.6.

W stanie równowagi zaprezentowanym na rysunku Rys. 1-53A składowa „z” wektora magnetyzacji M_z jest równa M_0 , a M_z jest określana wektorem magnetyzacji podłużnej. Zmiana magnetyzacji netto jest możliwa poprzez poddanie układu spinowego jądra atomowego działaniu energii o częstotliwości równej różnicy energii pomiędzy stanami spinowymi (Rys. 1-53B). Jeśli do układu zostanie wprowadzona wystarczająca ilość energii, możliwe jest nasycenie układu spinowego i doprowadzenie do stanu $M_z=0$ lub wartości ujemnych. Zanik doprowadzanej energii prowadzi do wytracenia energii nagromadzonej przez układ i powrót wektora magnetyzacji do stanu równowagi. Proces ten nazywa się procesem relaksacji podłużnej, a stała czasowa opisująca powrót M_z do stanu początkowego nazywana jest czasem relaksacji spin-sieć (T_1). Nazwa spin-sieć pochodzi od wymiany energii między pobudzonymi jądrami a ich otoczeniem molekularnym. Równania opisujące powrót M_z do stanu równowagi przedstawiają się następująco:

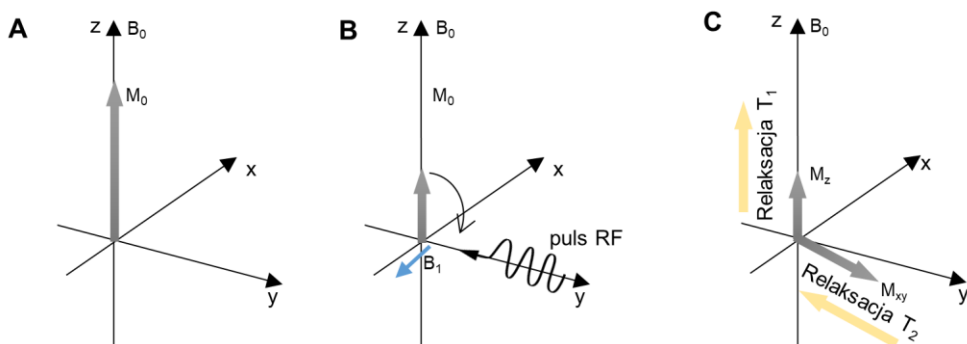
$$M_z = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right), \text{ dla } M_z = M_0, \quad (1.7.8)$$

$$M_z = M_0 \left(1 - 2e^{-\frac{t}{T_1}} \right), \text{ dla } M_z < 0. \quad (1.7.9)$$

Z ruchem precesji jądra atomowego jest powiązana druga stała czasowa przypisana do procesu magnetyzacji poprzecznej, który charakteryzowany jest przez czas relaksacji spin-spin (T_2) (równanie 1.7.10). Wektor M_0 może zostać odchylony w płaszczyźnie XY, a następnie będzie się on obracać wokół osi Z z częstotliwością równą częstotliwości fotonu, który spowodowałby przejście pomiędzy dwoma poziomami energetycznymi spinu. Częstotliwość ta nazywana jest częstotliwością Larmora. Magnetyzacja w płaszczyźnie XY dąży do zera, a następnie wzrasta magnetyzacja podłużna do osiągnięcia wartości początkowej M_0 wzdłuż osi Z:

$$M_{XY} = M_{XY0} e^{-\frac{t}{T_2}}. \quad (1.7.10)$$

Podsumowując, czas relaksacji spinowo-spinowej, T_2 , jest czasem redukcji (skrócenia) magnetyzacji poprzecznej o czynnik e . Dla przejrzystości opisu czasy relaksacji T_1 oraz T_2 zostały omówione oddzielnie. W rzeczywistości oba procesy zachodzą jednocześnie z zastrzeżeniem, że T_2 jest krótszy lub równy T_1 (Rys. 1-53C).



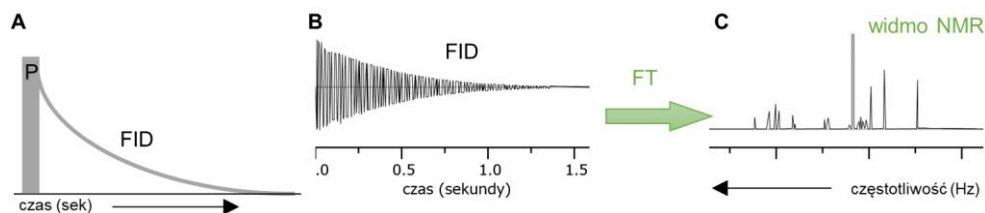
Rys. 1-53. Graficzne przedstawienie procesów relaksacji. A) Ułożenie wektora magnetyzacji w stanie równowagi w zewnętrznym polu magnetycznym B_0 ; B) Wzbudzenie spinów jądrowych impulsem o częstotliwości radiowej. Zmiana wektora magnetyzacji; C) Po wyłączeniu pulsu RF układ wraca do stanu równowagi na skutek relaksacji spin-sieć (T_1) oraz spin-spin (T_2).

Powyższe podstawowe pojęcia opisujące zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego są niezbędne do zrozumienia fenomenu NMR. Wspomniane zmiany ułożenia wektora magnetyzacji M_0 są efektem budowy układu pomiarowego, w którym dodatkowe pole magnetyczne jest wytworzone przez cewkę przepuszczającą prąd zmienny o częstotliwości Larmora. Pole to oznaczone jest B_1 . Krótki opis układu pomiarowego oraz obecnie stosowanej techniki pulsującego pola magnetycznego z transformatą Fouriera zostanie opisany w kolejnym podrozdziale.

1.7.2 Układ pomiarowy NMR

Obecnie nowoczesne metody NMR wykorzystują magnesy nadprzewodzące osiągające bardzo wysokie pola magnetyczne. Magnes nadprzewodzący jest wykonany ze specjalnego drutu. Długość tego nadprzewodnika sięga kilku kilometrów, a elementy wykonane są ze stopu $(\text{NbTaTi})_3\text{Sn}$, który jest kruchy i dlatego osadzany jest w miedzi. Drut ma prostokątny przekrój poprzeczny, co pozwala na uzyskanie maksymalnej gęstości prądu, a tym samym maksymalne

pole magnetyczne. Nadprzewodnik zwijany jest na kształt solenoidu lub cewki, który, gdy jest schłodzony do bardzo niskich temperatur ($-298,95^{\circ}\text{C}$ lub $4,2\text{ K}$), ma opór w przybliżeniu równy zeru. Osiągnięcie tak niskiej temperatury jest możliwe dzięki zanurzeniu przewodu w ciekłym helu, który dodatkowo jest izolowany płaszczem ciekłego azotu. Magnes NMR jest ładowany tylko raz, co oznacza naładowanie cewki prądem elektrycznym, który będzie płynął tak długo, jak długo cewka będzie utrzymywana w temperaturze ciekłego helu, a nieustannie płynący prąd po obwodzie cewki wytwarza stałe pole magnetyczne (w rzeczywistości pole to maleje z czasem lecz dzieje się to bardzo powoli). Ta technika pozwala na wytworzenie pola magnetycznego o indukcji magnetycznej w zakresie nawet do 1 GHz . Zgodnie z równaniem 1.7.6 dla jądra wodoru ^1H częstotliwość precesji wynosi: $63,8\text{ MHz}$ dla $B_0 = 1,5\text{ T}$, $127,6\text{ MHz}$ dla $B_0 = 3,0\text{ T}$, 300 MHz dla $B_0 = 7,0\text{ T}$, itd.



Rys. 1-54. A) Schematyczne przedstawienie eksperymentu NMR wykorzystującego transformację Fouriera (FT). Literą P oznaczono puls RF trwający μs (skala nie została zachowana); B) Rejestracja zaniku swobodnej precesji (FID); C) Widmo NMR uzyskane po transformacji Fouriera – przejście z jednostek czasu na częstotliwość. Przedstawione dane pochodzą z własnych eksperymentów.

Drugim istotnym elementem nowoczesnego spektrometru NMR jest sonda. Jest to wymienna część spektrometru, która przyjmuje badaną próbkę, wysyła energię w zakresie radiofale (RF) oraz wykrywa sygnał wracający z próbki. Ponadto, posiada obwody kontrolujące temperaturę oraz cewki pomiarowe/odbiorcze (RF). W obecnie stosowanych technikach NMR wzbudzenie jądrowe następuje poprzez wytworzenie przez cewki krótkiego sygnału ($10\text{--}50\text{ }\mu\text{s}$) o częstotliwości RF i dużej mocy (około 50 W), zwanej potocznie pulsem (P) (Rys. 1-54A). Warunek rezonansu zachodzi przy stałym polu magnetycznym B_0 , a parametrem zmiennym jest częstotliwość wzbudzenia (ν) zapewniana przez puls o dobranej szerokości (ang. *frequency sweep*). Eksperyment NMR jest polichromatyczny, ponieważ pole magnetyczne B_1 generowane przez puls RF ma szeroki zakres częstotliwości. Wytworzone przez cewki pole magnetyczne B_1 , które jest skierowane prostopadle do pola B_0 , odchyła wektor magnetyzacji M_0 w płaszczyźnie XY oraz Z (Rys. 1-53B). Po zakończeniu pulsu na układ wpływa ponownie tylko pole B_0 , które rozpoczyna relaksację wektora M w stronę osi Z z częstotliwością Larmora

charakterystyczną dla danego jądra atomowego (Rys. 1-53B). Podczas tego procesu w cewkach indukowany jest prąd elektryczny zależny od czasu wynikający z relaksacji składowej M_{xy} . Cewka nadawczo-odbiorcza rejestruje sygnał zaniku swobodnej precesji (ang. *Free Induction Decay*, FID) (Rys. 1-54B), a komputer poprzez przekształcenia matematyczne zwane transformacją Fouriera przedstawia wynik w funkcji częstotliwości, co pozwala na analizę danych (Rys. 1-54C).

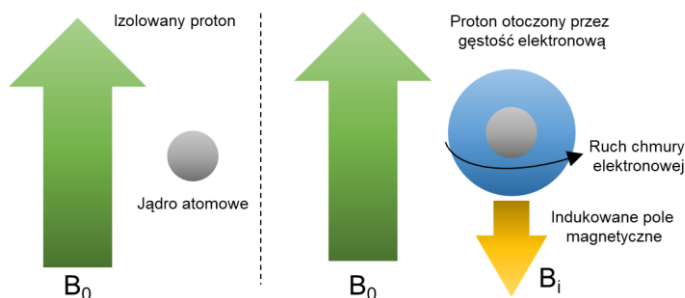
1.7.3 Podstawowe pojęcia opisujące widmo NMR

Przesunięcie chemiczne oraz efekt ekranowania jąder atomowych

Widmo NMR przedstawiane jest w postaci wykresu, na którym na osi odciętych odłożona jest wartość przesunięcia chemicznego sygnału wyrażona w liczbie części na milion, w skrócie ppm (ang. *parts per milion*). Jest to sposób zapisu bezwymiarowego stosunku dwóch wielkości, a w metodzie magnetycznego rezonansu jądrowego wyraża się poniższym wzorem:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6, \quad (1.7.11)$$

gdzie ν to częstość rezonansowa obserwowanego jądra atomowego, ν_{ref} to częstość rezonansowa wzorca (referencji). W spektroskopii NMR wzorcem jest najczęściej tetrametylosilan, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (TMS), kwas trimetylosililopropanowy (TSP) lub sól sodowa kwasu 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonowego (DSS), dla których przesunięcie chemiczne uznawane jest jako zero. Zaletą stosowania jednostki ppm jest ułatwienie opisu położenia sygnałów na widmie NMR, które w pierwotnej wersji przedstawiano w jednostce częstotliwości, gdzie różnice pomiędzy poszczególnymi sygnałami są bardzo niewielkie, a same liczby bardzo duże. Ponadto, zastosowanie wartości ppm pozwala na porównywanie widm NMR rejestrowanych przy różnych polach magnetycznych, dla których odniesieniem jest ten sam wzorec.



Rys. 1-55. Idea powstania dodatkowego pola magnetycznego wynikającego z ruchu elektronów w zewnętrznym polu magnetycznym B_0 .

Widma NMR składają się nie z jednego, a z wielu sygnałów o różnym przesunięciu chemicznym. Dzieje się tak dlatego, że poszczególne atomy wodoru często nie są równocenne chemiczne względem siebie (zasada stosowana także do innych atomów obserwowanych w NMR). Każde jądro atomowe składa się z protonów lub protonów i neutronów oraz otaczających elektronów. Ruch kołowy elektronów w zewnętrznym polu magnetycznym B_0 indukuje dodatkowe niewielkie pole magnetyczne, B_i , skierowane przeciwnie do pola B_0 , przez co efektywne pole magnetyczne (B_{eff}) działające na dane jądro atomowe (Rys. 1-55) jest na ogół mniejsze o współczynnik stałej ekranowania σ , co wyrażone jest poniższym wzorem:

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma). \quad (1.7.12)$$

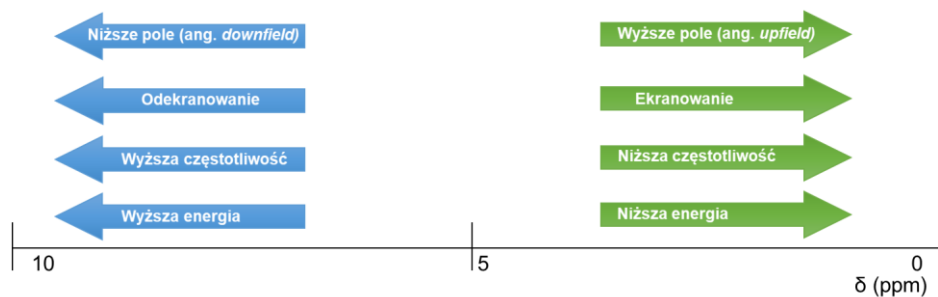
Parametr σ sigma można rozbić na kilka elementów, tzn.

$$\sigma = \sigma_{dia} + \sigma_{para} + \sigma_m + \sigma_{rc} + \sigma_{ef} + \sigma_{solv}, \quad (1.7.13)$$

gdzie σ_{dia} to wkład od efektu diamagnetycznego (np. ruch kołowy elektronów), σ_{para} wkład od efektu paramagnetycznego związany z niesferycznym rozłożeniem elektronów, σ_m wkład od efektu anizotropowego, σ_{rc} wkład od rozkładu ładunku elektrycznego w układzie pierścieniowym, σ_{ef} wkład od efektu pola elektrycznego oraz σ_{solv} wkład od rodzaju otaczającej cząsteczkę rozpuszczalnika.

Zmiana efektywnego pola magnetycznego danego jądra o współczynnik σ wiąże się ze zmianą częstotliwości rezonansowej i dlatego na widmie ^1H NMR obserwuje się kilka sygnałów od protonów, gdzie każdy z nich znajduje się w innym otoczeniu elektronowym. Fenomen przesunięcia chemicznego jest podstawą techniki NMR. W spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego używa się pojęć ekranowanie (ang. *shielding*) oraz odekranowanie jądra atomowego (ang. *deshielding*). Na wielkość efektywnego pola magnetycznego mają wpływ

podstawniki (atomy) znajdujące się w bliskim położeniu od rezonującego jądra atomowego. Przykładowo grupy charakteryzowane jako elektrono-donorowe (grupy alkilowe) powodują ekranowanie, natomiast podstawniki wyciągające elektrony, takie jak grupa nitrowa, karboksylowa, atomy z grupy halogenów (Cl, Br, F) powodują odekranowanie. Również rodzaj wiązania czy budowa samej cząsteczki ma wpływ na wielkość efektywnego pola magnetycznego. Najlepszym przykładem jest tutaj molekula benzenu, której sprzężony układ wiązań podwójnych, wiązań typu π , indukuje ekranowanie środkowej części cząsteczki i odekranowanie na jej krawędziach. Podstawowe pojęcia stosowane przy opisie widm NMR w zależności od regionu w jakim występują na widmie przedstawiono na Rys. 1-56. Równocенność i nierównocенność protonów najprościej zobrazować na przykładzie widma ^1H etanolu (Rys. 1-58). Protony grupy CH_3 (1a-1c) są równocenne chemicznie między sobą i dlatego na widmie NMR reprezentowane są przez jeden sygnał. To samo dotyczy protonów grupy CH_2 (2a-2b). Natomiast te dwie grupy protonów między sobą się chemicznie różnią, stąd dwa sygnały o różnych przesunięciach chemicznych.



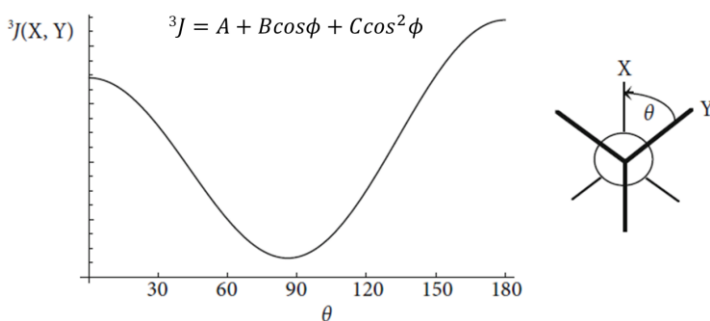
Rys. 1-56. Zmiany w energii i ekranowaniu jąder atomowych w zależności od ułożenia na widmie ^1H NMR.

Intensywność sygnału

Każdy sygnał znajdujący się na widmie NMR charakteryzowany jest przez wartości przesunięcia chemicznego, multipletowość oraz intensywność sygnału. Intensywność definiowana jest jako pole powierzchni pod sygnałem, co dostarcza informacji na temat względnej liczby nuklidów reprezentowanych przez dany sygnał, co jest wiedzą niezbędną do poprawnej analizy widma NMR. Na przykładzie etanolu można zauważyć, że integracja jednego sygnału wynosi 3, a drugiego 2, co zgadza się z liczbą protonów (Rys. 1-58).

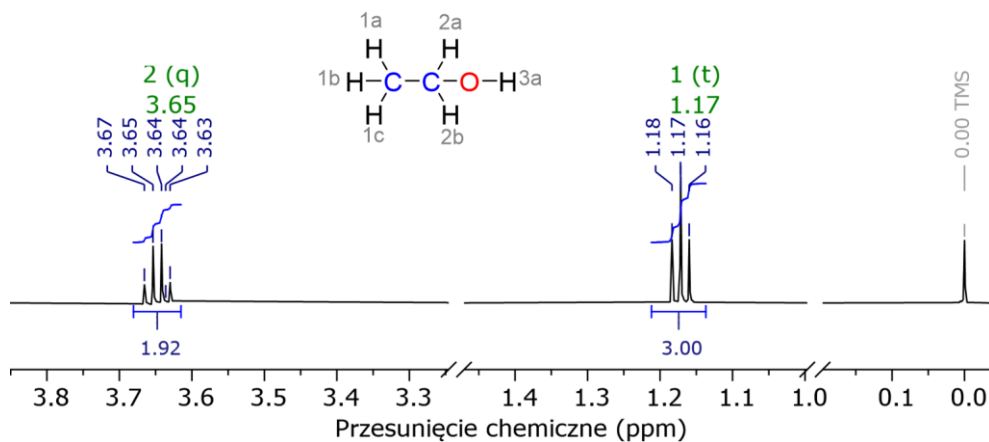
Sprężenia spinowo-spinowe, multipletowość

Nierównocenne jądra atomowe znajdujące się blisko siebie oddziałują ze sobą, co nazywane jest oddziaływaniem spinowo-spinowym (oddziaływanie pomiędzy spinami jądrowymi). W wyniku takiego oddziaływania sygnał na widmie NMR jest rozszczepiony na multiplety, co dostarcza bezpośredniej wiedzy na temat sąsiadujących ze sobą jąder atomowych. W NMR najczęściej obserwuje się sprzężenia skalarnie, które są przenoszone przez elektrony tworzące wiązania kowalencyjne w cząsteczce. Rozseparowanie sygnału na dwie linie (lub więcej) opisywane jest stałą sprzężenia spinowego oznaczaną J wyrażaną w Hz. Stałe sprzężenia pomiędzy atomami, które dzielą dwa wiązania nazywa się *geminalnymi* (2J), natomiast gdy odległość wynosi trzy wiązania jest to sprzężenie *wicynalne* (3J). Wielkość sprzężeń wicynalnych zależy od kąta torsyjnego pomiędzy oddziałującymi atomami, co opisane jest równaniem Karplusa (Rys. 1-57).



Rys. 1-57. Równanie Karplusa oraz wykres przedstawiający wielkość sprzężenia 3J pomiędzy jądrami atomowymi X i Y a kątem torsyjnym.

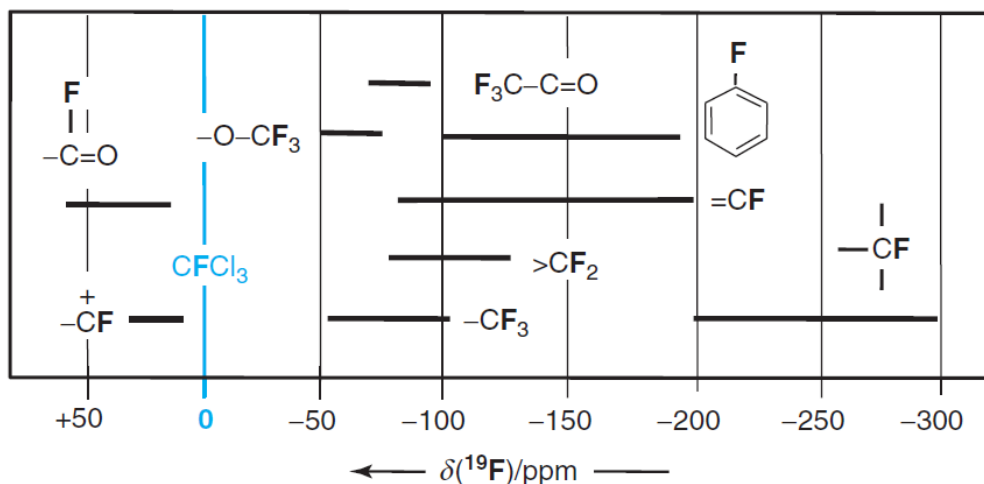
Multipletowość sygnałów wynikających z oddziaływania jąder atomowych o liczbie spinowej $\frac{1}{2}$ można prosto określić, stosując zasadę $n+1$, gdzie n to liczba atomów w grupie sąsiadującej. Wracając do przykładu etanolu, multipletowość grupy CH_2 wynosi cztery ($n = 3$), co nazywane jest kwartetem, a multipletowość grupy CH_3 wynosi trzy ($n = 2$), co nazywane jest tripletem. Co ważniejsze, stałe sprzężenia pomiędzy oddziałującymi ze sobą spinami wyznaczone na podstawie obu sygnałów muszą być takie same. Dla etanolu stała $^3J = 7,1$ Hz (Rys. 1-58).



Rys. 1-58. Widmo ^1H NMR etanolu. Pod sygnałami podano ich integrację. Nad każdym z sygnałów wypisano przesunięcie chemiczne każdej składowej multipletu (kolor niebieski) oraz przesunięcie chemiczne środka sygnału wraz z oznaczeniem liczbowym odnoszącym się do przedstawionej struktury etanolu oraz multipletowość (kolor zielony). Widmo rejestrowane w D_2O . Proton 3a nie jest widoczny na widmie, ponieważ został podstawiony przez deuter.

1.7.4 Spektroskopia ^{19}F NMR

Spin $\frac{1}{2}$ oraz współczynnik magnetogiryczny zbliżony do protonu powodują, iż częstotliwość rezonansowa fluoru jest zbliżona do wodoru, przez co świetnie nadaje się do badania metodą NMR. Fluor, pomimo że nie występuje w wielu związkach naturalnych, był jednym z pierwszych atomów badanych metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Niemniej jednak, wiele cząsteczek zawierających fluor otrzymuje się w chemii organicznej i nieorganicznej, a niektóre z nich są wykorzystywane jako sondy w badaniach o znaczeniu biologicznym, co prowadzi do ogólnego zainteresowania ^{19}F NMR.



Rys. 1-59. Zakres przesunięć chemicznych związków organicznych zawierających fluor. Grafikę zaczerpnięto z książki „*NMR Spectroscopy Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*”, Harald Günther.

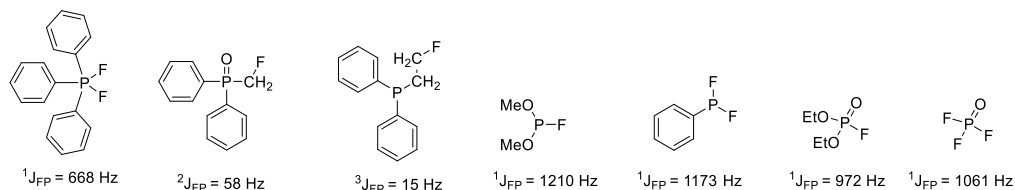
Związkami referencyjnymi uznawanymi w ^{19}F NMR są chemicznie obojętne trichlorofluorometan, CFCl_3 (0 ppm), kwas trifluorooctowy, CF_3COOH (-76,60 ppm) oraz heksafluorobenzen, C_6F_6 (-163 ppm). Zakres rezonansu jąder fluoru jest wyjątkowo duży i dla związków nieorganicznych wynosi niemalże 2500 ppm, natomiast dla związków organicznych 400 ppm, co nadal jest bardzo dużą wartością (Rys. 1-59). Największy wpływ na stałą ekranowania, σ , ma stała diamagnetyczna wynikająca z ruchu kołowego chmury elektronowej wokół jądra fluoru oraz stała paramagnetyczna związana ze wzbudzeniem elektronów na orbitalu p , której wpływ jest przeciwny do ekranowania diamagnetycznego. Elektron wodoru znajduje się na orbitalu s i dlatego stała diamagnetyczna ma największy wpływ na efektywne pole magnetyczne działające na proton, natomiast elektrony fluoru zajmują także orbital p ,

stąd ekranowanie diamagnetyczne determinuje relatywne ekranowanie jądra atomowego. Na przesunięcie chemiczne jąder fluorowych ma wpływ również rodzaj rozpuszczalnika czy obecność podstawnika, z którym bezpośrednio związany jest atom fluoru, np. halogeny powodują odekranowanie atomu fluoru (Rys. 1-60). Rozpuszczalnik może nie mieć dużego wpływu na przesunięcie chemiczne sygnałów fluorowych, gdy rozważa się trzy najczęściej stosowane ciecze deuterowane takie jak CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ czy $\text{aceton}-d_6$, natomiast znaczne różnice w δ_{ppm} obserwuje się w warunkach wodnych czy wodno-buforowych. Wtedy pH, siła jonowa czy nawet lepkość będą zmieniały położenia sygnałów na widmie.

$\text{F}_3\text{C}-\text{CH}_3$	$\text{F}_3\text{C}-\text{F}$	$\text{F}_3\text{C}-\text{Cl}$	$\text{F}_3\text{C}-\text{Br}$	$\text{F}_3\text{C}-\text{I}$
-65 ppm	-62 ppm	-33 ppm	-21 ppm	-5 ppm

Rys. 1-60. Wpływ halogenu na przesunięcie chemiczne ^{19}F NMR grupy CF_3 w odniesieniu do CFCl_3 (0 ppm).

Podobnie jak w przypadku przesunięcia chemicznego tak i wartości sprzężenia spinowo-spinowego są znacznie większe dla fluoru niż wodoru. Sprzężenie to występuje pomiędzy jądrami aktywnymi w NMR, tj. protonem, węglem, fosforem, azotem, fluorem i generalnie jest przenoszone przez elektrony tworzące wiązania kowalencyjne między atomami. Dlatego efekt sprzężenia maleje wraz z liczbą wiązań dzielącą oddziałujące układy spinowe, co dobrze obrazują stałe sprzężenia. Podobnie jak dla protonu, główna zasada pomagająca w przewidzeniu stopnia multipletowości $2nI + 1$ (gdzie n to liczba jąder atomowych, z którymi ulega sprzężeniu obserwowany atom, a I to ich liczba spinowa) sprowadza się do wyrażenia $n + 1$. Na widmach ^{19}F NMR obserwuje się rozszczepienia sygnałów wynikające m.in. ze sprzężenia fluor-fluor, fluor-proton oraz fluor-fosfor. Wybrane wartości stałych sprzężenia spinowo-spinowego zostały przedstawione na Rys. 1-61.



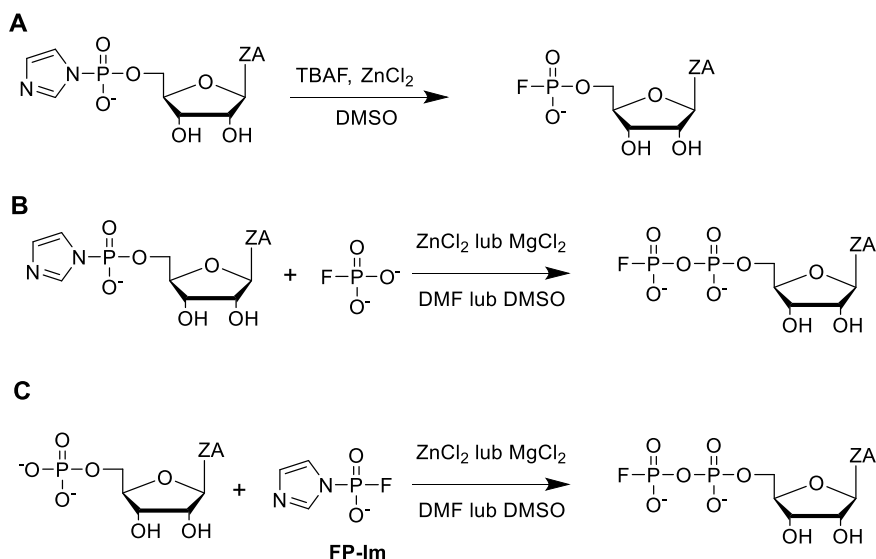
Rys. 1-61. Przykładowe związki zawierające fluor oraz ich stałe sprzężenia.

Badania własne

Chemia i biologia nukleotydów zainteresowała mnie już na samym początku studiów licencjackich realizowanych na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Bardzo interesujące wydało mi się (i wciąż jest) samodzielne otrzymywanie chemicznie modyfikowanych nukleotydów, a następnie badanie ich metodami biofizycznymi takimi jak spektroskopia fluorescencyjna czy magnetyczny rezonans jądrowy. Jednym z miejsc wprowadzania modyfikacji chemicznych w nukleotydach jest grupa fosforanowa. W zależności od rodzaju wprowadzonej modyfikacji otrzymuje się związki o zmienionych właściwościach biologicznych czy biofizycznych. Obiektem moich zainteresowań stały się nukleotydy zawierające fluor w postaci ugrupowania fluorofosforanowego. Umieszczenie fluoru w terminalnej pozycji łańcucha fosforanowego wydawało się korzystne z dwóch względów. Po pierwsze, fluor wielkością podobny jest do atomu tlenu, przez co związek tak modyfikowany może być wciąż akceptowany w miejscu aktywnym enzymów. Po drugie, fluor jest znacznikiem spinowym, dzięki czemu znakowana nim cząsteczka może pełnić rolę sondy molekularnej w badaniach ^{19}F NMR.

W ramach studiów licencjackich i następnie magisterskich zająłem się syntezą fluorofosforanowych analogów nukleotydów oraz wykazałem ich przykładowe zastosowania jako sond molekularnych w monitorowaniu procesów biologicznych. Opracowałem trzy metody syntetyczne wprowadzenia fluorofosforanu w obręb łańcucha fosforanowego pojedynczego nukleotydu. Dwie z tych metod polegają na aktywacji grupy fosforanowej imidazolem, tak aby zwiększyć podatność atomu fosforu na atak nukleofilowy. Imidazolowe pochodne nukleotydów otrzymuje się metodą kondensacji w układzie oksydoredukcyjnym ditiopirydyna/trifenilofosfina, zaproponowaną przez Mukaiyamę i Hashimoto (189). Aktywowane nukleotydy wydajnie reagowały z nukleofilowymi jonami fluorkowymi (Schemat I-A), tworząc ugrupowanie fluorofosforanowe oraz z jonami fluorofosforanowymi (Schemat I-B), tworząc związki o wydłużonym łańcuchu fosforanowym (190). Stosując dwa powyższe podejścia syntetyczne, otrzymałem kilkadziesiąt nukleotydów różniących się budową zasady azotowej lub budową i długością mostka fosforanowego, który w obrębie swojej struktury posiadał dodatkowe modyfikacje takie jak grupa metylenowa (CH_2) czy imidowa (NH). Imidazolowe pochodne niektórych nukleotydów nie są związkami trwałymi chemicznie.

Zaobserwowałem to dla pochodnych z wydłużonym łańcuchem fosforanowym (dwa fosforany lub więcej), które są bardziej polarne i chemicznie bardziej labilne. Dlatego aby umożliwić syntezę fluoro(poli)fosforanowych analogów nukleotydów, opracowałem elektrofilowy odczynnik fluorofosforylujący, którym jest fluorofosforan aktywowany imidazolem (FP-Im). Odczynnik FP-Im wydajnie reagował z di- oraz trifosforanami nukleozydów, co pozwoliło mi na otrzymanie kilkunastu analogów nukleotydów (Schemat I-C) (190). Ponadto, FP-Im wytrącany w postaci soli litowej jest trwały, co najmniej rok w odpowiednich warunkach przechowywania (-20°C). Z punktu widzenia syntetycznego korzystne okazało się zastosowanie elektrofilowego związku fluorofosforylującego (FP-Im), który wykazał reaktywność nie tylko wobec mononukleotydów. Pochodna ta ulegała także reakcji z 5'-fosforylowanymi oligonukleotydami, co dało początek pierwszym dwóm przykładom 10-nt cząsteczek DNA wyznakowanych 5'-fluoro(di)fosforanem (190).

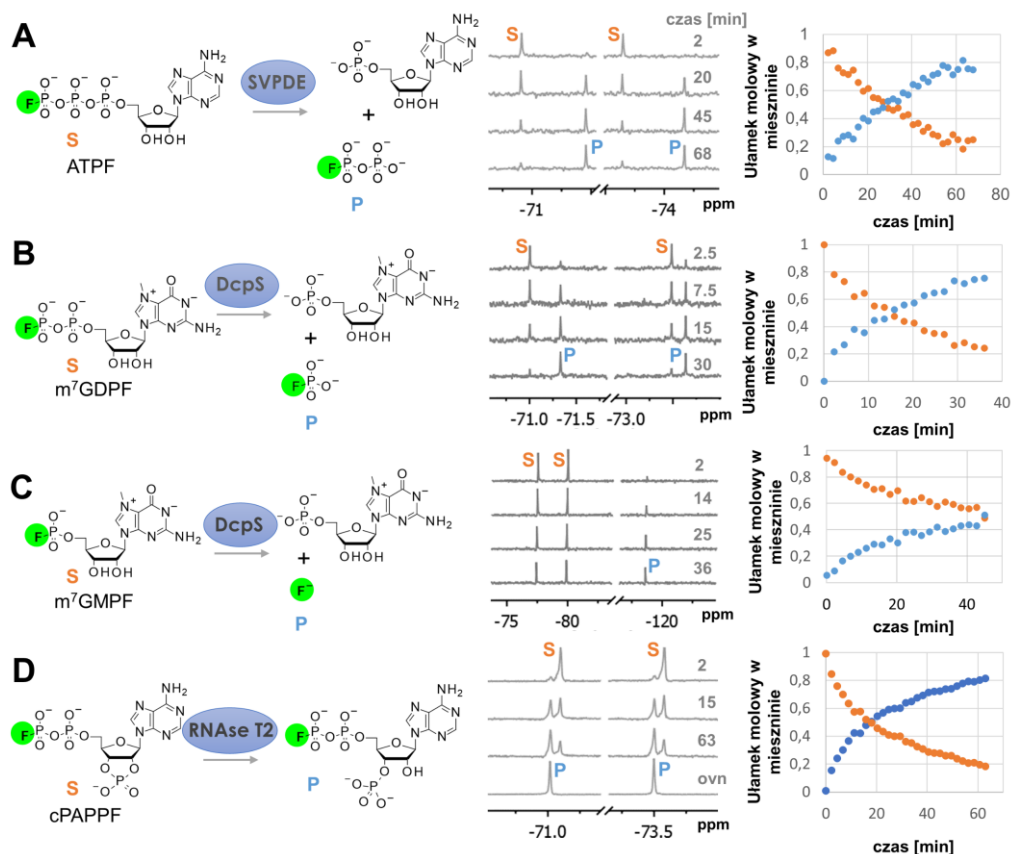


ZA - zasada azotowa: A, G, C, U
Baranowski et al., JOC, 2015

Schemat I. Metody syntezy fluorofosforanowych analogów nukleotydów wykorzystujące podjednostki aktywowane imidazolem oraz nukleofile: A) jony fluorkowe, B) jon fluorofosforanowy, C) 5'-fosforylowany nukleozyd. Otrzymałem ponad 30 różnych nukleotydów z wydajnościami około 60% (190).

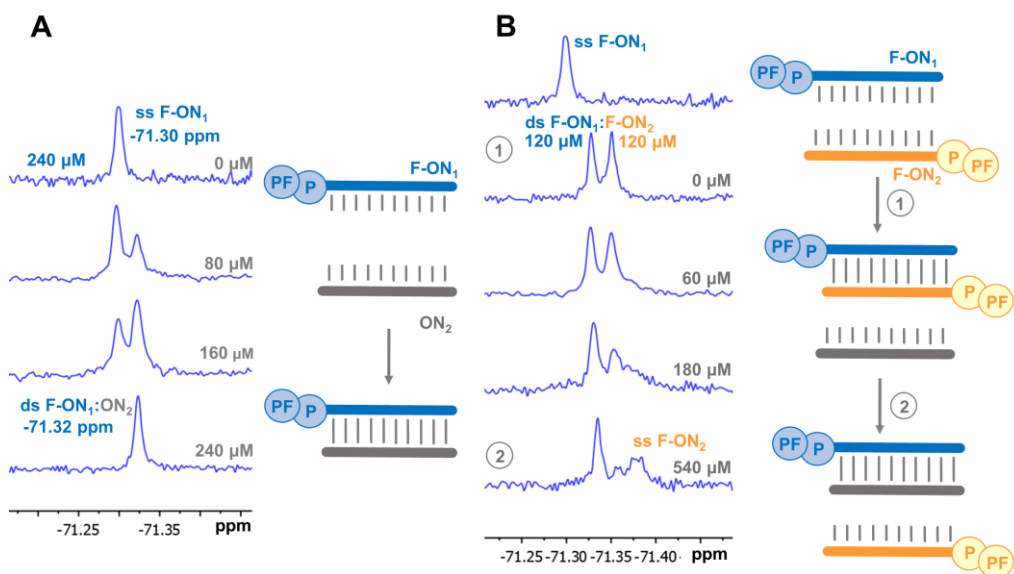
Otrzymanie fluorofosforanowych analogów nukleotydów pozwoliło mi na przetestowanie tych związków jako sond molekularnych w badaniach ^{19}F NMR. Kilka fluorowych nukleotydów, będących analogami naturalnych substratów, inkubowałem z wybranymi enzymami, a proces postępu reakcji enzymatycznej obserwowałem metodą ^{19}F NMR (Rys. I). Hydrolizę substratów

z powodzeniem monitorowałem metodą NMR ze względu na zróżnicowanie w wartościach przesunięć chemicznych pomiędzy fluorowanym substratem a fluorowanym produktem (Rys. I). W jednym z przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów enzymatycznych udziałem DcpS oraz m⁷GMPF, wykazałem hydrolizę substratu do m⁷GMP oraz jonów fluorkowych (Rys. I-C).



Rys. I. Hydroliza fluorofosforanowych analogów nukleotydów monitorowana metodą ¹⁹F NMR. A) Reakcja ATPF z fosfodiesterazą z jadu węża (SVPDE/PDE-I). B) i C) Enzym DcpS hydrolizujący analogi końca 5' mRNA, tj. m⁷GDPF oraz m⁷GMPF. D) Monitorowanie rozcięcia cyklicznego fosforanu przez RNAzę T2. Powyższe wyniki stały się częścią mojej pracy magisterskiej oraz zostały opublikowane (190).

Drugim praktycznym zastosowaniem były dwa pilotażowe eksperymenty wykorzystania fluorofosforanowego oligonukleotydu do monitorowania procesu hybrydyzacji nici DNA metodą ^{19}F NMR. Podobnie jak w eksperymentach enzymatycznych, zmiany w wartościach przesunień chemicznych sygnałów nici pojedynczych i podwójnych umożliwiły obserwowanie procesu tworzenia się dupleksu DNA (Rys. II-A), a nawet wypierania nici z utworzonego wcześniej dupleksu DNA (Rys. II-B) (190).



Rys. II. Monitorowanie tworzenia się dupleksów DNA metodą ^{19}F NMR. A) Hybrydyzacja 5'-fluoro(di)fosforanowego 10-nt F-ON₁ z komplementarnym ON₂. B) Hybrydyzacja F-ON₁ z F-ON₂ i wypieranie F-ON₂ poprzez nadmiar ON₂. Powyższe wyniki stały się częścią mojej pracy magisterskiej oraz zostały opublikowane (190).

Wyniki przedstawione na Rys. I i Rys II zainspirowały mnie do dalszych badań nad fluorofosforanowymi analogami (oligo)nukleotydów. Badania nad zastosowaniem fluorofosforanowych analogów nukleotydów oraz badania nad syntezą i zastosowaniem fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów jako sond molekularnych kontynuowałem w trakcie studiów doktoranckich. Projekt doktorski ewoluował w dwie odrębne ścieżki. Uwalnianie jonów fluorkowych w trakcie reakcji enzymatycznych stało się podstawą do opracowania nowej, wysokoprzepustowej metody przesiewowej opartej o ilościowe oznaczanie uwolnionych jonów fluorkowych w roztworze, co jest tematem pierwszej części badań własnych. Metodę wysokoprzepustową zastosowałem do poszukiwania inhibitorów badanych białek, takich jak fosfodiesteraza z jadu węża PDE-I, ludzki enzym dekapujący DcpS

oraz ludzki i roślinny enzym Fhit. Druga część projektu doktorskiego skupia się wokół syntezy fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów, różniących się długością i składem sekwencji. W szczególności skupiłem się na opracowaniu sond molekularnych, które pozwoliły na monitorowanie procesów takich jak: - tworzenie się dupleksów DNA, - wykrywanie pojedynczych niekomplementarności w dupleksach DNA, - monitorowanie zmian strukturalnych struktur drugorzędowych oligonukleotydów w funkcji zmieniającej się temperatury oraz pH, - monitorowanie oddziaływania pomiędzy oligonukleotydem a białkiem lub małącząsteczkowym ligandem.

2. Zastosowanie fluorofosforanowych pochodnych nukleotydów do profilowania preferencji substratowych i poszukiwania inhibitorów enzymów hydrolizujących fluorofosforanowe analogi nukleotydów

2.1 Cele i obiekty badań

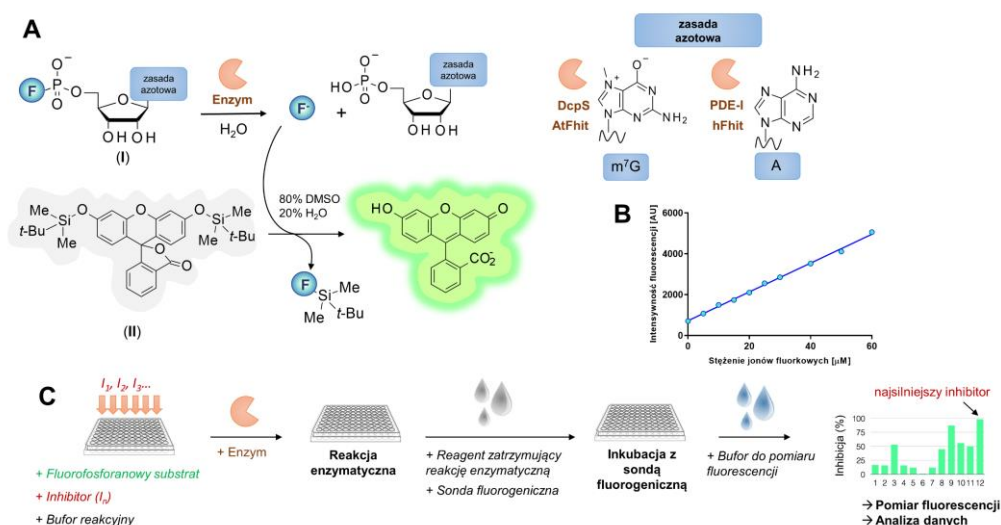
W części pierwszej opisującej badania własne zostaną przedstawione wyniki eksperymentów, które miały na celu opracowanie wysokoprzepustowej metody przesiewowej (ang. *High-throughput screening* - HTS) opartej o fluorofosforanowe analogi nukleotydów. Metody HTS, które umożliwiają szybkie przetestowanie dużej puli małowymagujących związków pod kątem ich aktywności biologicznej (najczęściej poszukiwane są inhibitory enzymów będących celami terapeutycznymi), są nieustannie stosowane w przemyśle farmaceutycznym. W niniejszym projekcie skupiłem się wokół enzymów z grupy fosfohydrolaz, pirofosfataz czy nukleaz, które specyficznie wiążą i hydrolizują substraty pochodzenia nukleotydowego. Enzymy te pełnią kluczową rolę w kontroli wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego poziomu małowymagujących nukleotydów, których poziom jest bezpośrednio związany z metabolizmem komórkowym, ścieżkami sygnałowymi w komórce czy integralnością kwasów nukleinowych. W niektórych przypadkach nieprawidłowe funkcjonowanie takich enzymów zostało powiązane z rozwojem chorób, tym samym identyfikując konkretny enzym jako potencjalny cel terapeutyczny. Do opracowania nowej metody HTS przyczyniło się spostrzeżenie, że enzymy są zdolne do hydrolizowania wiązania P-F w grupie 5'-fluorofosforanowej nukleotydu, uwalniając jako jeden z produktów jon fluorkowy. Fluorki były ilościowo oznaczane za pomocą sondy fluorogenicznej, która w wyniku reakcji chemicznej nabywała właściwości fluorescencyjnych. Szczegółowe cele części pierwszej badań własnych były następujące:

- Opracowanie i optymalizacja metody HTS dla enzymu modelowego – fosfodiesterazy z jadu węża (PDE-I);
- Opracowanie i optymalizacja metody HTS dla enzymu ludzkiego DcpS oraz ludzkiego i roślinnego Fhit;
- Skompletowanie bibliotek związków głównie pochodzenia nukleotydowego oraz wykonanie eksperymentów HTS;
- Wyznaczenie parametrów IC_{50} dla najlepszych potencjalnych inhibitorów;

- o Zaprojektowanie, synteza i badania HTS nowych analogów diadeninowych jako inhibitorów ludzkiego Fhit.

2.2 Fluorofosforanowe analogi nukleotydów w badaniach wysokoprzepustowych

Koncepcja wysokoprzepustowej metody przesiewowej została przedstawiona na Rys. 2-1. Fundamentami opracowanego eksperymentu są dwa kluczowe elementy. Pierwszy z nich to nukleotyd, 5'-fluoromonofosforan nukleozydu (NMPF, I), a drugim jest sonda fluorogeniczna czuła oraz selektywna wobec jonów fluorkowych (TBDMS-FL, II).

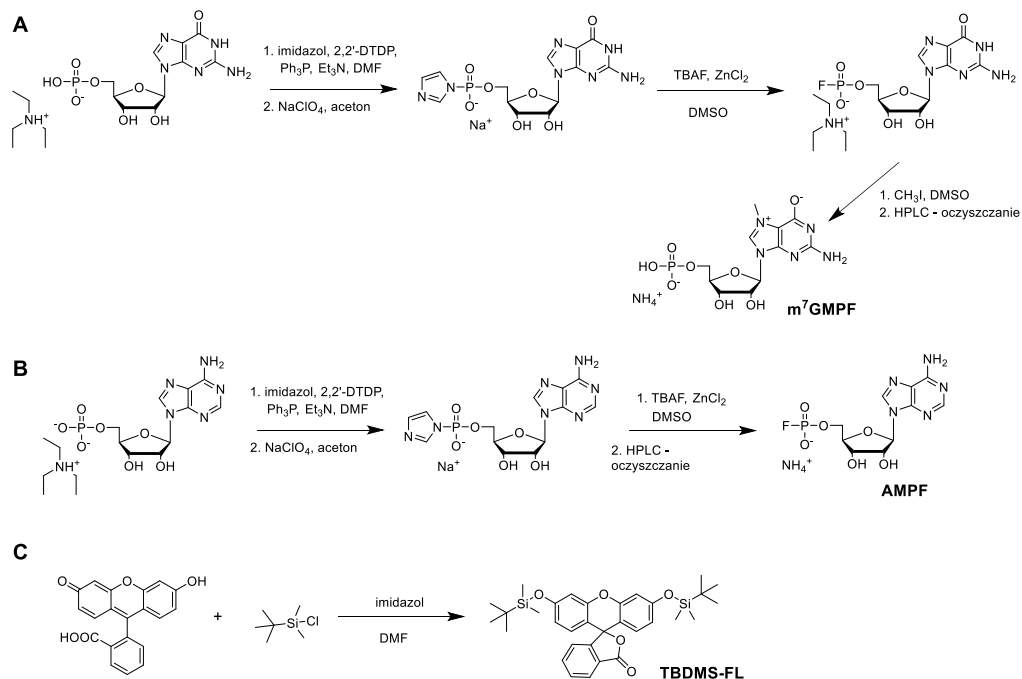


Rys. 2-1. Schemat przedstawiający ideę opracowanej wysokoprzepustowej metody przesiewowej. A) Hydroliza enzymatyczna fluorofosforanowego analogu nukleotydu do nukleotydu i jonów fluorkowych. Reakcja jonów fluorkowych z sondą fluorogeniczną. B) Liniowa zależność fluorescencji od stężenia jonów fluorkowych. C) Wykonanie eksperymentu „krok po kroku”.

Fluorofosforanowe analogi nukleotydów są substratami wybranych enzymów, a warunkiem koniecznym do ich zastosowania jest zdolność badanych białek do hydrolizowania NMPF do jonów fluorkowych oraz NMP (5'-fosforan nukleozydu) (Rys. 2-1A). W zależności od specyficzności substratowej badanego enzymu wykorzystano jedną z dwóch sond fluorofosforanowych, tj. analog końca 5'-mRNA tzw. „kapu” posiadający jako zasadę azotową 7-metyloguaninę (m⁷G)-m⁷GMPF, lub analog mononukleotydu z adeniną (A lub Ade) jako zasadą azotową - AMPF. Nukleotyd m⁷GMPF był substratem dla ludzkiego enzymu DcpS oraz roślinnego enzymu Fhit (AtFhit), natomiast AMPF zastosowano do badań

fosfodiesterazy z jadu węża I (PDE-I) oraz ludzkiego enzymu Fhit. Oba analogi nukleotydów, m⁷GMPF oraz AMPF, otrzymałem z komercyjnie dostępnych związków wyjściowych na drodze standardowych metod syntetycznych obejmujących chemię nukleotydów, co zobrazowałem na schematach przedstawionych na Rys. 2-2A i B. Jako sondę fluorogeniczną zastosowałem fluoresceinę, która w obrębie grup hydroksylowych posiadała ugrupowanie *tert*-butyldimetylosililowe (TBDMS-FL). Modyfikacja ta została wybrana ze względu na szerokie zastosowanie w oznaczaniu jonów fluorkowych w różnych próbkach, takich jak woda, pasta do zębów czy jonów uwolnionych podczas reakcji enzymatycznych oraz ze względu na prostą i wydajną syntezę (Rys. 2-2C) (191). Zabezpieczona forma fluoresceiny nie wykazuje właściwości fluorescencyjnych. Fluorek uwolniony w wyniku reakcji enzymatycznej był ilościowo oznaczany w wyniku reakcji chemicznej z TBDMS-FL, w warunkach organiczno-wodnych (DMSO:bufor wodny), której skutkiem było uwolnienie fluoresceiny, co prowadziło do wzrostu intensywności fluorescencji. Co ważniejsze, zależność intensywności fluorescencji od stężenia jonów fluorkowych jest liniowa w dość szerokim zakresie, od 0 μM do 60 μM (Rys. 2-1B). Ostatecznym wynikiem eksperymentu jest odczyt intensywności fluorescencji wprost proporcjonalnej do ilości jonów fluorkowych uwolnionych w trakcie reakcji enzymatycznej. I tak, dla reakcji enzymatycznych spowolnionych przez dodanie inhibitora intensywność fluorescencji jest niższa niż dla reakcji, w których stopień przekształcenia fluorowanej sondy był wyższy. Zjawisko to wykorzystano do opracowania wysoko przepustowej metody poszukiwania inhibitorów enzymatycznych. Elementami niezbędnymi w przypadku każdej metody wysokoprzepustowej są płytki wielodołkowe. W opracowanej metodzie HTS wykorzystałem płytki 96-dołkowe przystosowane do pomiarów fluorescencji oraz prowadzenia reakcji enzymatycznych (tzw. non-binding plates – rodzaj płytek, w których studzienki zostały wykonane z materiału minimalizującego adsorpcję powierzchniową cząsteczek oraz białek). Każdy pojedynczy eksperyment wysokoprzepustowy składał się z dwóch płytek (PI – reakcja enzymatyczna, PII – inkubacja z sondą fluorogeniczną), a procedura wyglądała następująco: na pierwszej płytce 80-dołków zarezerwowano na reakcje enzymatyczne wraz z kontrolami (kontrola negatywna – dodany zdenaturowany enzym lub dodanie odczynnika, w obecności którego dany enzym jest nieaktywny, np. acetonitryl czy wodny roztwór EDTA; kontrola pozytywna – reakcja bez inhibitora) oraz potencjalnymi inhibitorami. Natomiast 16 dołków zostało przeznaczonych na krzywą wzorcową, która była wykonywana w takich samych

warunkach jak reakcja enzymatyczna, ale z dodatkiem jonów fluorkowych (wodny roztwór NaF) o zadanym stężeniu i bez obecności enzymu. W osiemdziesięciu dołkach przygotowywałem mieszaninę reakcyjną, na którą składał się nukleotydowy substrat (NMPF), potencjalny inhibitor (I_n) oraz bufor. Po 5 minutowej inkubacji w 30°C sukcesywnie kolumnami, w równych odstępach czasowych (np. co 20 sekund) dodawany był enzym. Po określonym czasie reakcję enzymatyczną zatrzymywałem odpowiednio dobranym roztworem denaturującym białko, zachowując reżim czasowy. Następnie część roztworu z pierwszej płytki przenosiłem na nową płytkę, dodawałem roztworu sondy fluorogenicznej, inkubowałem przez 1h, uzupełniałem buforem do odczytu (200 mM HEPES) i dokonywałem pomiaru fluorescencji za pomocą czytnika mikropłytek. Procedura została dobrana w taki sposób, aby całość zajmowała nie więcej niż 3h-4h.



Rys. 2-2. Schematy syntez NMPF-ów (190) oraz sondy fluorogenicznej (191). A) Schemat syntezy m⁷GMPF; B) Schemat syntezy AMPF wychodząc z 5'-fosforanu adenozy (AMP); C) Schemat syntezy sondy TBDMS-FL czułej na jony fluorkowe. 2,2'-DTDP - dwusiarczek 2,2'-dipirydylowy.

Koncepcję powyższego eksperymentu przetestowałem na niedrogim i łatwo dostępnym enzymie, fosfodiesterazie z jadu węża (PDE-I). PDE-I ze względu na komercyjną dostępność oraz szerokie spektrum substratowe można uznać za dobry model do opracowywania metod

przesiewowych enzymów zależnych od dwuwartościowych jonów metali. Po optymalizacji i uzyskaniu satysfakcjonujących wyników dla PDE-I, ideę wysokoprzepustowego testu przesiewowego przenieśliśmy na enzymy metabolizujące nukleotydy w komórkach: ludzki enzym DcpS oraz ludzki enzym Fhit. W badaniach uwzględniłem również roślinny enzym Fhit, a wyniki te są pewnego rodzaju dodatkiem w niniejszej rozprawie, ponieważ sam AtFhit nie był głównym tematem badań. W kolejnych podrozdziałach zostanie opisana optymalizacja metody HTS, a następnie przedstawione zostaną wyniki eksperymentów nad enzymami PDE-I, DcpS oraz Fhit. Część danych dotyczących białka hDcpS została otrzymana powyższą metodą przez dr Annę Wojtczak (z d. Nowicka), co jest przedmiotem wspólnej publikacji naukowej (192).

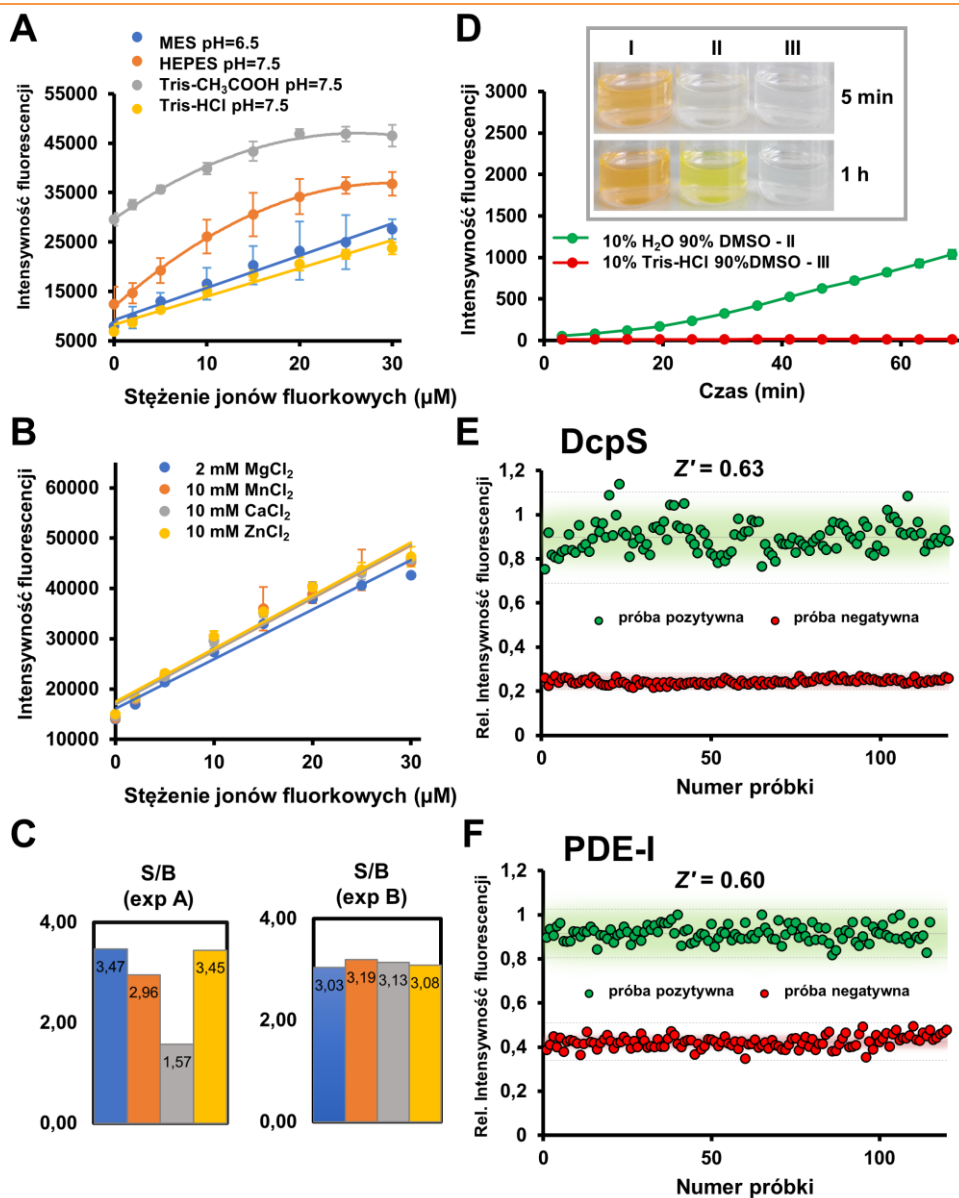
2.2.1 Optymalizacja metody wysokoprzepustowej

Zaprojektowana metoda HTS wymagała optymalizacji i dobrania odpowiednich warunków, w taki sposób aby zapewnić powtarzalność otrzymywanych wyników oraz uniknąć interferencji składników buforu, jonów i innych na odczyt fluorescencji, przez co uzyskane dane mogłyby być nieprawdziwe. W celu określenia jak najlepszych warunków reakcji wykonałem następujące zestawy eksperymentów:

- Zbadałem stabilności sondy fluorogenicznej rozpuszczonej w różnych warunkach – uzyskanie roztworu stabilnego przez co najmniej 1 h,
- Zbadałem wpływ składników buforujących oraz jonów dwuwartościowych metali na przebieg krzywej kalibracyjnej – zachowanie liniowości danych oraz zachowanie jak największego stosunku sygnału do szumu,
- Dobrałem odpowiedni czas trwania reakcji enzymatycznej/stopnia przereagowania substratu – otrzymanie parametru $Z' > 0,5$.

Wpływ składników buforu zarówno na trwałość sondy fluorogenicznej w czasie, jak i poprawność uzyskanych danych zbadałem poprzez pomiar intensywności fluorescencji w funkcji stężenia jonów fluorkowych, które zostały zawieszone w różnego rodzaju buforach. Sonda TBDMS-FL rozpuszczona w czystym DMSO była bardzo niestabilna, o czym świadczyło niemal natychmiastowe odbarwienie roztworu do koloru żółtego. Większą stabilność uzyskałem, stosując mieszaninę woda:DMSO (1:9), jednak już po około 20 minutach odczytywałem zwiększoną intensywność fluorescencji, co świadczyło o rozpadzie sondy. Bardzo dobrym rozwiązaniem była zamiana wody w mieszaninie woda:DMSO (1:9) na bufor

Tris·HCl o następującym składzie: 60 mM Tris·HCl, pH 7,6, 0.6 mM EDTA, 240 mM KCl. Sonda fluorogeniczna rozpuszczona w powyższej mieszaninie była stabilna przez co najmniej 1h, co wystarczyło do poprawnego przeprowadzenia eksperymentu HTS (Rys. 2-3D). Kolejnym zbadanym aspektem był wpływ składu buforu mieszaniny enzymatycznej, a tym samym składu krzywej wzorcowej/kalibracyjnej, na liniową zależność pomiędzy intensywnością fluorescencji a stężeniem jonów fluorkowych. Bufory, które były kompatybilne z eksperymentem to Tris·HCl, HEPES oraz MES. Jednakże, w buforze Tris o pH>8, który dodatkowo zawierał kwas octowy, zaobserwowano znaczący wzrost fluorescencji oraz brak zachowania liniowości, co spowodowane było rozkładem sondy fluorogenicznej (Rys. 2-3A). Następnie sprawdziłem, czy obecność jonów metali może mieć wpływ na stabilność sondy TBDMS-FL. Były to istotne eksperymenty, ponieważ niektóre enzymy zachowują swoją aktywność katalityczną jedynie w obecności jonów magnezu, wapnia czy manganu, co w pewien sposób wymusza skład buforu reakcyjnego (Rys. 2-3B). Jony Mg^{2+} o stężeniu 10 mM znacząco obniżyły intensywność fluorescencji oraz stosunek sygnału do tła (S/B), co może być związane z niską rozpuszczalnością MgF_2 w wodzie (Rys. 2-3C). Efekt zmian fluorescencji był mniej widoczny dla niższych stężeń Mg^{2+} , a stężenie 2 mM przyjęto jako graniczną akceptowalną wartość tych jonów w buforze reakcyjnym. Nie zaobserwowałem negatywnych skutków stosowania innych jonów takich jak Ca^{2+} , Mn^{2+} czy Zn^{2+} , które jednocześnie mogą być alternatywą dla jonów magnezu w niektórych reakcjach enzymatycznych. Uzyskane dane podsumowałem w postaci tabeli (Tabela 2.1) za pomocą, której można w szybki sposób dobrać najlepsze warunki eksperymentu.



Rys. 2-3. Optymalizacja eksperymentu wysokoprzepustowego. A) Krzywe kalibracyjne jonów fluorkowych rozpuszczonych w różnych buforach; B) Wpływ różnego rodzaju kationów dwuwartościowych na krzywą wzorcową (Tris-HCl pH 7,5); C) Stosunki maksymalnego sygnału (punkt 30 μM z krzywej kalibracyjnej) do tła (punkt 0 μM z krzywej kalibracyjnej) dla eksperymentów przedstawionych w punktach A i B; D) stabilność sondy TBDMS-FL w roztworach o różnym składzie w 30°C. Wykres przedstawia zmiany fluorescencji w czasie, natomiast zdjęcia obrazują stabilność sondy w (I) czystym DMSO, (II) mieszaninie DMSO:H₂O (9:1) oraz (III) mieszaninie DMSO:Tris-HCl (9:1) po 5 minutach i 1 godzinie. E) oraz F) wartość parametru Z' dla PDE-I oraz hDcpS w zoptymalizowanych warunkach.

Tabela 2.1. Wytyczne opracowane dla zaprojektowanego eksperymentu wysokoprzepustowego wykorzystującego NMPF oraz sondę fluorogeniczną.

Skład reakcji enzymatycznej	Optymalne stężenie substratu (NMPF)	30 – 60 μ M
	Akceptowane bufony	MES, HEPES, Tris-HCl pH 6,5-8
	Akceptowane składniki buforu	Jony metali: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} (do 10 mM) Mg^{2+} (do 2 mM) Stabilizatory białek (np. BSA), do stężenia 0,75 mg/ml Reagenty stopujące reakcję enzymatyczną: 5 mM EDTA, acetonitryl
	Należy unikać	pH powyżej 8 jonów Mg^{2+} w stężeniu powyżej 2 mM jonów octanowych, silnych kwasów, silnych zasad
Reakcja z sondą fluorogeniczną, TBDMS-FL	Optymalna objętość próbki do ilościowego oznaczenia jonów F^{-}	10 – 30 μ l
	Roztwór, w którym sonda jest stabilna	9:1 DMSO/Tris-HCl pH 7,6 (v/v)
	Roztwór, w którym sonda jest niestabilna	czyste DMSO DMSO:woda dejonizowana (9:1)
	Minimalna wymagana objętość DMSO w analizowanej mieszaninie	co najmniej 80%
	Warunki reakcji	60 min, 30°C, 300 rpm

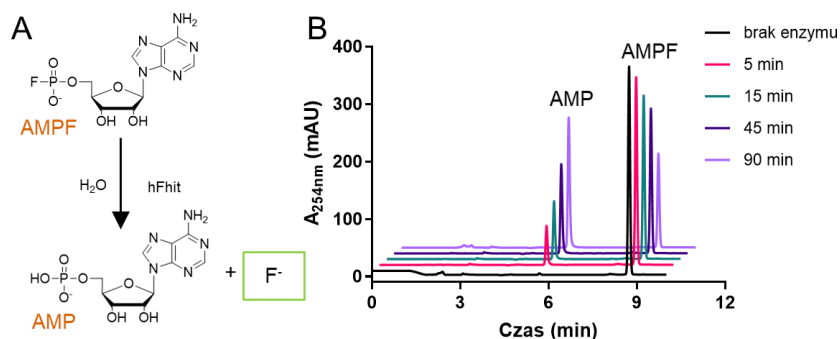
Do zweryfikowania, czy opracowana metoda badań przesiewowych może być zaadaptowana do formatu wysokoprzepustowego (HTS), niezbędne było wyznaczenie parametru Z' , który jest prostym statystycznym parametrem służącym do jakościowej oceny testu. Może on przyjąć wartości od $-\infty$ do 1, gdzie wynik powyżej 0,5 jest wystarczający i akceptowany dla eksperymentów HTS (193). Parametr Z' musiał być wyznaczony dla każdego z badanych enzymów ze względu na różnice w warunkach eksperymentów takich jak skład buforu, rodzaj substratu nukleotydowego czy czas trwania reakcji enzymatycznej (stopień przereagowania substratu), wynikające z aktywności danego enzymu. Aby wyznaczyć Z' wykonywałem 120 reakcji z aktywnym enzymem bez dodatku inhibitora (kontrola pozytywna) oraz 120 reakcji z czynnikiem denaturującym enzym (kontrola negatywna). Dla każdego z enzymów stężenie białka oraz czas trwania reakcji enzymatycznej zostały dobrane tak, aby stopień przereagowania substratu wyniósł 25-30%.

Wartości parametru Z' zostały obliczone na podstawie wzoru 2.1:

$$Z' = 1 - \frac{3 * \sigma_{poz} + 3 * \sigma_{neg}}{|\mu_{poz} - \mu_{neg}|}, \quad (2.1)$$

gdzie σ_{poz} oznacza odchylenie standardowe kontroli pozytywnej, σ_{neg} oznacza odchylenie standardowe kontroli negatywnej (zdenaturowany enzym), μ_{poz} oznacza średnią wartość fluorescencji kontroli pozytywnej, μ_{neg} oznacza średnią wartość fluorescencji kontroli negatywnej (193). Dokładne dane na temat warunków każdego z eksperymentów zawiera Tabela 2.2, z której można odczytać, iż otrzymane wartości Z' dla enzymów PDE-I (Rys. 2-3F), hDcpS (Rys. 2-3E), hFhit oraz AtFhit to kolejno 0,60, 0,63, 0,68 oraz 0,54, co spełnia warunek ($Z' > 0,5$) możliwości zastosowania zaprojektowanego eksperymentu do badań wysokoprzepustowych.

Omawiana metoda HTS została początkowo zastosowana do badań z dwoma enzymami, hDcpS oraz PDE-I, co zostało zebrane i przedstawione w postaci publikacji (192). W niniejszej rozprawie skupiłem się na enzymie Fhit, który hydrolizuje 5'-fluoromonofosforan adenozy (AMPF) do nukleotydu (AMP) oraz jonów fluorkowych (F^-) (Rys. 2-4). Uwalnianie jonów fluorkowych jest warunkiem koniecznym do wykorzystania sondy fluorogenicznej w zaprojektowanym eksperymencie wysokoprzepustowym.



Rys. 2-4. A) Schematycznie przedstawienie hydrolizy AMPF przez hFhit. B) Monitorowanie reakcji hydrolizy AMPF przez hFhit za pomocą HPLC.

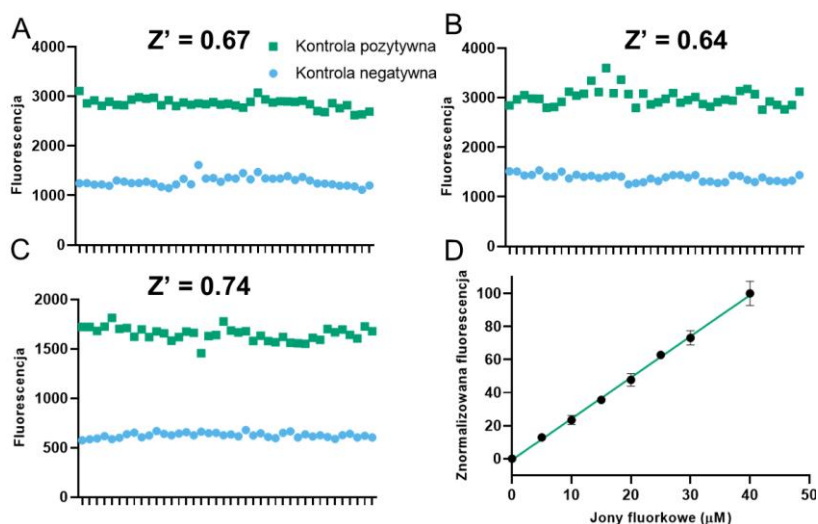
Optymalizacja eksperymentu HTS dla hFhit wymagała dobrania stężenia enzymu w taki sposób, aby stopień przereagowania AMPF (dla stężenia 60 μ M) po 60 minutach wynosił zawsze pomiędzy 25% a 30%. Wykonanie kilkudziesięciu eksperymentów dla różnego stężenia enzymu Fhit doprowadziło do ustalenia ostatecznych warunków, tj. 25 nM Fhit (Tabela 2.2). W ustalonych warunkach wykonano pomiary parametru Z' , którego średnia wartość z 3 powtórzeń wyniosła 0,68, co spełnia warunek eksperymentu wysokoprzepustowego ($>0,5$) (Rys. 2-5).

Należy również zaznaczyć, iż dla lepszej czytelności danych uzyskanych z badań przesiewowych bibliotek związków, intensywności fluorescencji przeliczono na tzw. procent inhibicji (%inhibicji) za pomocą wzoru 2.2. Dlatego najsilniejsze inhibitory są reprezentowane przez najwyższe „słupki”, a najsłabsze inhibitory przez kolumny danych o małych wartościach. Procent inhibicji obliczałem na podstawie poniższego wzoru:

$$\%_{\text{inhib}} = \frac{F_{\text{kon}} - F_{\text{inhib}}}{F_{\text{kon}} - F_{\text{tło}}} \times 100\%, \quad (2.2)$$

gdzie F_{kon} oznacza średnią wartość fluorescencji z reakcji kontrolnych (bez inhibitora), F_{inhib} oznacza wartość fluorescencji reakcji z badanym inhibitorem, $F_{\text{tło}}$ oznacza wartość fluorescencji tła (pomiar próbki z krzywej wzorcowej dla punktu 0 μ M jonów fluorkowych). Procent inhibicji może także przyjmować wartości ujemne, gdy reakcja nie jest hamowana przez badany ligand,

ale aktywowana. Wtedy fluorków jest więcej niż w reakcji kontrolnej bez inhibitora i wartość $\%_{\text{inhib}}$ jest mniejsza od zera.



Rys. 2-5. Eksperymenty z użyciem ludzkiego enzymu Fhit. A-C) Określenie parametru Z' na podstawie trzech niezależnych prób. Na osi x odłożono numer reakcji. D) Liniowa intensywność fluorescencji w funkcji stężenia jonów fluorkowych (z NaF).

Tabela 2.2. Warunki reakcji enzymatycznych w jakich przeprowadzano badania wysokoprzepustowe dla każdego z enzymów

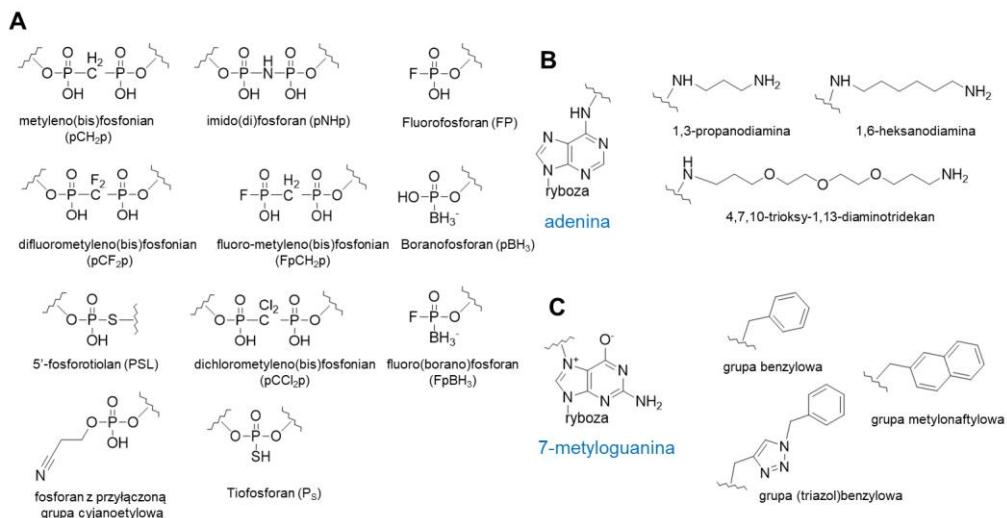
Enzym / stężenie	Substrat / stężenie	Inhibitor / stężenie	Bufor	Jony metali	Czas reakcji	Temp.	Wyrząsanie	Czynnik zatrzymujący reakcję	Wartość Z'
PDE-I / 2,5 µg/ml	AMPF / 30 µM	20 µM	50 mM Tris·HCl pH 7,5 0,75 mg/ml BSA	Ca ²⁺ / 10 mM	30 min	30°C	Tak / 300 rpm	5 mM EDTA pH 7,0	0,60
hDcpS / 25 nM	m ⁷ GMPF / 60 µM	20 µM	50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,75 mg/ml BSA	brak	55 min	30°C	Tak / 300 rpm	Acetonitryl 100 µl	0,63
hFhit / 25 nM	AMPF / 60 µM	20 µM	50 mM MES·KOH pH 6,5, 0,75 mg/ml BSA	Ca ²⁺ / 5 mM	60 min	30°C	Tak / 300 rpm	Acetonitryl 120 µl	0,68
AtFhit / 14 nM	m ⁷ GMPF / 60 µM	20 µM	50 mM MES·KOH pH 6,5, 0,75 mg/ml BSA	Ca ²⁺ / 5 mM	40 min	30°C	Tak / 300 rpm	Acetonitryl 120 µl	0,54

2.2.2 Biblioteki związków

Potencjalnymi inhibitorami badanych enzymów były związki głównie pochodzenia nukleotydowego, które zostały otrzymane i zebrane na przestrzeni lat w Laboratorium Chemii Bioorganicznej na Wydziale Fizyki, Uniwersytetu Warszawskiego. Dzięki temu jest to jedyny w swoim rodzaju zbiór tego typu biocząsteczek służący do badania białek, dla których naturalnymi ligandami są nukleotydy i ich pochodne. Biblioteka 1 (BZ-1) składa się łącznie z 76 związków (Załącznik 1, Tabela Z1) i została wykorzystana do badań nad enzymem PDE-I oraz ludzkim DcpS, a wyniki tych eksperymentów stały się przedmiotem publikacji w *Organic & Biomolecular Chemistry* (192). Następnie, opracowaną metodę HTS zaadaptowałem do badań z innymi enzymami, w tym ludzkim oraz roślinnym Fhit. Na przestrzeni kilku lat biblioteka BZ-1 została rozbudowana do 141 różnych cząsteczek, tworząc tym samym bibliotekę związków 2 (BZ-2) (Załącznik 2, Tabela Z2). W celu uproszczenia analizy danych związki podzielono grupami ze względu na rodzaj zasady azotowej nukleotydu i są to:

- analogi adeninowe,
- analogi guaninowe,
- analogi uracynowe,
- analogi zawierające 7-metyloguaninę,
- analogi zawierające 7-benzyloguaninę,
- analogi zawierające 7-benzyloguaninę oraz triazol, oba podstawniki w pozycji N7 guaniny,
- nukleotydo-cukry,
- inne związki takie jak: NAD⁺, kwas foliowy, RG3039 (bardzo silny inhibitor enzymu DcpS);

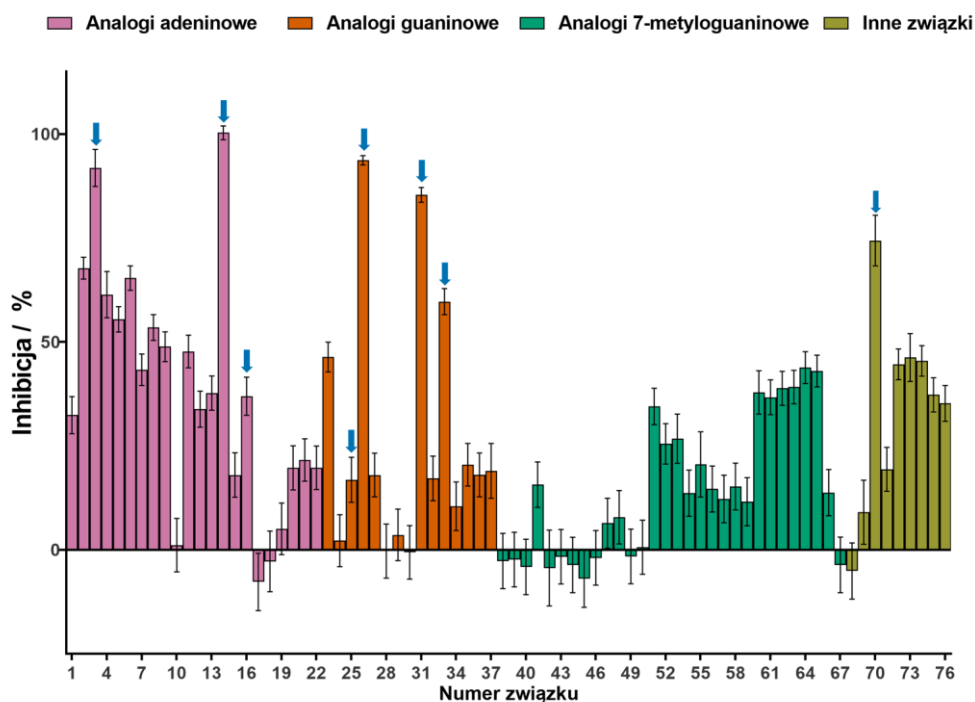
Ponadto, niektóre ze związków posiadały dodatkowe modyfikacje w obrębie zasady azotowej (adeniny lub 7-metyloguaniny), a w szczególności mostka fosforanowego, co zostało zaprezentowane na Rys. 2-6.



Rys. 2-6. Modyfikacje chemiczne występujące w nukleotydach wchodzących w skład bibliotek BZ-1 oraz BZ-2. A) Modyfikacje mostkowe i niemostkowe występujące w obrębie mostka/łańcucha fosforanowego. W nawiasach podano oznaczenie skrótowe używane w tekście; B) Linkery diaminowe będące modyfikacjami nukleotydów zawierających adeninę. Linker znajduje się w pozycji N6 adeniny; C) Podstawniki znajdujące się w pozycji N7 guaniny, będące analogami 7-metyloguaniny. Grupa benzylowa mogła zawierać dodatkowe atomy w miejscach atomów wodoru takie jak chlor, fluor lub grupy niepolarne metyl, izopropyl i inne, co zostało dokładnie zaprezentowane w tabeli Z1 oraz Z2.

2.2.3 Badania HTS – enzym PDE-I

Fosfodiesteraza z jadu węża I (PDE-I) została wykorzystana jako enzym modelowy do walidacji metody HTS ze względu na szerokie spektrum substratowe oraz komercyjną dostępność enzymu. Krótki opis funkcji i naturalnych substratów tego enzymu przedstawiono w rozdziale 1.6.1.



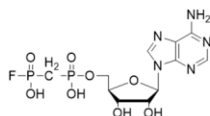
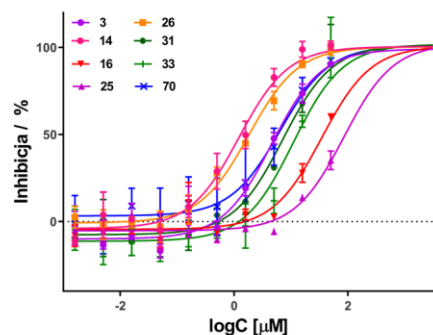
Wykres 2-1. Wynik badania przesiewowego biblioteki składającej się z 76 związków dla enzymu PDE-I. Struktury związków oraz dokładne wartości procentu inhibicji przedstawiono w załączniku w postaci tabeli Z1. Niebieskimi strzałkami oznaczono związki, dla których zostały wyznaczone wartości IC_{50} .

Wyniki badań przesiewowych biblioteki związków BZ-1 umożliwiły identyfikację co najmniej kilku inhibitorów, głównie spośród nukleotydów zawierających adeninę lub guanozynę (Wykres 2-1). Dokładne wartości zostały zebrane w postaci tabeli Z1 na końcu niniejszej rozprawy doktorskiej i to w odniesieniu do niej należy analizować wyniki opisane w tym podrozdziale. Otrzymane dane dobrze odzwierciedlają dane literaturowe, w których pokazano, że naturalne NTP są nie tylko substratami dla fosfodiesterazy, ale również słabymi inhibitorami (164), co bardzo dobrze widać na przykładzie ATP (1), dla którego procent inhibicji wyniósł 32%, natomiast dla odpornego na hydrolizę analogu S_P -ATPαS (3) już 92%. Najlepszymi

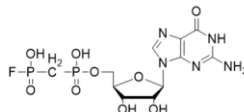
inhibitorami okazały się analogi zawierające ugrupowanie 5'-(2-fluoro-1,2-metylenobisfosfonianowe) (oznaczane w skrócie jako FpCH₂p), gdzie kolejno dla ApCH₂pF (**14**) inhibicja wyniosła 100%, a dla GpCH₂pF (**26**) 94%. Jest to wynik dość niespodziewany, a zidentyfikowane inhibitory są pierwszymi tego typu związkami nukleotydowymi hamującymi aktywność fosfodiesterazy PDE-I. Z otrzymanych danych wnioskuje się, że kluczowe może być podstawienie atomu fluoru w miejsce atomu tlenu, w terminalnym fosforanie, a co za tym idzie zamaskowanie jednego ładunku ujemnego. Inhibicja dla niefluorowanego analogu GpCH₂p (**25**) była już znacznie niższa (17%) w porównaniu z fluorofosforanową cząsteczką nukleotydu. Podobną zależność obserwuje się dla analogu o wydłużonym łańcuchu fosforanowym, gdzie pomiędzy grupą fluorofosforanową, a metylenobisfosfonianową znajduje się dodatkowa grupa fosforanowa. Omawiany związek, GpCH₂ppF, charakteryzuje się inhibicją na poziomie 18%, natomiast jego niefluorowany odpowiednik, GpCH₂pp (**24**), zdecydowanie nie jest inhibitorem (%_{inhibicji} = 2%). Na podstawie powyższych przykładów można zauważyć, iż nie tylko brak fluoru obniża inhibicję, ale również wydłużenie samego łańcucha fosforanowego jest niekorzystne. Dinukleotydem, na który warto zwrócić uwagę, jest związek zbudowany z dwóch guanozyn połączonych mostkiem 5'5'-trifosforanowym, w którym na fosforanie β umieszczono grupę boranową (BH₃⁻). Procent inhibicji GppBH₃pG (**33**) wyniósł 60% i jest to kolejny nieoczywisty przykład inhibitora enzymu PDE-I. Wśród nienukleotydowych analogów dość wysokim wynikiem inhibicji wykazał się kwas foliowy (**70**, %_{inhibicji} = 74%).

Kolejnym krokiem badań była ewaluacja najlepszych zidentyfikowanych inhibitorów przy pomocy opracowanej metody wysokoprzepustowej, wprowadzając w eksperyment niewielką modyfikację. Dla cząsteczek o największej inhibicji wyznaczono parametry IC₅₀, stosując na płycie 96-dołkowej 10-punktowe rozcieńczenie logarytmiczne danego związku. W ten sposób otrzymane wartości fluorescencji przekształcano ponownie na procent inhibicji oraz odkładano na wykresie w zależności od stężenia inhibitora (skala logarytmiczna). Parametr IC₅₀ wyznaczano poprzez dopasowanie standardowego trójparametrowego równania opisującego hamowanie reakcji enzymatycznej (ang. *dose-response*), które zostało przedstawione w części eksperymentalnej (rozdział 5.9.6). Cząsteczki, dla których wyznaczono wartości IC₅₀ przedstawiono na Rys. 2-7. IC₅₀ dla najlepszych inhibitorów wyniosło 1,2 ± 0,3 μM oraz 1,8 ± 0,2 μM kolejno dla ApCH₂pF oraz GpCH₂pF, natomiast wartość dla analogu GpCH₂p (IC₅₀ = 90 ± 20 μM) była znacznie wyższa, co jest zgodne z danymi uzyskanymi w eksperymencie HTS.

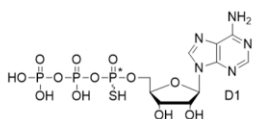
Inhibitorami charakteryzującymi się wartościami IC_{50} poniżej 10 μM były związki ATP α S D1 (IC_{50} = 4,6 $\pm$ 0,8 μM), Gp β pF D1 (IC_{50} = 7,0 $\pm$ 1,8 μM) oraz kwas foliowy (IC_{50} = 6,4 $\pm$ 1,0 μM).



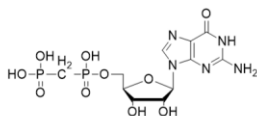
14 (ApCH₂pF)
 IC_{50} = 1.21 $\pm$ 0.26 μM



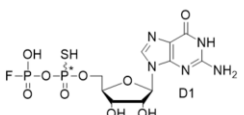
26 (GpCH₂pF)
 IC_{50} = 1.82 $\pm$ 0.24 μM



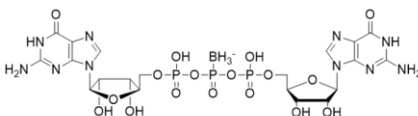
3 (ATP α S D1)
 IC_{50} = 4.58 $\pm$ 0.76 μM



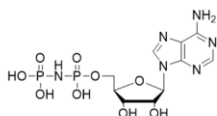
25 (GpCH₂p)
 IC_{50} = 85 $\pm$ 23 μM



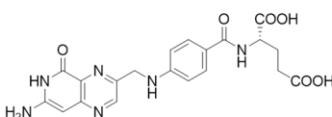
31 (Gp β pF D1)
 IC_{50} = 7.10 $\pm$ 1.84 μM



33 (Gpp_{BH3}pG)
 IC_{50} = 10.9 $\pm$ 3.5 μM



16 (GpNHp)
 IC_{50} = 35 $\pm$ 8 μM



70 (kwas foliowy)
 IC_{50} = 6.39 $\pm$ 0.92 μM

Rys. 2-7. Charakterystyka związków wybranych na podstawie wysokoprzepustowego badania przesiewowego biblioteki BZ-1 dla enzymu PDE-I. Związki występowały w postaci soli amonowych (NH₄⁺). Dla związków 3 oraz 31 gwiazdką oznaczono centrum stereogeniczne na atomie fosforu. Oznaczenia D1 oraz D2 dopisane do związków oznaczają, iż dany nukleotyd występuje w postaci dwóch diastereoizomerów ze względu na centrum asymetrii na atomie fosforu. Związki D1 i D2 różnią się czasem retencji na RP HPLC, dlatego związek o czasie krótszym oznaczono D1, a związek o czasie retencji dłuższym oznaczono D2.

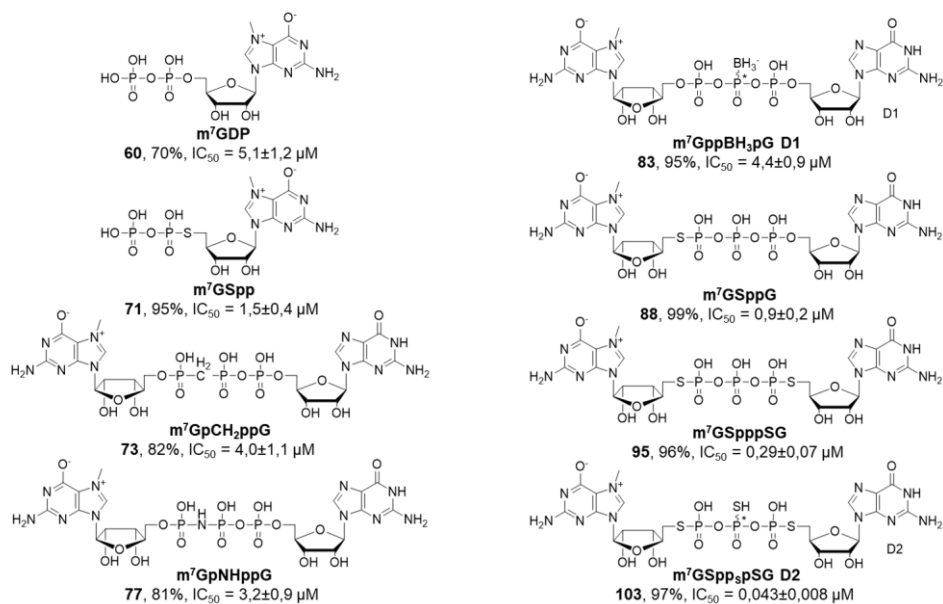
Opracowanie wysokoprzepustowego badania przesiewowego na przykładzie enzymu PDE-I okazało się korzystne z kilku względów. Została udowodniona podstawa całego eksperymentu, w której założeniem było wykorzystanie fluorofosforanowego analogu nukleotydu jako substratu dla PDE-I, a detekcja postępu reakcji odbywała się poprzez analizę intensywności fluorescencji, która z kolei w sposób liniowy zależała od stężenia jonów fluorkowych w roztworze. Zakwalifikowanie eksperymentu do kategorii badań wysokoprzepustowych było możliwe po optymalizacji warunków reakcji enzymatycznej takich jak długość eksperymentu i skład buforu, o czym ostatecznie świadczy wartość parametru Z' równa 0,60. Wynik samego

badania HTS jest ciekawy nie tylko ze względu na wskazanie najlepszych inhibitorów, ale dostarcza on także bardzo istotnych informacji na temat preferencji substratowej fosfodiesterazy z jadu węża. Jako kolejne obiekty badań wybrałem enzymy o większym znaczeniu biologicznym: ludzki enzym DcpS oraz ludzki i roślinny enzym Fhit, dla których wyniki zostaną opisane w kolejnych podrozdziałach.

2.2.4 Badania HTS – enzym hDcpS

Biblioteka związków BZ-2, (na którą składały się związki z biblioteki BZ-1), została przeszukana pod względem cząsteczek hamujących aktywność ludzkiego enzymu DcpS (Wykres 2-2). Wyniki badań BZ-1 zostały przedstawione w pracy opublikowanej w *Organic & Biomolecular Chemistry* (192), a wykonała je dr Anna Wojtczak (z d. Nowicka). W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiłem wyniki badań biblioteki BZ-2, aby w całości pokazać potencjał opracowanej metody wysokoprzepustowej. Trzeba zaznaczyć, że część związków znajdujących się w BZ-2, w tym najlepsze inhibitory DcpS, stały się przedmiotem publikacji autorstwa Wojtczak B. et. al. (194). Badania przeprowadzano analogicznie jak dla enzymu PDE-I, gdzie najlepsze inhibitory zostały scharakteryzowane poprzez wyznaczenie wartości IC_{50} . Jedyną różnicą jest zastosowanie buforu o innym składzie oraz zmiana fluorowanej sondy molekularnej na m^7GMPF (Tabela 2.2). Analizując dane przedstawione na Wykres 2-2 wyraźnie widać, że warunkiem koniecznym do wystąpienia właściwości inhibitorowych jest obecność 7-metyloguanozyny w strukturze związku, co jest zgodne z rolą biologiczną DcpS jako enzymu degradującego kap 7-metyloguaninowy. Spośród mononukleotydów najsilniejszymi inhibitorami były związki m^7GDP (**60**, %inhibicji = 70%, IC_{50} = $5,2 \pm 1,2 \mu M$) oraz jego 5'-fosforotiolanowy analog m^7GSDP (**71**, %inhibicji = 95%, IC_{50} = $1,5 \pm 0,4 \mu M$). Z kolei analogi dinukleotydowe, będące jednocześnie najbliższymi strukturalnie związkami do naturalnych cząsteczek, z którymi oddziałuje w komórkach enzym DcpS, również wykazały się bardzo wysokimi procentami inhibicji. Warto zwrócić uwagę na odporne na hydrolizę analogi m^7GpppG , które zawierały modyfikację w obrębie mostka fosforanowego i są to: m^7GpCH_2ppG (**73**, %inhibicji = 82%, IC_{50} = $4,0 \pm 1,1 \mu M$) oraz $m^7GpNHppG$ (**77**, %inhibicji = 81%, IC_{50} = $3,2 \pm 0,9 \mu M$). Odrębną klasą analogów o wysokich wartościach procentów inhibicji były dinukleotydy 7-metyloguaninowe zawierające w swojej strukturze ugrupowanie 5'-tiofosfoestrowe (ang. *phosphorothiolate*, PSL). Przykładowo związek posiadający grupę PSL od strony

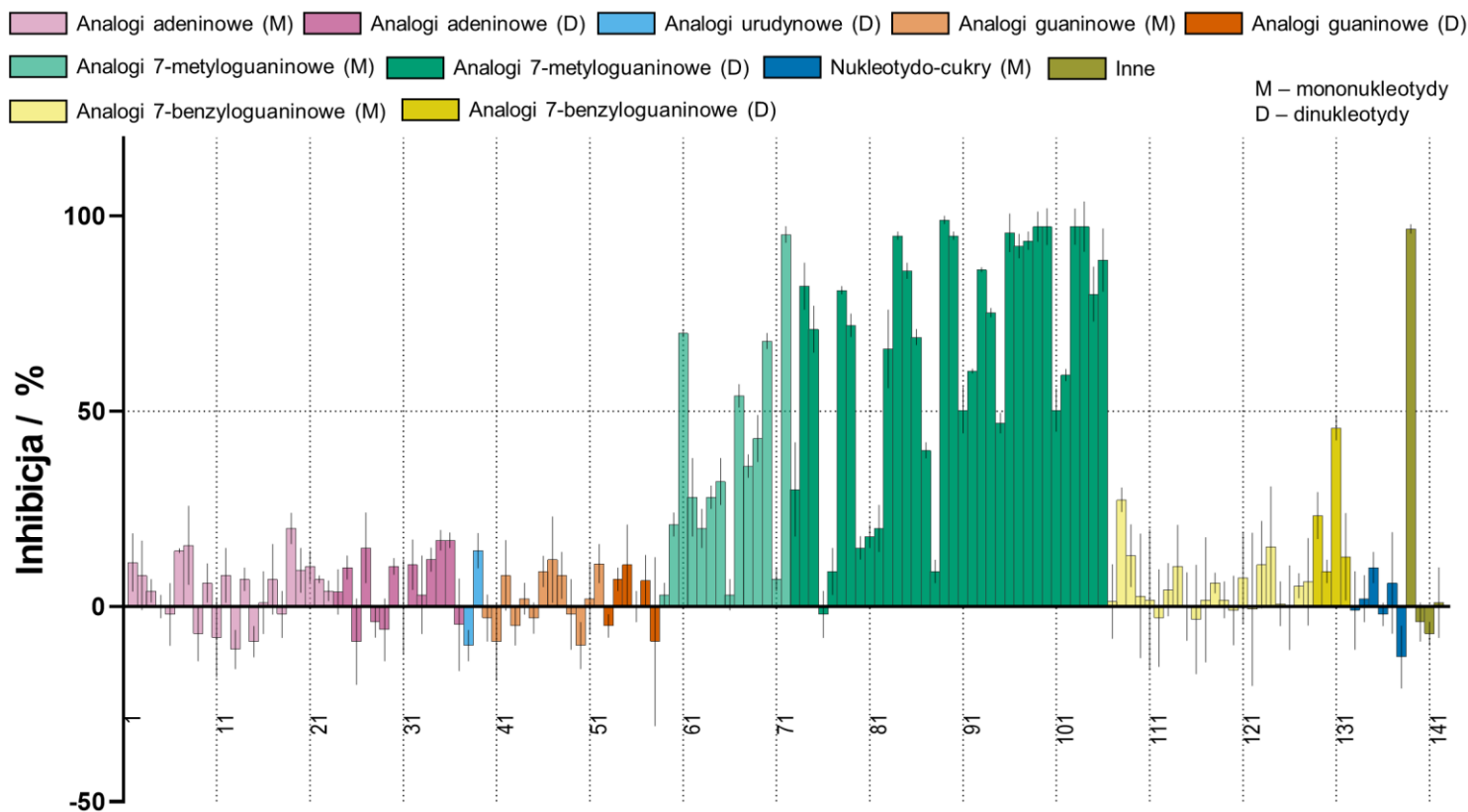
7-metyloguaniny (m^7 GSp_{pp}G, **88**) okazał się silnym inhibitorem z wartością IC_{50} na poziomie około 0,87 μ M, co jest porównywalne ze zidentyfikowanym już z wcześniej najsilniejszym inhibitorem nukleotydowym m^7 GppBH₃pG D1 (**83**) z IC_{50} równym $1,0 \pm 0,2 \mu$ M (192). Lepszy efekt uzyskano poprzez wprowadzenie dwóch grup PSL do cząsteczki dinukleotydu, gdzie procent inhibicji dla związku m^7 GSp_{pp}SG (**95**) wyniósł 96% (lub 106% według (194)), a wartość IC_{50} równała się $0,3 \pm 0,1 \mu$ M, co jest wynikiem o ponad 3 razy lepszym od związku **88**. Najkorzystniejszym rozwiązaniem ze względu na zwiększoną siłę inhibicji okazało się połączenie dwóch modyfikacji PSL z jedną grupą tiofosforanową (PS) umieszczoną w obrębie mostka fosforanowego łączącego dwa nukleozydy. Wartość inhibicji dla związku m^7 GSp_pSG D2 (**103**) wynosiła 97% (109% według (194)) wraz z IC_{50} równym 43 nM, co jest porównywalne do najlepszego nienukleotydowego inhibitora enzymu DcpS RG3039 ($IC_{50} = 48$ nM wyznaczone taką samą procedurą eksperymentalną). Struktury najsilniejszych inhibitorów wraz z wartościami IC_{50} zostały przedstawione na Rys. 2-8.



Rys. 2-8. Omawiane najlepsze inhibitory ludzkiego enzymu DcpS. Podany został numer związku oraz wartość inhibicji – dane zgodne z tabelą Z2 oraz wartość IC_{50} na podstawie (192) lub (194).

Pomimo iż badania nad enzymem DcpS nie były głównym zagadnieniem niniejszej rozprawy doktorskiej, to uzyskane wyniki mogą być cenną wskazówką do projektowania inhibitorów dla innych enzymów, które należą do tej samej rodziny białek, a mianowicie HIT (ang. *Histidine*

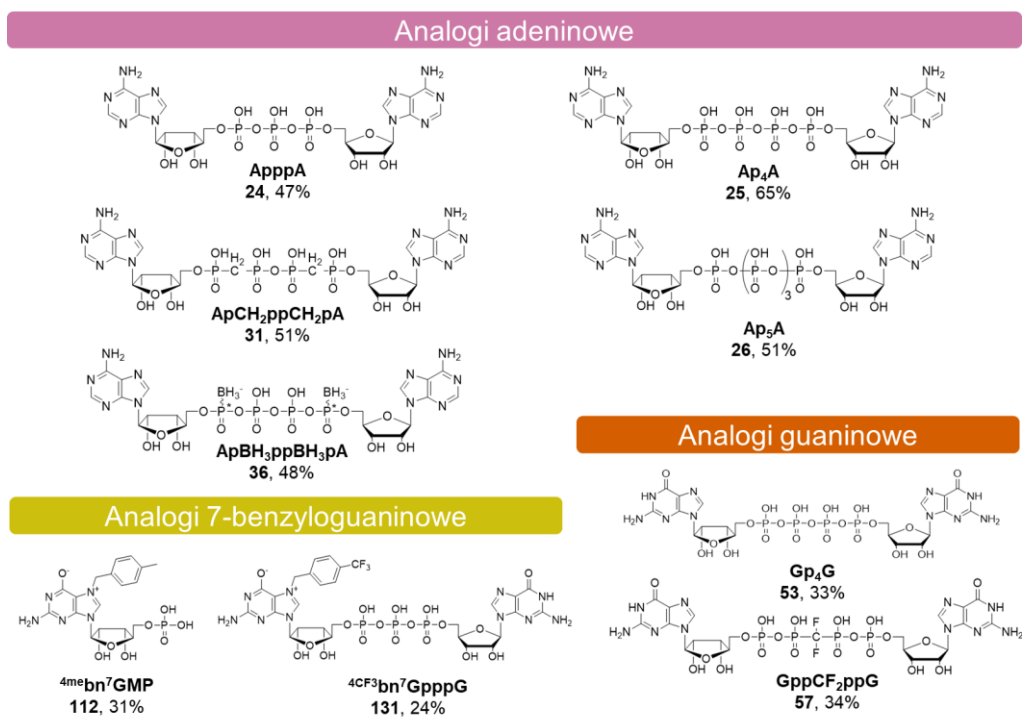
Triad Proteins). Ponadto, porównanie wyników badań HTS tych samych bibliotek związków, ale różnych enzymów umożliwia porównanie/profilowanie preferencji strukturalnych DcpS i Fhit, co z kolei jest przydatne w kontekście zrozumienia funkcji badanych enzymów w procesie degradacji mRNA czy metabolizmie dinukleotydów w komórkach. W dalszej części opisu wyników badań własnych zostaną przedstawione rezultaty badania wysokoprzepustowego dla białek ludzkiego i roślinnego Fhit.



Wykres 2-2. Wynik wysokoprzepustowego badania przesiewowego biblioteki BZ-2 wobec hDcpS. Pionowe kropkowane linie zostały umieszczone co 10-ty związek zaczynając od zera. Im wyższy słupek tym silniejszy inhibitor.

2.2.5 Badania HTS – hFhit oraz AtFhit

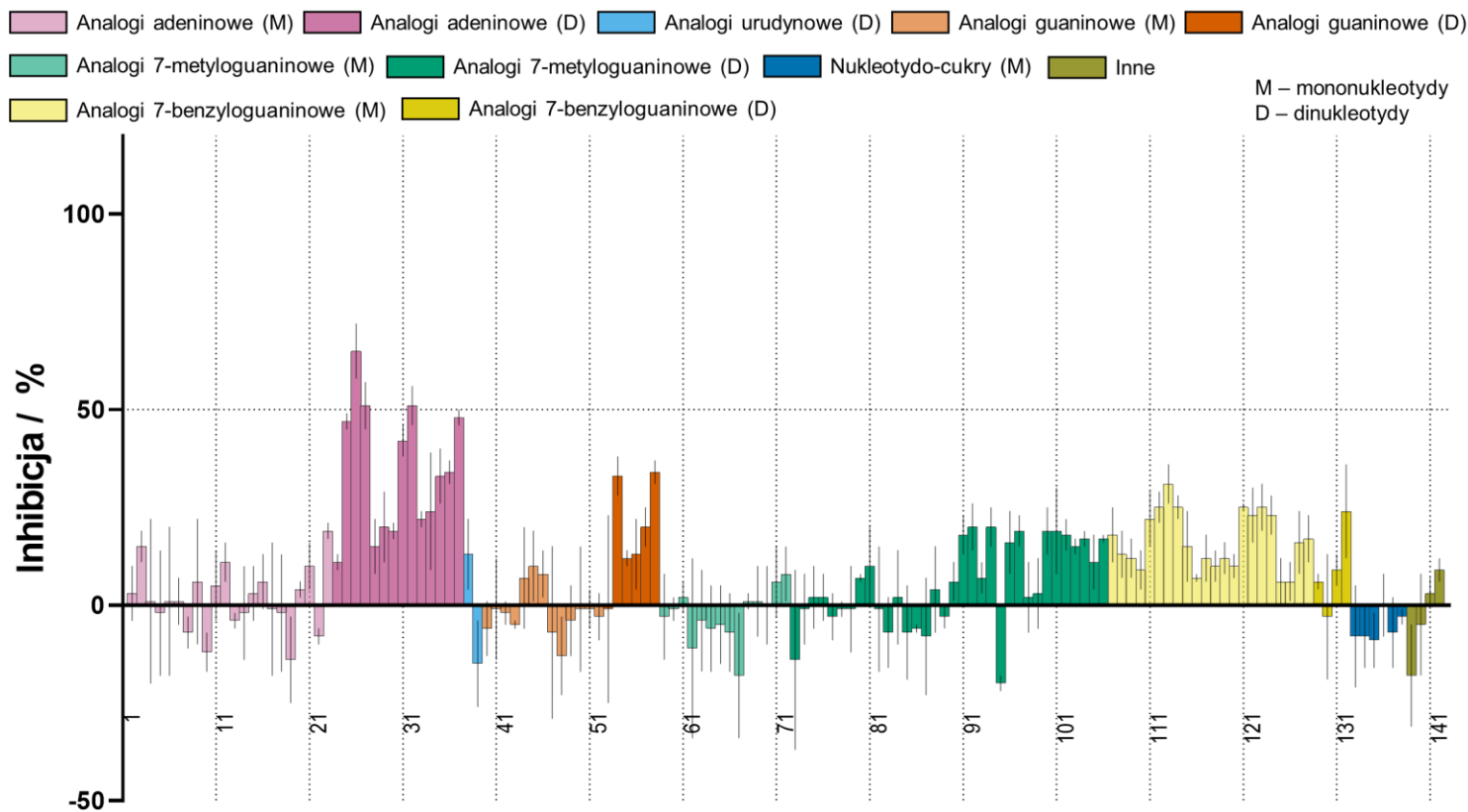
Biblioteka BZ-2 (Tabela Z2) została przeszukana pod względem potencjalnych inhibitorów enzymów ludzkiego (Wykres 2-3) i roślinnego Fhit (Wykres 2-4). Zgodnie z oczekiwaniami najwyższe wartości inhibicji związków wobec ludzkiego Fhit zidentyfikowano w puli analogów adeninowych i są to naturalne dinukleotydy adeninowe różniące się liczbą grup fosforanowych (od 3 do 5) oraz modyfikowane w mostku fosforanowym analogi AppppA (**25**, %_{inhibicji} = 65%), tj. ApCH₂ppCH₂pA (**31**, %_{inhibicji} = 51%) oraz ApBH₃ppBH₃pA (**36**, %_{inhibicji} = 48%). Podwyższonymi wartościami inhibicji charakteryzowały się dwa analogi guaninowe, gdzie pierwszy to GppppG (**53**, %_{inhibicji} = 33%), a drugi to jego modyfikowany grupą difluorometyleno(bis)fosfonianową (P-CF₂-P) odpowiednik (**57**, %_{inhibicji} = 34%). Warto również wyróżnić mononukleotydy



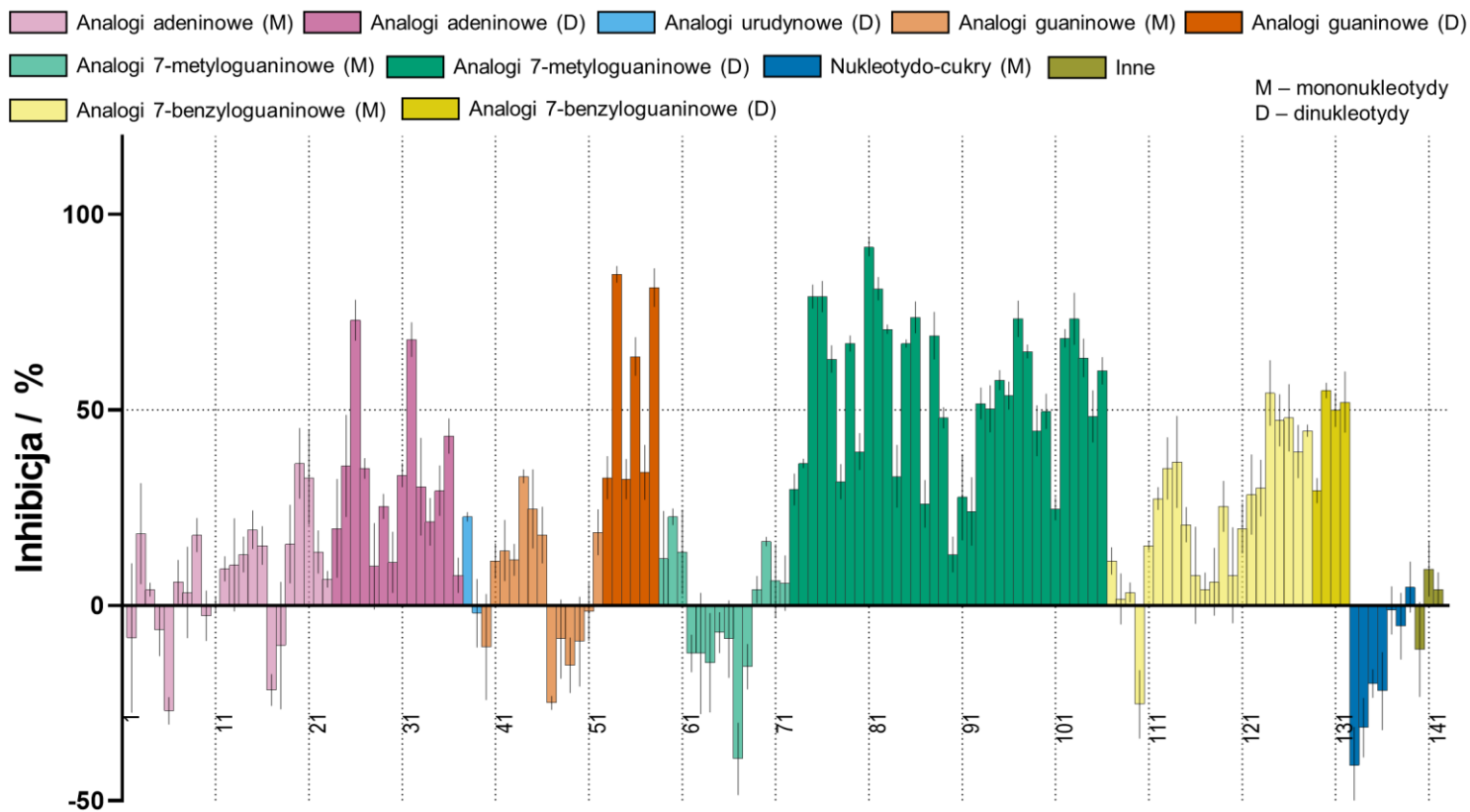
Rys. 2-9. Najlepsze wyselekcjonowane inhibitory ludzkiego enzymu Fhit. Podano numery związków z biblioteki BZ-2 (Tabela Z2) oraz uzyskane procenty inhibicji. Wszystkie związki występowały w postaci soli amonowych (NH₄⁺).

guaninowy z grupą benzyłową w pozycji N7 zasady azotowej (**112**, %_{inhibicji} = 31%) oraz dinukleotydy guaninowy, gdzie na jednej z zasad azotowych w pozycji N7 zostało wprowadzone ugrupowanie 4-trifluorometylobenzyłowe (**131**, %_{inhibicji} = 24%). Na Rys. 2-9 przedstawiono struktury wyżej omówionych cząsteczek wraz z procentami inhibicji. Jak można zauważyć

związkami, które najsilniej konkurowały o miejsce aktywne z substratem były naturalne analogi Ap_nA (**24-26**). Wprowadzenie dodatkowych modyfikacji takich jak metyleno(bis)fosfonian czy grupa boranowa nie zwiększyło poziomu inhibicji, a wręcz przeciwnie, obniżyło go o niemal 15%. Pomimo zróżnicowanej biblioteki BZ-2, wśród 141 związków nie udało się znaleźć silnego inhibitora enzymu hFhit.



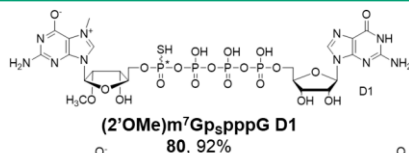
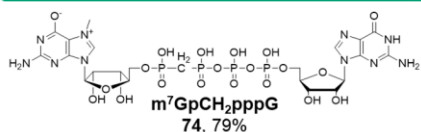
Wykres 2-3. Wynik wysokoprzepustowego badania przesiewowego biblioteki BZ-2 wobec hFhit. Pionowe kropkowane linie zostały umieszczone co 10-ty związek zaczynając od zera. Im wyższy słupek tym silniejszy inhibitor.



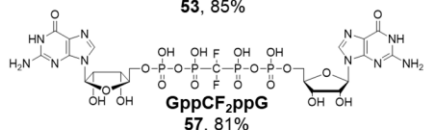
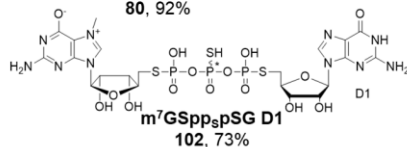
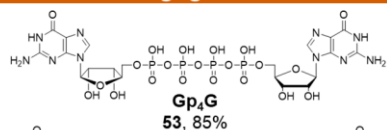
Wykres 2-4. Wynik wysokoprzepustowego badania przesiewowego biblioteki BZ-2 wobec AtFhit. Pionowe kropkowane linie zostały umieszczone co 10-ty związek zaczynając od zera. Im wyższy słupek tym silniejszy inhibitor.

Zupełnie odmienne i dość niespodziewane wyniki uzyskano dla roślinnego Fhit (AtFhit). AtFhit jest homologiem ludzkiego enzymu Fhit, dlatego uważany jest za hydrolazę diadenozynopolifosforanów. Roślinny Fhit jest również podejrzany o pełnienie funkcji u roślin podobnej jak DcpS w komórkach ludzkich. Do dnia dzisiejszego nie zidentyfikowano roślinnego homologu enzymu DcpS. Wyniki badań wysokoprzepustowych przedstawiają się następująco. Naturalny analog Ap_4A (**25**) hamował reakcję z 65% skutecznością, a dla analogu z dwiema grupami metyleno(bis)fosfonianowymi (**31**) zaobserwowano inhibicję zwiększoną o 3%. Niemniej jednak, oba dinukleotydy adeninowe nie są najlepszymi wynikami uzyskanymi podczas wysokoprzepustowego badania przesiewowego. Zdecydowanie najsilniejszym inhibitorem był modyfikowany siarką tetrafosforanowy analog końca 5' mRNA – $\text{m}^7\text{Gp}_5\text{pppG}$ D1 (**80**, $\%_{\text{inhibicji}} = 92\%$). Również wśród analogów 7-metyloguaninowych na wyróżnienie zasługuje związek $\text{m}^7\text{GpCH}_2\text{pppG}$ (**74**, $\%_{\text{inhibicji}} = 79\%$) oraz analog posiadający trzy atomy siarki w obrębie mostka fosforanowego – $\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{pSG}$ D1 (**102**, $\%_{\text{inhibicji}} = 73\%$). Dwa analogi guaninowe, na które warto zwrócić uwagę to tetrafosforanowy dinukleotyd guaninowy (**53**) oraz jego modyfikowany odpowiednik zawierający grupę difluorometyleno(bis)fosfonianową (**57**). GppppG hamował reakcję z 85% skutecznością, natomiast GppCF₂ppG z 81%. Struktury omówionych dinukleotydów przedstawiono na Rys. 2-10.

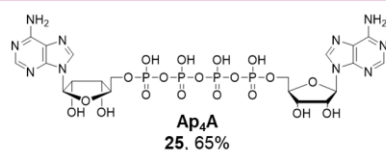
Analogi 7-metyloguaninowe



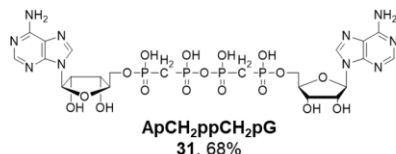
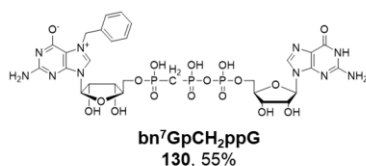
Analogi guaninowe



Analogi adeninowe



Analogi 7-benzylguaninowe



Rys. 2-10. Najlepsze wyselekcjonowane inhibitory enzymu roślinnego Fhit. Podano numery związków z biblioteki BZ-2 (Tabela Z2) oraz uzyskane procenty inhibicji. Wszystkie związki występowały w postaci soli amonowych (NH₄⁺).

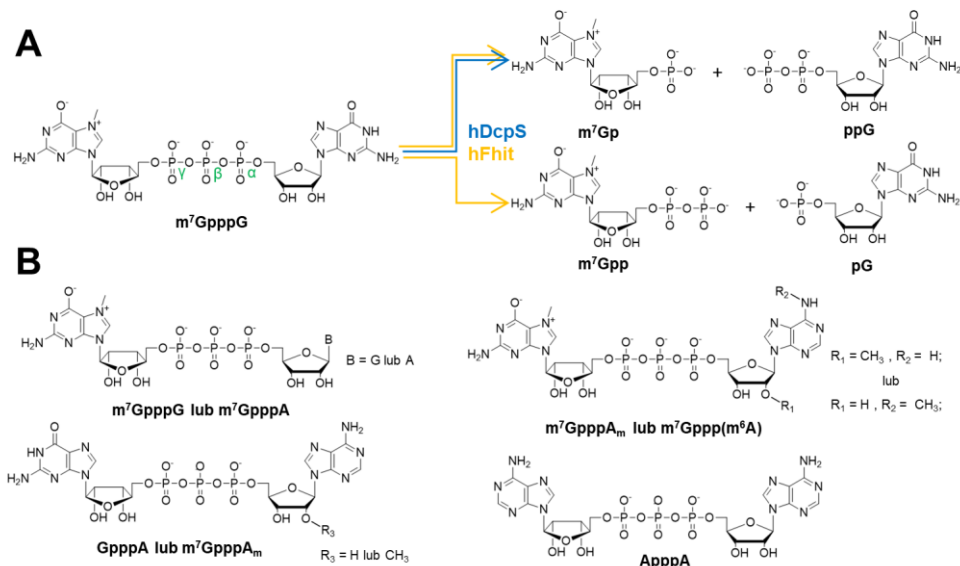
2.2.6 Porównanie profili substratowych enzymów z rodzin HIT

Zaletą metody wysokoprzepustowej jest nie tylko możliwość wyselekcjonowania najsilniejszych inhibitorów, ale także określenia preferencji substratowych na podstawie struktur chemicznych związków. Można to zauważyć poprzez porównanie inhibitorów dla zbadanych enzymów, tj. hDcpS, hFhit oraz AtFhit. Pomimo, że badane związki należą do tej samej rodziny białek, tj. HIT (ang. *Histidine Triad Protein*), dla których wspólnym motywem jest budowa enzymatycznego centrum katalitycznego, składającego się z trzech histydyn, to rodzaje zasad azotowych i akceptowanych modyfikacji chemicznych wprowadzonych w obręb całego nukleotydu są zupełnie różne. Ludzki enzym Fhit, będący hydrolazą diadenozynopolifosforanów, najsilniej wiąże niemodyfikowane dinukleotydy purynowe (adeninowe lub guaninowe), a uzyskane wyniki sugerują brak preferencji substratowej w stronę nukleotydów zbudowanych z innych zasad azotowych niż adenina. Ludzki DcpS, którego naturalnymi substratami są krótkie końce 5'-mRNA zakończone 7-metyloguanozyną

również wykazuje preferencję w stosunku do dinukleotydów, ale warunkiem koniecznym wystąpienia inhibicji jest co obecność co najmniej jednej reszty m⁷G. Ciekawe wyniki otrzymałem dla roślinnego Fhit, który podobnie jak ludzki odpowiednik uważany jest za hydrolazę diadenozyno polifosforanów. Poza oczywistymi przykładami najlepszych inhibitorów takich jak ApCH₂pppA (**74**, %_{inhibicji} = 79%), wśród silnych inhibitorów znalazły się również analogi guaninowe, 7-metyloguaninowe oraz 7-benzylguaninowe, co jest dość zaskakującym wynikiem. Zdolność roślinnego Fhit do rozpoznawania innych zasad azotowych w miejscu wiążącym poza adeniną sugeruje nieco odmienną lub bardziej wszechstronną rolę tego białka w komórkach roślinnych. AtFhit może pełnić rolę regulatorową dinukleotydów adeninowych oraz guaninowych, ale również jego funkcja może się skupiać wokół analogów 7-metyloguaninowych, tak jak jest to w przypadku enzymu DcpS. Nie jest wykluczone, że rola AtFhit w roślinach pokrywa się z rolą ludzkiego DcpS w komórkach ludzkich, tzn. jest enzymem, który bierze udział w ścieżkach degradacji mRNA. Dość niespodziewane i interesujące wyniki na pewno są dobrym wstępem do dalszych badań nad AtFhit, które być może zostaną rozpoczęte w przyszłości.

Podatność na degradację enzymatyczną oraz regioselektywność hydrolizy analogów dinukleotydowych została dokładniej przebadana na przykładzie ludzkich enzymów, a zaprezentowane niżej wyniki zostały wykonane przez mgr Marcelinę Bednarczyk. Wykonano szereg eksperymentów enzymatycznych z enzymami hFhit oraz hDcpS w obecności różnych substratów (dla niskiego i wysokiego stężenia każdego z nich), a postęp reakcji monitorowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Do badań wybrano dinukleotydy zawierające 7-metyloguaninę: m⁷GpppG oraz m⁷GpppA, ich metylowane w obrębie adenozyyny analogi (m⁷GpppA_m oraz m⁷Gppp(m⁶A)), dinukleotyd adeninowy (ApppA) oraz dinukleotydy GpppA i GpppA_m (Rys. 2-11B). Trzeba zaznaczyć, że związki zawierające 7-metyloguaninę są dinukleotydami budującymi koniec 5' mRNA oraz gromadzą się w komórkach w wyniku degradacji RNA poprzez egzozom (ścieżka degradacji w kierunku 3' do 5' RNA) (195). ApppA jest naturalnym substratem Fhit, co zostało wielokrotnie zaznaczone w pracy (177). Natomiast GpppA oraz GpppA_m są produktami rozkładu niepoprawnie zbudowanego RNA, a enzymem dekapującym tego typu cząsteczki RNA jest na przykład DXO (196-198). Jak można zauważyć dobór związków do badań wykraczał poza te znajdujące się w bibliotece BZ-2. Dinukleotydy zostały dobrane w taki sposób, aby po pierwsze potwierdzić zdolność hydrolizy naturalnych

substratów enzymów, sprawdzić, czy hFhit oraz hDcpS hydrolizują inne dinukleotydy i jeżeli tak, określić regioselektywność i kinetykę takiego przebiegu reakcji. Zebrane wyniki mogą pomóc w zrozumieniu roli enzymu Fhit w komórkach, która do dziś nie jest dokładnie znana.



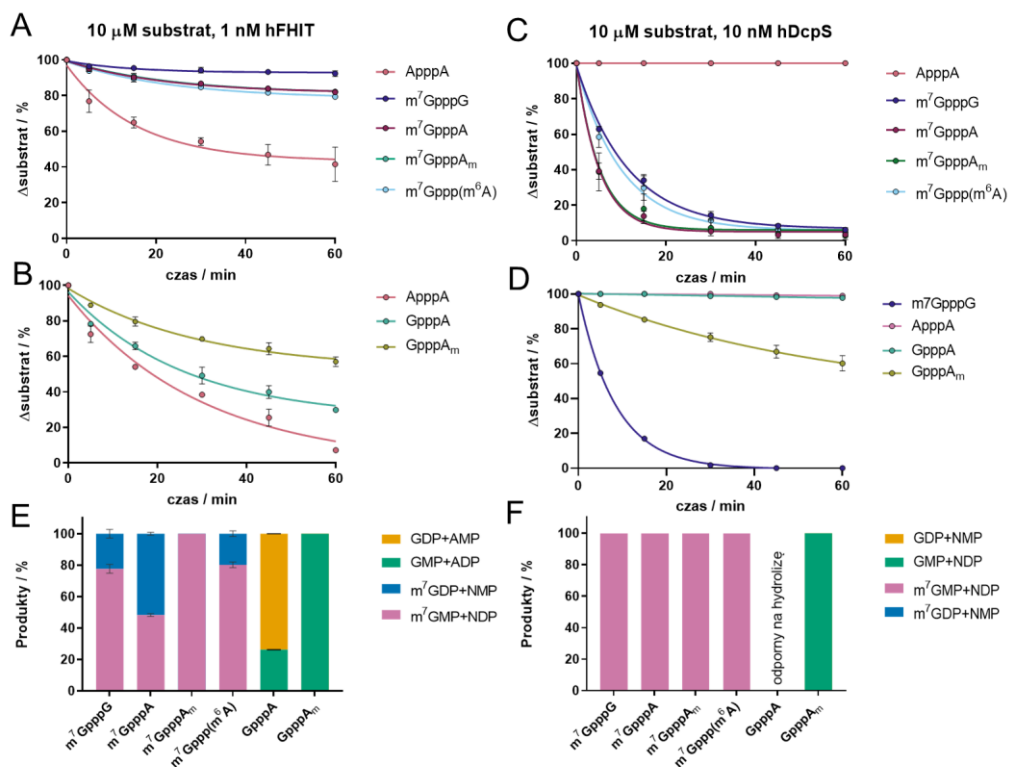
Rys. 2-11. A) Produkty hydrolizy m⁷GpppG w wyniku działania enzymu hDcpS (niebieski, hydroliza pomiędzy fosforanami γ/β) oraz enzymu hFhit (pomarańczowy, hydroliza pomiędzy fosforanami γ/β oraz β/α); B) Zestawienie struktur związków omawianych w niniejszym podrozdziale.

Różnice w kinetyce działania enzymu hFhit zaobserwowano wyraźnie w warunkach niskiego stężenia (10 μM) badanych substratów (Rys. 2-12). Po 60 minutach ApppA został zhydrolizowany w 58% procentach, a drugim najlepszym substratem okazał się m⁷Gppp(m⁶A) z przereagowaniem na poziomie 21% (Rys. 2-12A). Pozostałe badane związki także były hydrolizowane przez hFhit, natomiast regioselektywność cięcia wiązania pirofosforanowego zależała od budowy dinukleotydu, a w szczególności od rodzaju zasad azotowych oraz występowania metylacji w obrębie adenozy. Niesymetryczne trifosforany dinukleotydów (m⁷GpppN) teoretycznie mogą zostać przekształcane przez enzymy na drodze cięcia wiązania pomiędzy fosforanami α i β (produkty: m⁷Gpp oraz pN) lub β i γ (produkty: m⁷Gp oraz ppN) (Rys. 2-11A). Udowodniono, że enzym Fhit przekształca m⁷GpppG do m⁷Gpp oraz pG (188). Wszystkie przebadane niesymetryczne dinukleotydy były substratami dla ludzkiego Fhit (Rys. 2-12B i E). Dla związków m⁷GpppG oraz m⁷Gppp(m⁶A) zaobserwowano powstanie czterech produktów z preferencją cięcia pomiędzy fosforanami β i γ, a uwalniane były kolejno m⁷Gp

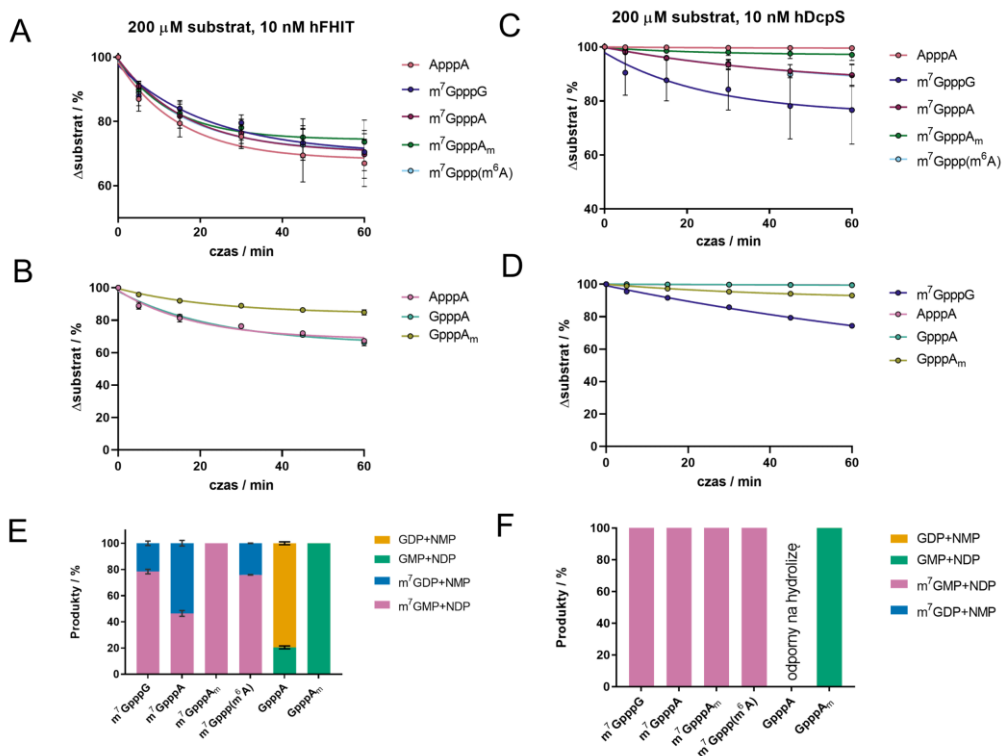
oraz ppG i m⁷Gp oraz pp(m⁶A). Również pozostałe substraty, m⁷GpppA oraz GpppA, były hydrolizowane zarówno od strony adeniny, jak i drugiej zasady azotowej. W przypadku m⁷GpppA zaobserwowano równy stosunek par produktów, natomiast GpppA był już zdecydowanie chętniej cięty od strony adeniny. Ciekawy wynik otrzymano dla m⁷GpppA_m oraz GpppA_m, ponieważ oba dinukleotydy były hydrolizowane od strony N7-metylowanej guanozyny lub guanozyny. Ten wynik sugeruje, że metylowanie w pozycji 2'O rybozy chroni przed degradacją enzymatyczną Fhit pomiędzy fosforanami α i β i jednocześnie wymuszając hydrolizę dinukleotydu pomiędzy fosforanami β i γ. Identyczny zestaw eksperymentów wykonano dla wyższego stężenia każdego z substratów, tj. 200 μM (Rys. 2-13). Różnice w kinetyce reakcji nie były już tak dobrze widoczne (Rys. 2-13A i B), natomiast nie zmieniła się znacząco preferencja hydrolizy dinukleotydów (Rys. 2-13E).

Jak zaznaczono wcześniej ludzki DcpS jest hydrolazą rozpoznającą dinukleotydy bądź krótkie RNA składające się z 7-metyloguaniny na końcu 5' łańcucha polinukleotydowego. Zgodnie z oczekiwaniami wszystkie analogi zawierające 7-metyloguaninę były hydrolizowane przez enzym DcpS od strony metylowanej zasady azotowej (Rys. 2-12F i Rys. 2-13F). Porównując procent przereagowania dinukleotydu w eksperymentach z niskim (10 μM) oraz wysokim (200 μM) stężeniem substratu, można zauważyć, iż dla stężeń niższych najszybciej hydrolizowane były związki m⁷GpppA oraz m⁷GpppA_m (kolejno 86% i 82% przereagowania po 15 minutach prowadzenia reakcji) (Rys. 2-12), a dla stężeń wyższych najlepszym substratem był już m⁷GpppG (Rys. 2-13). Bardzo ciekawy wynik otrzymano dla niemetylowanych analogów kapu, tj. GpppA oraz GpppA_m. Analiza profili HPLC wykazała odporność na hydrolizę GpppA, natomiast metylowany w pozycji 2'O odpowiednik adenozyne został cięty od strony guanozyny, jednakże znacznie wolniej w porównaniu z naturalnym substratem m⁷GpppG (25% przereagowania GpppA_m po 30 minutach vs. 98% przereagowania m⁷GpppG po tym samym czasie). Wyniki uzyskane dla hDcpS są zgodne z przewidywaniami. Regioselektywność hydrolizy pochodnych 7-metyloguaninowych odbywała się pomiędzy fosforanami γ i β bez względu na rodzaj drugiej zasady azotowej. Niewątpliwie głębszej analizy wymaga hydroliza GpppA_m wobec niehydrolizowanego GpppA, co będzie przedmiotem dalszych badań. Wyniki przytoczonych badań HPLC w połączeniu z uzyskanymi przeze mnie wynikami badań biblioteki nukleotydów, wskazują na rozłączne specyficzności substratowe enzymów hDcpS i hFhit, a co

za tym idzie, ich różne funkcje biologiczne i poddają w wątpliwość sugerowaną w literaturze funkcję Fhit w dekapingu.



Rys. 2-12. Porównanie specyficzności substratowej enzymów hFhit oraz hDcpS na podstawie wyników badań metodą HPLC. Siedem substratów w stężeniu 10 μ M każdy (A-F) inkubowano z enzymem hFhit (1 nM) lub hDcpS (10 nM) w buforze 50 mM Tris-HCl pH 7,6 zawierającym 200 mM KCl oraz 5 mM MgCl₂. Każdą reakcję prowadzono w 37°C przez 60 minut, a postęp hydrolizy analizowano w kilku odstępach czasowych. A-D) Zmiana stężenia danego substratu w funkcji czasu w mieszaninie reakcyjnej. E-F) Procentowe zestawienie par produktów po 60 minutach reakcji. Zaprezentowane dane są średnią arytmetyczną z dwóch powtórzeń $\pm$ odchylenie standardowe (S.D.).



Rys. 2-13. Porównanie specyficzności substratowej enzymów hFhit oraz hDcpS na podstawie wyników badań metodą HPLC. Siedem substratów w stężeniu 200 μ M każdy (A-F) inkubowano z enzymem hFhit (10 nM) lub hDcpS (10 nM) w buforze 50 mM Tris-HCl pH 7,6 zawierającym 200 mM KCl oraz 5 mM $MgCl_2$. Każdą reakcję prowadzono w 37°C przez 60 minut, a hydrolizy analizowano w kilku odstępach czasowych. A-D) Zmiana stężenia danego substratu w funkcji czasu w mieszaninie reakcyjnej. E-F) Procentowe zestawienie par produktów po 60 minutach reakcji. Zaprezentowane dane są średnią arytmetyczną z dwóch powtórzeń $\pm$ odchylenie standardowe (S.D.).

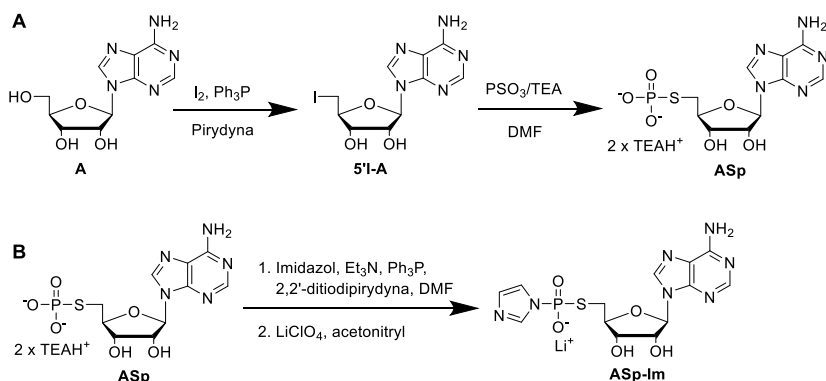
2.3 Nowe dinukleotydy adeninowe jako potencjalne inhibitory ludzkiego Fhit

Na podstawie powyżej przedstawionych wyników HTS dla ludzkiego Fhit zaprojektowałem i otrzymałem nowe analogi nukleotydów jako potencjalne inhibitory tego enzymu. Przy projektowaniu nowych związków wziąłem pod uwagę struktury najlepszych inhibitorów z biblioteki BZ-2, którymi zdecydowanie były analogi adeninowe różniące się między sobą długością mostka fosforanowego oraz obecnością dodatkowych modyfikacji w obrębie grup fosforanowych (Rys. 2-9). Drugim czynnikiem, który zdecydował o doborze modyfikacji chemicznych była klasa 5'-tiofosfoestrowych i tiofosforanowych analogów końca 5'-mRNA, które scharakteryzowano jako bardzo silne inhibitory ludzkiego enzymu hDcpS (194). Dlatego jako nowe związki zaprojektowałem analogi diadeninowe z modyfikacją 5'-tiofosfoestrową (PSL), które różniły się długością łańcucha fosforanowego, jeden związek z dodatkową grupą tiofosforanową (PS), w którym siarka występuje jako modyfikacja niemostkowa oraz jeden dinukleotyd posiadający ugrupowanie difluorometyleno(bis)fosfonianowe (p-CF₂-p). Jako ścieżki syntetyczne wykorzystałem wcześniej opracowane metody syntezy analogów kapu z modyfikacjami PSL, PS oraz CF₂ (194,199). Otrzymałem 9 nowych związków, których strukturę potwierdziłem za pomocą NMR oraz MS, a następnie przeprowadziłem badania w celu określenia ich potencjału inhibicji względem ludzkiego enzymu Fhit.

2.3.1 Synteza chemiczna zaprojektowanych związków

Do otrzymania dinukleotydów adeninowych zawierających ugrupowanie 5'-tiofosfoestrowe wykorzystałem podobne ścieżki syntezy jak opracowane wcześniej dla analogów 7-metyloguaninowych (194). Substratem wyjściowym była adenozyzna (2,28 g), którą przekształciłem w jej 5'-jodo pochodną (5'IA). Reakcję jodowania przeprowadziłem w pirydynie w obecności trifenylfosfiny, związek ostateczny wydzieliłem za pomocą ekstrakcji octanem etylu, a po odparowaniu do sucha warstwy organicznej otrzymałem 3,5 g białego produktu (W=41%). W kolejnym kroku sól trietyloamoniową tiofosforanu (PSO₃/TEA) poddałem reakcji S-alkilacji z 5'IA w warunkach bezwodnych, w wyniku czego powstawał produkt zawierający atom siarki w pozycji 5' rybozy (Schemat 2-1A). Ze względu na niską stabilność PSO₃ jako suchego odczynnika, kluczowe okazało się przygotowanie jego świeżej porcji w postaci soli trietyloamoniowej tuż przed rozpoczęciem syntezy. Sam tiofosforan jest handlowo dostępny jako sól sodowa. Do zamiany soli sodowej w trietyloamoniową

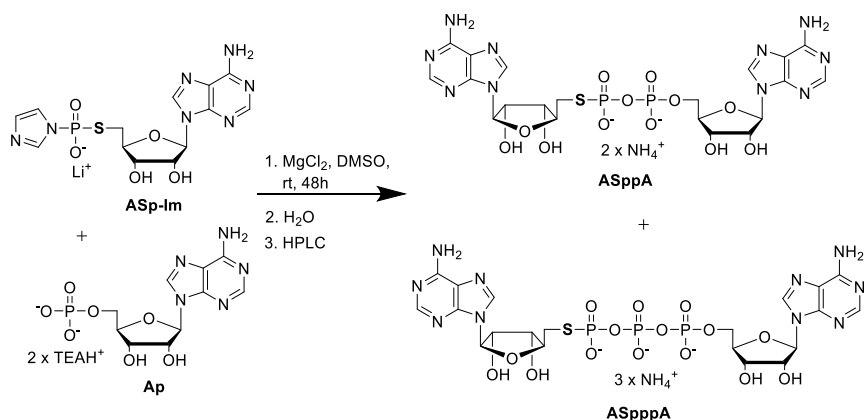
wykorzystałem standardową metodę wymiany kationów na żółu Dowex, którą stosuje się także do zamiany kationów w nukleotydach. Dalsza obróbka nukleotydu obejmuje jego odparowanie, aż do uzyskania suchego, sypkiego ciała stałego. Inaczej obchodziłem się z tiofosforanem, który po odparowaniu ulega niemal natychmiastowemu rozkładowi. Aby tego uniknąć, roztwór po kolumnie Dowex zawierający tiofosforan zatężałem do stężenia około 1 mmol na 10 ml wody i przechowywałem w -80°C . W celu jego użycia do syntezy, odpowiednią ilość odparowywałem w kolbce do sucha i niezwłocznie dodawałem aprotycznego rozpuszczalnika takiego jak DMF lub DMSO, w którym prowadziłem reakcję. Następnie, uzyskany Asp przekształciłem z 60% wydajnością w aktywowaną imidazolem podjednostkę tiofosforanową na drodze syntezy metodą Mukaiyamy-Hashimoto, a produkt wytrąciłem w postaci soli litowej (ASp-Im) (Schemat 2-1B).



Schemat 2-1. A) Schemat syntezy 5'-fosfortiotianu adenozyne; B) Aktywacja grupy tiofosfoestrowej metodą Mukaiyamy-Hashimoto.

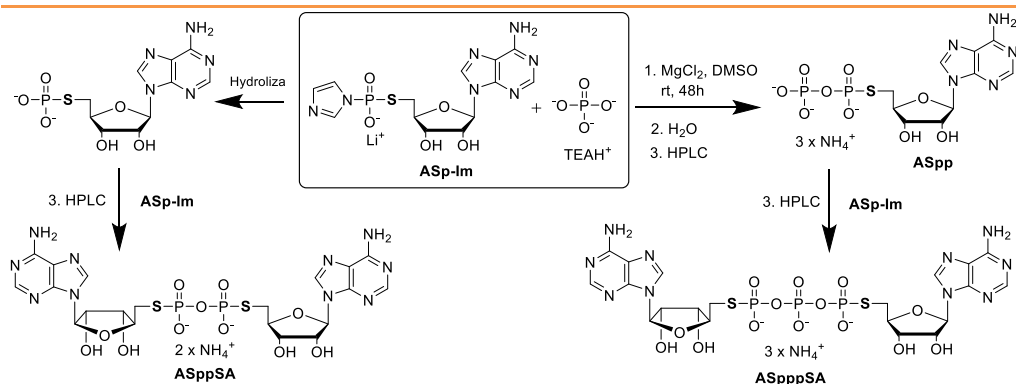
Kolejne etapy syntezy polegały na utworzeniu dodatkowego wiązania pirofosforanowego pomiędzy ASp-Im a nukleotydem lub fosforanem, w DMF lub DMSO, oraz w obecności jonów magnezu. W celu otrzymania dinukleotydu z jednym atomem siarki w pozycji 5' rybozy oraz z dwiema grupami fosforanowymi, przereagowałem ASp-Im z 5'-monofosforanem adenozyne (Ap) w DMSO w obecności jonów magnezu (Schemat 2-2). Reakcja przebiegała bardzo wolno i dopiero po 48 h zaobserwowałem powstanie produktu. Co ciekawe, analizy HPLC oraz MS wykazały powstanie nie tylko pożądanego dinukleotydu, ASppA, ale również jego analogu zawierającego jedną grupę fosforanową więcej, ASpppA. Jako produktu ubocznego w opisywanej reakcji można było się raczej spodziewać powstania ASppSA na skutek hydrolizy ASp-Im do ASp, a następnie sprzęgania się tych dwóch podjednostek. Niespodziewany

przebieg reakcji można tłumaczyć zanieczyszczeniem jednego z substratów fosforanami lub, co wydaje się być bardziej wiarygodne, rozkładem w czasie ASp-Im do tiofosforanu, który następnie hydrolizuje do anionu fosforanowego, a ten z kolei może ulegać dalszym reakcjom. Ostatecznie wyizolowałem i oczyściłem dwa dinukleotydy w postaci soli amonowych: ASppA (W=7,5%) oraz ASpppA (W=8,7%).

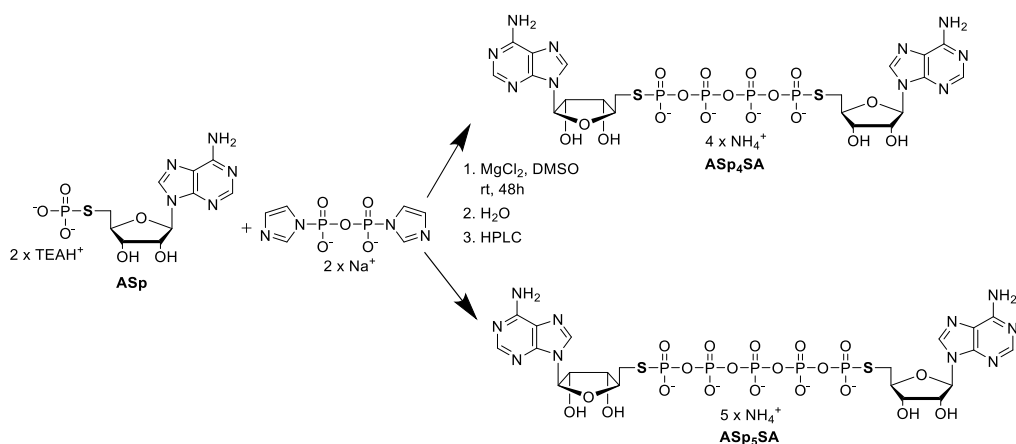


Schemat 2-2. Schemat reakcji syntezy, z której wyizolowano 2 różne produkty: ASppA oraz ASpppA.

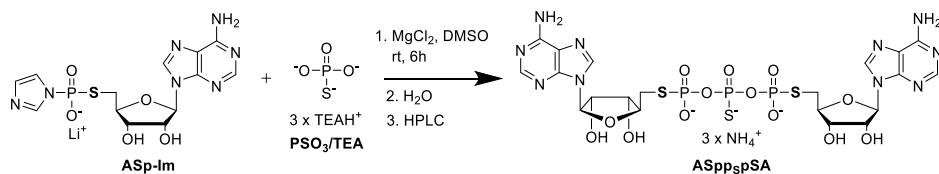
Otrzymałem także symetryczne analogi diadeninowe posiadające dwa atomy siarki w pozycjach 5' dinukleotydu. Produktem głównym w reakcji ASp-Im z fosforanem trietyloamoniowym był 5'-tiodifosforan adenozyiny, ASpp, który w trakcie 48-godzinnej reakcji reagował z nadmiarem ASp-Im, tworząc trifosforanowy analog ASpppSA. Ponadto, dochodziło do rozpadu ASp-Im do ASp i reakcji tych dwóch mononukleotydów, dzięki czemu powstał dinukleotyd ASppSA (Schemat 2-3). Wszystkie cząsteczki wyizolowałem za pomocą preparatywnego HPLC z wydajnością 8% (ASpp), 4% (ASpppSA) oraz 1,9% (ASppSA). W kolejnych syntezach wydłużyłem długość mostka fosforanowego poprzez zastosowanie podwójnie aktywowanego imidazolem pirofosforanu (Im-pp-Im), a zastosowane podejście pozwoliło na otrzymanie ASp_4SA (4%) oraz ASp_5SA (1%) (Schemat 2-4). Ostatnim związkiem z grupy analogów siarkowych był dinukleotyd z trzema atomami siarki. Po jednej w pozycji 5' rybozy oraz atom siarki na środkowej grupie fosforanowej (P_β). Do syntezy związku wykorzystałem ponownie ASp-Im, a czynnikiem umożliwiającym utworzenie wiązania pirofosforanowego była sól trietyloamoniowa tiofosforanu. Związek ASpp_2pSA wyizolowałem z wydajnością 20% (Schemat 2-5).



Schemat 2-3. Schemat reakcji syntezy, z której wyizolowano 3 różne produkty: ASpp, ASppSA oraz ASpppSA.



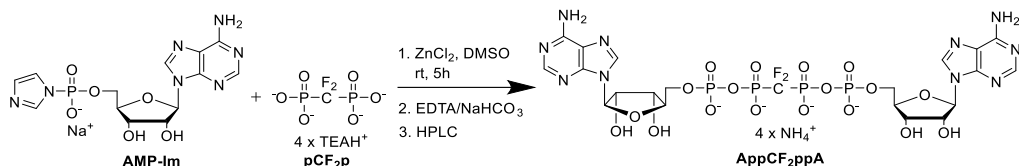
Schemat 2-4. Schemat syntezy, która umożliwiła otrzymanie analogów o najdłuższym mostku fosforanowym: ASp₄SA oraz ASp₅SA.



Schemat 2-5. Schemat reakcji analogu ASpp₅pSA.

Analizując wyniki badania wysokoprzepustowego, zauważyłem również zwiększony poziom inhibicji dla dinukleotydu guanozynowego, który w obrębie mostka tetrafosforanowego posiadał grupę CF₂ (%_{inhibicji} = 34% dla ludzkiego Fhit). Z tego względu zdecydowałem się na syntezę podobnego związku z adeninami jako zasadami azotowymi. W tym celu sól

trietyloamoniową difluorometyleno(bis)fosfonianu (pCF_2p) poddałem reakcji sprzęgania z AMP-Im, w wyniku czego powstał pożądany produkt AppCF₂ppA, wyizolowany z wydajnością 16% (Schemat 2-6).

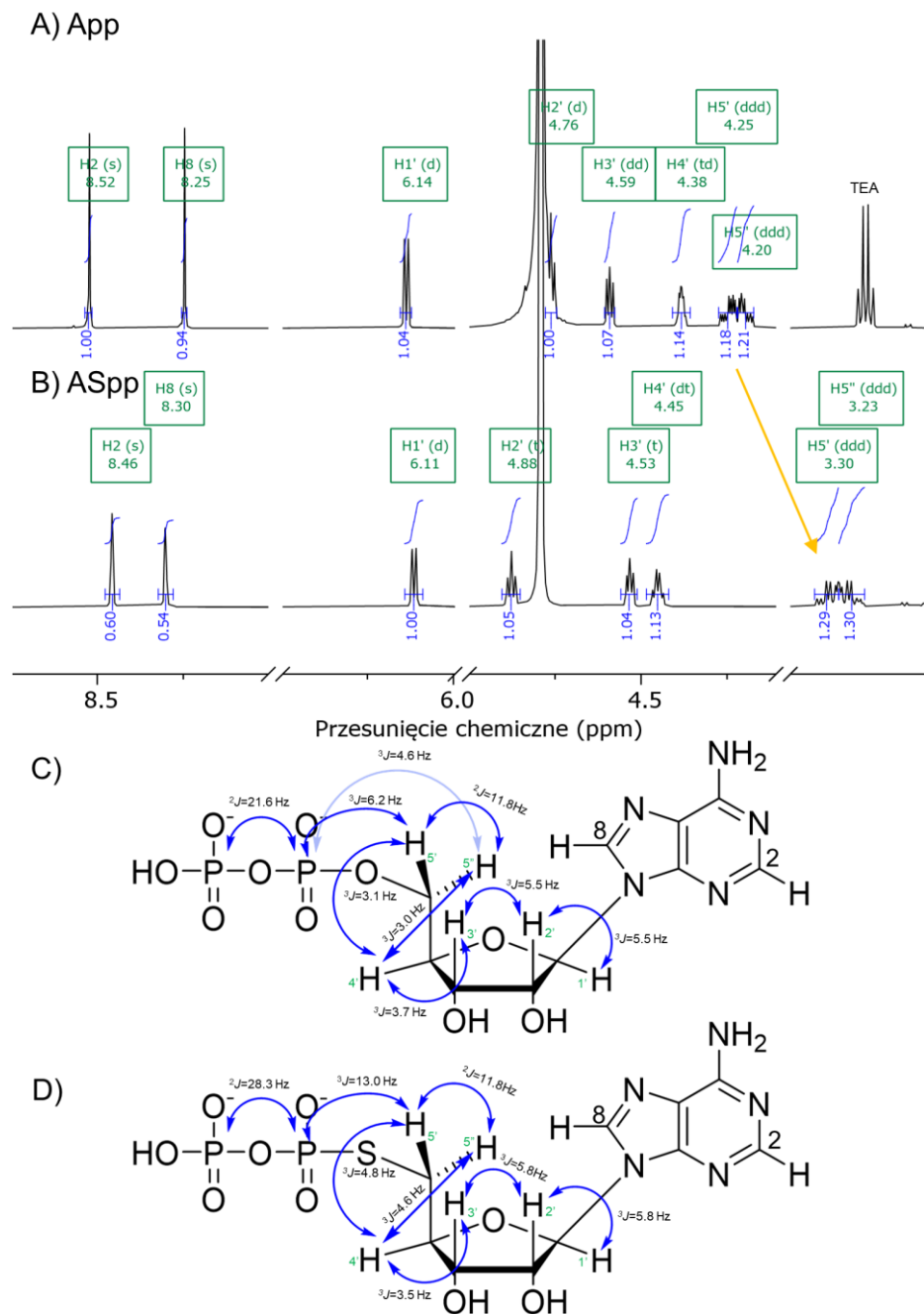


Schemat 2-6. Schemat reakcji syntezy analogu zawierającego grupę difluoromeyleno(bis)fosfonianową.

W tym miejscu chciałbym zaznaczyć, że na tym etapie projektu celem nie było opracowanie wysokowydajnych metod syntezy. Otrzymane niewielkie ilości nowych analogów adeninowych w zupełności wystarczyły do wykonania ich charakterystyki metodą NMR, HRMS oraz przeprowadzenia badań biofizycznych w celu określenia ich potencjału jako inhibitorów ludzkiego enzymu Fhit.

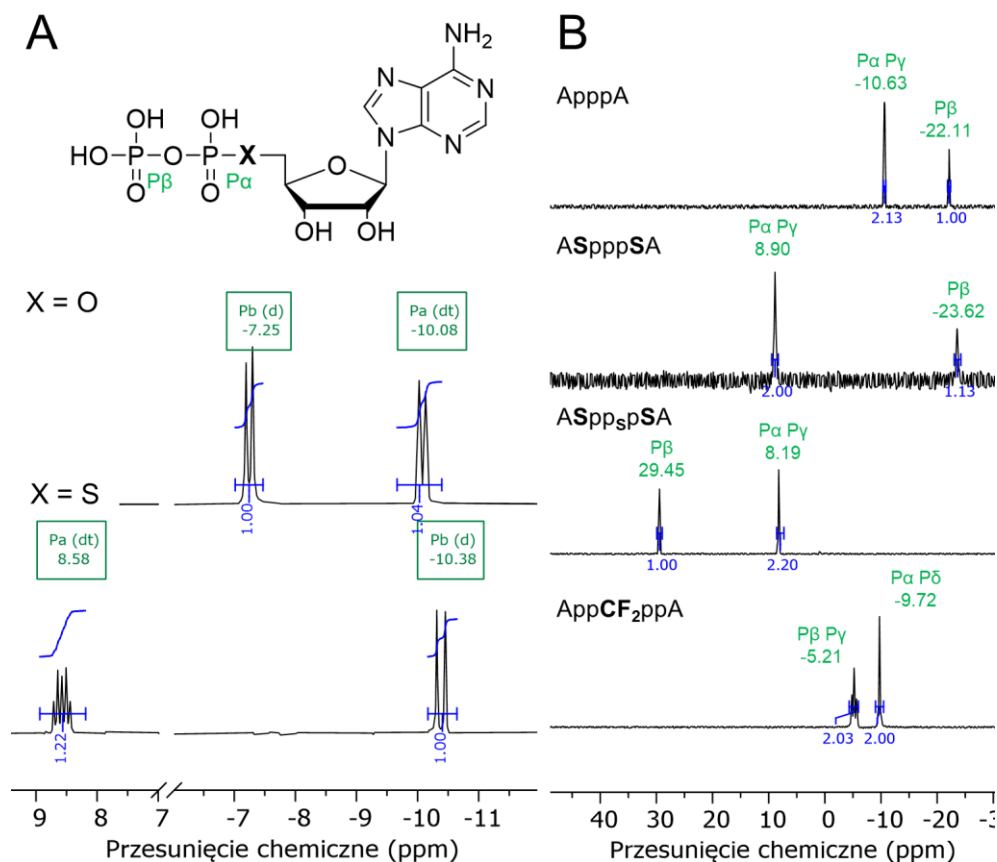
2.3.2 Charakterystyka NMR otrzymanych dinukleotydów adeninowych

Metoda magnetycznego rezonansu jądrowego jest niezastąpiona podczas potwierdzania struktury związków chemicznych. W chemii nukleotydów rutynowo rejestruje się widma ¹H oraz ³¹P, które dostarczają danych wystarczających do potwierdzenia struktur chemicznych. Szczególnie użyteczne są widma fosforowe, a dzieje się tak głównie z dwóch powodów. Atom fosforu ma tylko jeden naturalnie występujący izotop ³¹P, którego jądro atomowe posiada spin ½, dzięki czemu fosfor jest idealnym kandydatem do badań metodą NMR, a zarejestrowane widma są relatywnie proste do analizy. Ponadto, widma fosforowe posiadają bardzo szeroki zakres przesunięć chemicznych (od -250 ppm do 250 ppm), przez co zmiany w otoczeniu chemicznym atomu fosforu są dobrze odzwierciedlane w zmianach przesunięć chemicznych sygnałów. Na przykład zamiana atomu tlenu bezpośrednio połączonego z atomem fosforu na atom siarki znacznie przesunie położenie sygnału fosforowego na widmie, co jest dowodem na wprowadzenie planowanej modyfikacji do cząsteczki.



Rys. 2-14. Porównanie widm ^1H NMR App (A) oraz ASpp (B). Żółtą strzałką zaznaczono wyraźną zmianę przesunięcia chemicznego protonów $\text{H5}'\text{H5}''$. C) i D) Przypisanie stałych sprzężenia spinowo-spinowych na podstawie widm protonowych i fosforowych dla App oraz ASpp.

Analogi diadeninowe zanalizowano pod kątem zmian przesunięć chemicznych sygnałów, a w szczególności zwrócono uwagę na strukturę subtelną rezonansów znajdujących się w bezpośrednim lub bardzo bliskim sąsiedztwie atomów siarki. Bardzo pomocne okazało się porównanie niemodyfikowanych mono- i dinukleotydów adeninowych z ich siarkowymi odpowiednikami. Na Rys. 2-14 A i B porównano widma ^1H NMR dwóch związków: niemodyfikowanej cząsteczki App oraz jej siarkowego analogu ASpp. Skupiając się na wartościach przesunięć chemicznych sygnałów, widać wyraźną różnicę w położeniu rezonansów, które odpowiadają protonom 5' i 5'' rybozy (żółta strzałka). Różnica ta wynosi około 0,9 ppm, a przesunięcie w kierunku niższych wartości δ_{ppm} świadczy o większym ekranowaniu wspomnianych atomów wodoru w cząsteczce ASpp. Jest to zmiana, której się spodziewano, ponieważ atom siarki posiada dwa razy więcej elektronów niż atom tlenu, co ma widoczny wpływ na otoczenie chemiczne najbliższych atomów wodoru. Atom siarki nie ma wpływu na multipletowość sygnałów, natomiast zauważono znaczne różnice w wartościach stałych sprzężenia spinowo-spinowego. Dane zebrane na podstawie widm ^1H oraz ^{31}P przedstawiono na Rys. 2-14 C i D. Największą różnicę w wartości stałej sprzężenia zanotowano dla pary spinowo-spinowej pomiędzy atomem fosforu bezpośrednio związanym z siarką a atomami wodoru H5', H5''. W niemodyfikowanym związku App wartość $^3J_{\text{P-H}''}$ wynosi 4,6 Hz lub 6,2 Hz, natomiast obecność siarki zwiększa stałą sprzężenia około dwukrotnie do 13 Hz. Zwiększenie stałej sprzężenia o około 7 Hz obserwuje się pomiędzy dwoma atomami fosforu. Przyglądając się sprzężeniom pomiędzy atomami wodoru, znaczącą różnicę (o 1,6-1,7 Hz) widać w sprzężeniu wicynalnym pomiędzy protonami H4' oraz H5'5''.

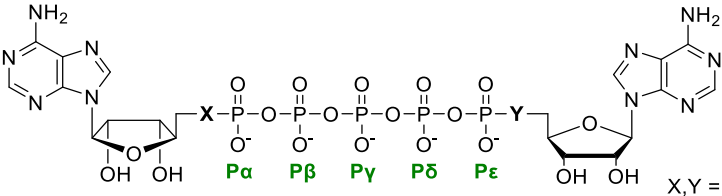


Rys. 2-15. Analiza widm ^{31}P NMR. A) Struktura AXpp, gdzie X to atom siarki lub tlenu oraz widma fosforowe App oraz ASpp; B) Zestawienie przykładowych widm fosforowych dinukleotydów adeninowych wraz z wartościami intensywności sygnałów (niebieski kolor) oraz przesunięcia chemicznego sygnałów (zielony kolor).

Kolejną porcję informacji o strukturze otrzymanych 5'-tiofosfoestrowych analogów adeninowych można odczytać z widm fosforowych. Analiza ilości oraz integracji sygnałów na widmie ^{31}P daje bezpośrednią wiedzę o liczbie grup fosforanowych w łańcuchu/mostku fosforanowym, natomiast analiza wartości przesunięć chemicznych świadczy o obecności dodatkowych modyfikacji występujących w bliskim sąsiedztwie jądra fosforu, czyli w tym wypadku atomu siarki lub grupy difluorometyleno(bis)fosfonianowej. Widma ^{31}P NMR dla wybranych związków przedstawiono na Rys. 2-15, natomiast wartości przesunięć chemicznych zebrano w Tabela 2.3. W niemodyfikowanym łańcuchu trifosforanowym związku ApppA przesunięcia chemiczne fosforów Pα i Pγ są identyczne ($\delta_{\text{ppm}} = -10,63$), gdzie dla analogu disiarkowego (ASpppSA) sygnały te są przesunięte o około 20 ppm w dół pola ($\delta_{\text{ppm}} = 8,90$),

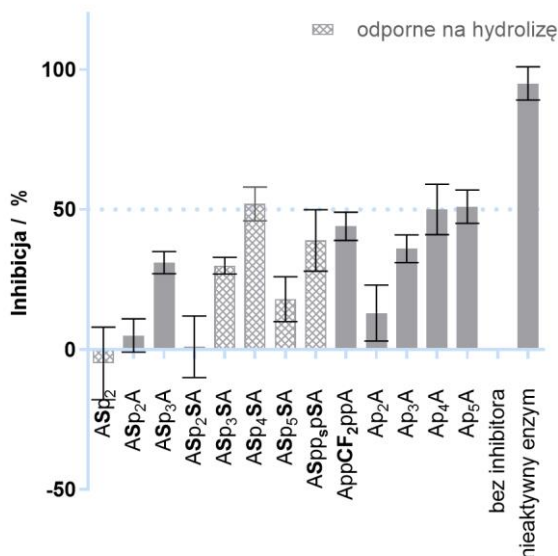
natomiast rezonans P β w obu przypadkach wynosi około -23 ppm. Zbliżone wartości δ_{ppm} obserwuje się dla wszystkich analogów AX p_n XA, w których X to atom siarki bądź tlenu, a n to liczba grup fosforanowych w zakresie od 2 do 5. Dużo większe przesunięcie sygnału w dół pola magnetycznego zaobserwowano dla modyfikacji tiofosforanowej, w której atom siarki znajduje się w tak zwanej pozycji niemostkowej grupy fosforanowej. Przesunięcie P β analogu trójsiarkowego ASpp p SA wynosi 29,45 ppm, a wartość ta jest zgodna z danymi literaturowymi, w których analizowano widma NMR analogów „kapu” modyfikowanych właśnie grupami tiofosforanowymi (200). Przeciwny efekt zaobserwowano analizując tetrafosforanowy analog posiadający modyfikację CF $_2$. Przesunięcia P α i P δ pozostały w niezmienionej pozycji na widmie w stosunku do ApppA (δ_{ppm} = -9,72), natomiast atomy fosforu P β i P γ uległy przesunięciu w górę pola magnetycznego (obniżenie częstotliwości rezonansowej) δ_{ppm} = - 5,21.

Tabela 2.3. Porównanie przesunięć chemicznych rezonansów na widmie ^{31}P pochodzących od jąder atomów fosforu P α – P ϵ dla adeninowych analogów mono- i dinukleotydów. Niebieskim tłem oznaczono analogi niemodyfikowane.

Oznaczenia atomów fosforu na przykładzie AX p_5 YA					
					
Analog	$\delta(\text{P}\alpha)$ / ppm	$\delta(\text{P}\beta)$ / ppm	$\delta(\text{P}\gamma)$ / ppm	$\delta(\text{P}\delta)$ / ppm	$\delta(\text{P}\epsilon)$ / ppm
Ap α p β	-10,08	-7,25	-	-	-
Ap α p β p α A	-10,63	-22,11	P γ = P α	-	-
ASp α p β	8,58	-10,38	-	-	-
ASp α p β A	8,34	-11,02	-	-	-
ASp α p β p γ A	8,83	-22,97	-10,59	-	-
ASp α p β SA	7,90	7,90	-	-	-
ASp α p β p α SA	8,90	-23,62	P γ = P α	-	-
ASp α p β p γ p α SA	9,14	-21,66	P γ = P β	P δ = P α	-
ASp α p β p γ p β p α SA	9,26	-22,36	-21,56	P δ = P β	P ϵ = P α
ASp α p β s p α SA	8,19	29,45	P γ = P α	-	-
Ap α p β CF $_2$ p β p α A	-9,72	-5,21	P γ = P β	P δ = P α	-

2.3.3 Charakterystyka enzymatyczna nowych analogów adeninowych

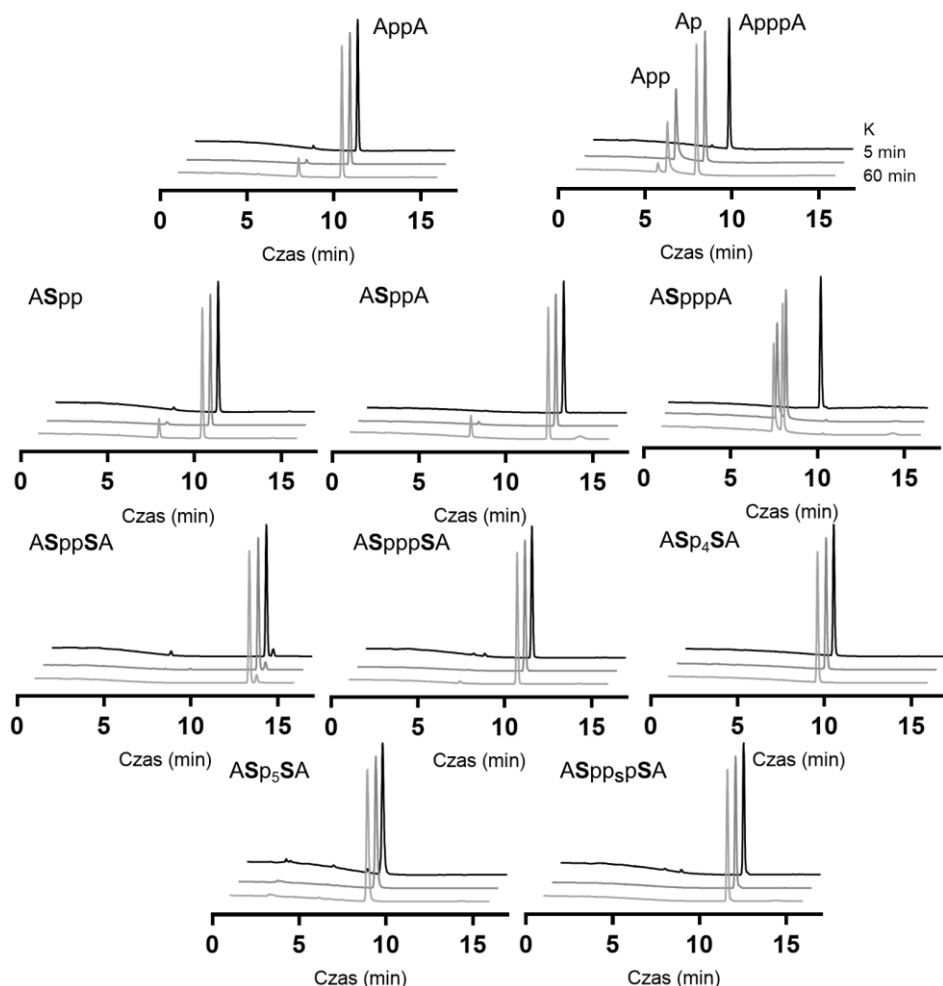
Aby sprawdzić potencjał nowych analogów adeninowych jako inhibitorów enzymu hFhit, wyznaczyłem wartość $\%_{\text{inhibicji}}$ dla zsyntetyzowanych związków metodą wysokoprzepustową. Na Wykres 2-5 zestawilem otrzymane procenty inhibicji nowych związków z naturalnymi analogami adeninowymi. Porównując pomiędzy sobą nukleotydy o takiej samej liczbie grup fosforanowych można zauważyć, że w niektórych przypadkach wprowadzenie nowej modyfikacji spowodowało znaczne obniżenie inhibicji. Przykładowo dla Ap_5A inhibicja wyniosła 50%, natomiast dwusiarkowy odpowiednik, ASp_5SA , wpływał na reakcję enzymatyczną z 18% skutecznością. Niemniej jednak, najsilniejszymi inhibitorami spośród nowych związków okazały się dwa analogi tetrafosforanowe: ASp_4SA ($\%_{\text{inhibicji}} = 52\%$) oraz drugi modyfikowany grupą difluorometyleno(bis)fosfonianową, AppCF_2ppA ($\%_{\text{inhibicji}} = 44\%$). Podwyższoną inhibicją w stosunku do naturalnego analogu ApppA wykazał się także związek trójsiarkowy, ASpp_3pSA ($\%_{\text{inhibicji}} = 39\%$).



Wykres 2-5. Procenty inhibicji nowych diadeninowych analogów oraz porównanie z analogami niemodyfikowanymi. Wyższy słupek oznacza silniejszy inhibitor. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (SD).

Poza wykonanymi badaniami metodą HTS, przeprowadziłem także eksperymenty monitorowane metodą HPLC, w których zbadałem podatność związków na hydrolizę enzymatyczną. Wprowadzenie atomu siarki skutecznie uodporniło dinukleotydy na degradację

przez enzym Fhit, co zostało dobrze zobrazowane na przykładzie „niesymetrycznych” związków, które od strony jednej adeniny były modyfikowane siarką w pozycji 5', a od strony drugiej adeniny siarka nie była obecna. Dla takich przykładów (ASppA oraz ASpppA) hydrolizę wiązań pirofosforanowego obserwowano jedynie od strony niemodyfikowanej cząsteczki, np. produktami hydrolizy ASpppA były ASpp oraz Ap. Związki posiadające dwie bądź trzy siarki były stabilne enzymatycznie, natomiast grupa CF_2 nie chroniła przed degradacją (Rys. 2-16).



Rys. 2-16. Zestawienie profili HPLC uzyskanych w trakcie badań stabilności enzymatycznej analogów siarkowych względem ludzkiego enzymu Fhit. Dla każdego ze związków przedstawiono trzy profile HPLC: K - kontrola, po 5 oraz 60 minutach reakcji enzymatycznej. U góry przedstawiono reakcje kontrolne z niemodyfikowanymi analogami Ap_nA . Warunki: 0,2 mM substratu, 1 μ M hFhit, 50 mM MES-KOH pH=6,5, 5 mM $CaCl_2$.

2.4 Zestawienie najlepszych zidentyfikowanych inhibitorów ludzkiego enzymu Fhit

Jako efekt końcowy poszukiwań najlepszych inhibitorów ludzkiego białka Fhit przedstawiłem w niniejszym podrozdziale tabelę, która zbiera dane procentów inhibicji oraz IC_{50} dla naturalnych analogów adeninowych różniących się długością mostka fosforanowego oraz najlepszych cząsteczek z biblioteki związków BZ-2 oraz dla nowych otrzymanych analogów adeninowych (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Zestawienie najlepszych inhibitorów dla ludzkiego enzymu Fhit w porównaniu z naturalnymi analogami dinukleotydów adeninowych.

Związek	Odporność na degradację Fhit	Inhibicja / %	IC_{50} / μM
Naturalne analogi Ap_nA			
Ap_2A (23)	Nie	11 ± 2	n.z.
Ap_3A (24)	Nie	47 ± 2	67 ± 36
Ap_4A (25)	Nie	65 ± 7	14 ± 4
Ap_5A (26)	Nie	51 ± 6	17 ± 4
Najlepsze inhibitory z biblioteki BZ-2			
$ApCH_2ppA$ (30)	Tak	24 ± 4	28 ± 7
$ApCH_2ppCH_2pA$ (31)	Nie	51 ± 5	37 ± 14
$ApCH_2ppA-N6-DCA^*$ (34)	Nie	33 ± 7	81 ± 51
$ApCH_2ppA-N6-HDA^*$ (35)	Nie	34 ± 3	35 ± 22
$ApBH_3ppBH_3pA$ (36)	n.z.	48 ± 2	27 ± 11
D1/D2 mix			
Nowe otrzymane analogi adeninowe			
ASp_2	Tak	-5 ± 13	n.z.
ASp_2A	Nie	5 ± 6	n.z.
ASp_3A	Nie	31 ± 4	n.z.
ASp_2SA	Tak	1 ± 11	n.z.
ASp_3SA	Tak	30 ± 3	23 ± 12
ASp_4SA	Tak	52 ± 6	13 ± 4
ASp_5SA	Tak	18 ± 8	n.z.
$ASpp_5pSA$	Tak	39 ± 11	20 ± 10
$AppCF_2ppA$	Nie	44 ± 5	9 ± 2

n.z. – nie zbadano; niebieskim tłem oznaczono naturalne analogi adeninowe; żółtym kolorem oznaczono najlepsze inhibitory; W nawiasach podano numery związków z biblioteki BZ-2 (Tabela Z2). * HDA – 1,6-heksanodiamina, DCA – 4,7,10-trioksy-1,13-diaminotridekan. Wartości inhibicji oraz IC_{50} przedstawiono jako wynik $\pm$ SD.

Analizując dane zebrane w Tabeli 2.4 można dojść do następujących wniosków dotyczących inhibicji badanych związków:

- Znaczenie ma długość mostka fosforanowego, co widać na przykładzie naturalnych analogów diadeninowych. Wraz ze zwiększeniem liczby grup fosforanowych wzrasta procent inhibicji ($Ap_2A < Ap_3A < Ap_4A$), jednak analog pentafosforanowy (Ap_5A) charakteryzował się inhibicją zbliżoną do Ap_3A , co jest jasną sugestią co do maksymalnej długości mostka fosforanowego.
- Wprowadzenie grupy 5'-tiofosfoestrowej (PSL) zapewniło ochronę przed degradacją przez ludzki enzym Fhit, jednak inhibicja reakcji enzymatycznej była niższa. Należy tutaj porównywać pomiędzy sobą analogi o takiej samej liczbie grup fosforanowych, tj. Ap_4A (%inhibicji = 65%) vs. ASp_4SA (%inhibicji = 52%) czy Ap_3A (%inhibicji = 47%) vs. ASp_3SA (%inhibicji = 30%). Również w przypadku analogów metylenobisfosfonianowych oraz z grupami boranowymi inhibicja jest odpowiednio niższa niż dla niemodyfikowanych cząsteczek.
- Wprowadzenie dwóch modyfikacji w cząsteczce Ap_3A , tj. połączenie niehydrolizowanego wiązania P-CH₂-P z niepolarnym łańcuchem alkilowym (skrót HDA lub DCA) w pozycji N6 adenozyiny, nie przyniosło pożądanego skutku, a zmierzone wartości inhibicji są niższe od naturalnych analogów.
- Najniższą wartość IC₅₀ uzyskano dla analogu AppCF₂ppA (IC₅₀ = 9 ± 2 μM), który jednocześnie nie charakteryzował się najwyższym procentem inhibicji. Zbliżone IC₅₀ wyznaczono dla Ap_4A oraz dwusiarkowego odpowiednika ASp_4SA , jednak ze względu na dość wysokie błędy standardowe można uznać, iż inhibicja obu związków jest bardzo podobna.
- Związki ASp_3SA oraz ASp_4SA mają podobny potencjał inhibitorowy co naturalne ligandy, dlatego są dobrymi kandydatami do dalszych badań nad rolą kompleksu Fhit- Ap_3A *in vitro* i *in vivo*.

3. Fluorowe analogi (oligo)nukleotydów jako sondy molekularne w badaniach ^{19}F NMR

3.1 Cele i obiekty badań

Celem drugiej części niniejszego projektu doktorskiego było zbadanie możliwości wykorzystania oligonukleotydów znakowanych na końcu 5' resztą fluorofosforanową jako sond molekularnych w badaniach metodą ^{19}F NMR.

Szczegółowe cele tych badań obejmowały:

- Opracowanie metody syntezy chemicznej 5'-fluoro(mono)- i 5'-fluoro(di)fosforanowych analogów oligonukleotydów o różnej długości (od 6 do 24 nukleotydów) i sekwencji.
- Opracowanie warunków eksperymentów ^{19}F NMR, w których otrzymane sondy molekularne zostały wykorzystane do:
 - ⇒ monitorowania tworzenia się dupleksów DNA,
 - ⇒ identyfikacji pojedynczych niekomplementarności w dupleksach DNA,
 - ⇒ monitorowania procesu rozwijania struktur drugorzędowych, G-kwadrupleksów oraz *i*-motywów (ang. *i*-motif) pod wpływem zmian temperatury lub pH,
 - ⇒ monitorowania oddziaływania pomiędzy kwasem nukleinowym a białkiem,
 - ⇒ monitorowania oddziaływania pomiędzy kwasem nukleinowym a małocząsteczkowym ligandem.

W pierwszych podrozdziałach opisałem syntezę chemiczną zarówno modyfikowanych, jak i niemodyfikowanych analogów oligonukleotydów na podłożu stałym oraz w roztworze. Następnie, za pomocą spektroskopii absorpcyjnej w zakresie ultrafioletowym, która jest jedną z podstawowych metod badania cząsteczek kwasów nukleinowych, przedstawiłem wpływ wprowadzenia grupy fluorofosforanowej na stabilność drugorzędowych struktur DNA. Główna część eksperymentów opisuje potencjał fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów jako sond molekularnych w spektroskopii ^{19}F NMR.

Obiektami badań w niniejszej części rozprawy były także mono- i dinukleotydy, w których w obrębie struktury zasady azotowej (guaniny lub adeniny) została wprowadzona grupa

trifluorometylowa (CF_3). Celem tego dodatkowego projektu było opracowanie metody badawczej, która wykorzystuje trifluorometylowane analogi nukleotydów jako sondy molekularne do monitorowania reakcji enzymatycznych katalizowanych przez trzy enzymy: ludzki Fhit, ludzki DcpS oraz ludzki cNIIIB oraz wpływu specyficznych inhibitorów na przebieg tych reakcji.

Wszystkie wyżej opisane zadania zostały zrealizowane poprzez rejestrację i analizę widm ^{19}F NMR, na których obserwowano zmiany takich parametrów sygnałów jak:

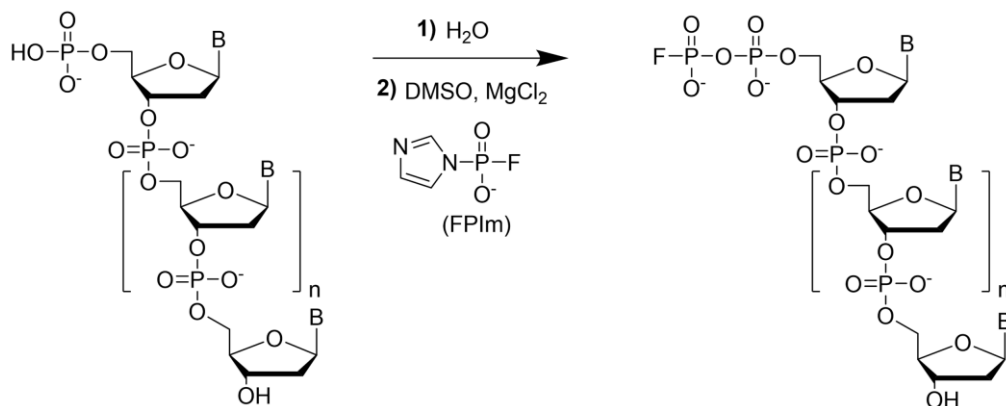
- zmiana przesunięcia chemicznego,
- poszerzenie,
- zmiana intensywności.

3.2 Nowe oligonukleotydowe sondy molekularne znakowane fluorem

Jako cel syntetyczny obrałem cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) o różnej długości (6-24 nukleotydów) oraz różnej sekwencji zasad azotowych (A, G, C lub T). To zróżnicowanie pozwoliło mi na zweryfikowanie dwóch metod syntetycznych, które zostały oparte o chemię fosforoimidazolidów. Dzięki opracowanym metodom syntezy zaplanowałem i otrzymałem oligonukleotydy o zadanych sekwencjach zasad azotowych, co z kolei umożliwiło zastosowanie tych związków jako sond molekularnych do monitorowania procesów biologicznych.

3.2.1 Synteza fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów

Oligonukleotydy zawierające grupę 5'-fluoro(di)fosforanową otrzymałem z 5'-fosforylowanych analogów, tak jak to zostało przedstawione na Rys. 3-1. Metodą konwencjonalnej syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym otrzymałem szereg biopolimerów zakończonych na końcu 5' grupą fosforanową. Po hydrolizie grup ochronnych, odcięciu oligonukleotydu od podłoża oraz liofilizacji, podjednostka 5'-fosforanowa została przekształcona w grupę 5'-fluoro(di)fosforanową w reakcji z elektrofilowym odczynnikiem fluorofosforylującym, FP-Im. Aby ułatwić rozpuszczanie polarnych cząsteczek DNA w DMSO, oligonukleotyd najpierw zwilżano bardzo małą objętością wody destylowanej (50 – 100 μl), a następnie dodawano dimetylosulfotlenku. Następnie, inicjowano reakcję z aktywowaną imidazolem podjednostką fluorofosforanową (FP-Im, 30 ekwiwaleńców) w obecności MgCl_2 (30 ekwiwaleńców) w DMSO.



Rys. 3-1. Schemat syntezy fluoro(di)fosforanowych analogów oligonukleotydów w roztworze. Oznaczenia: B – zasada azotowa: T, C, A lub G; $n = 4, 5, 8, 11, 13, 14, 22, 23$.

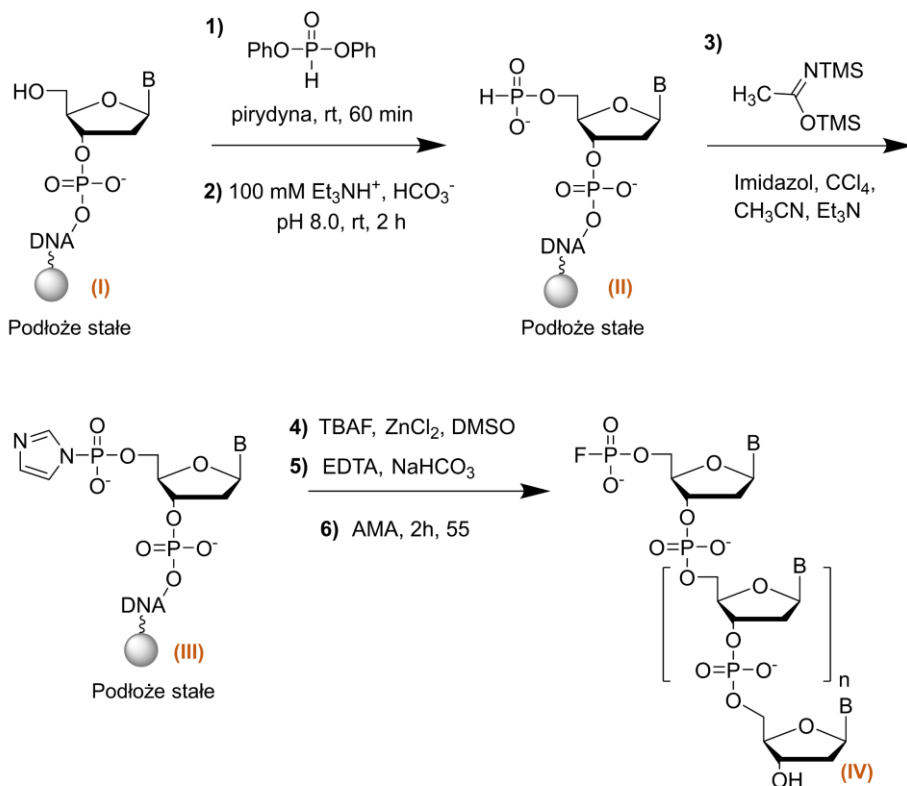
Wykorzystując powyższą procedurę, otrzymałem 15 różnych oligonukleotydów (Tabela 3.1). Dziesięć z nich o długości od 7 do 13 zasad azotowych zostało zaprojektowanych do monitorowania tworzenia się dupleksów DNA metodą ^{19}F NMR (związki FPPON2, FPPON3, FPPON4-FPPON10 i FPPON14). Otrzymałem także dwie 16-nukleotydowe sekwencje DNA (FPPON12 i FPPON13) zdolne do tworzenia struktur drugorzędowych przypominających „spinki do włosów” (ang. *hairpins*), jeden oligonukleotyd związający się do struktury G-kwadrupleksu (FPPON11), dwa oligonukleotydy związające się do struktury *i*-motywu (FPPON1 oraz FP-hTeloC) oraz najdłuższy, 25-nukleotydowy polimer FPPON15. Przebieg reakcji chemicznych monitorowałem za pomocą RP HPLC, jednak dla niektórych syntez wystąpiły problemy z koelucją substratu i produktu (bardzo podobne lub takie same czasy retencji) na kolumnie chromatograficznej, dlatego reakcje prowadziłem co najmniej 24 h, aby zapewnić maksymalny stopień przereagowania. Stopień przereagowania reagentów określałem na podstawie pomiarów za pomocą spektrometrii mas, w której obserwowałem zanik jonu molekularnego substratu. Reakcje zakańczałem poprzez co najmniej 10-krotne rozcieńczenie wodą destylowaną. Ostatecznie oligonukleotydy izolowałem za pomocą preparatywnego HPLC w układzie faz odwróconych, a otrzymane wydajności wahały się od 19% do 58% (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Wydajności syntez fluorofosforanowych analogów nukleotydów.

L.p.	Oligo.	Liczba nt. ^[a]	Koniec 5' ^[b]	Sekwencja (5'→3')	Wydajność HPLC	Wydajność preparatywna
1	FPON1 ^[c]	6	FP	TCC CCC	80%	20%
2	FPPON1 ^[c]	6	FPP	TCC CCC	61%	35%
3	FPPON2	7	FPP	GTC AAT G	86%	45%
4	FPON3 ^[d]	10	FP	AGA CAT TGA C	60%	15%
5	FPPON3 ^[d]	10	FPP	AGA CAT TGA C	86%	30%
6	FPPON4	10	FPP	TGA CAT TGA C	93%	49%
7	FPPON5	10	FPP	GTC AAT GTC C	82%	41%
8	FPPON6	10	FPP	GGA CAT TGA C	99%*	48%
9	FPPON7	10	FPP	ATC AAT GTC G	85%	51%
10	FPPON8	10	FPP	CGA CAT TGA T	99%*	58%
11	FPPON9	10	FPP	GTC AAT GTC T	88%	48%
12	FPPON10	13	FPP	GTC AAT GTC AGC G	80%	41%
13	FPPON11 ^[e]	15	FPP	GGT TGG TGT GGT TGG	82%	42%
14	FPPON12	16	FPP	GGA TAC TTT TGT ATC C	78%	35%
15	FPPON13	16	FPP	GGA TAT TTT TAT ATC C	97%*	19%
16	FPPON14	16	FPP	GTC AAT GTC AGC GAT A	85%	30%
17	FPPON15	25	FPP	CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG G	95%*	20%
18	FP-hTeloC ^[c]	24	FP	TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC	76%	24%

[a] Liczba nt. - liczba nukleotydów; [b] FPP - fluoro(di)fosforan, FP - fluoro(mono)fosforan; [c] Oligonukleotyd wykorzystany jako sonda molekularna w badaniu struktur i-motywu metodą ^{19}F NMR; [d] Oligonukleotyd wykorzystany jako sonda molekularna do monitorowania tworzenia się dupleksów DNA metodą ^{19}F NMR; [e] Oligonukleotyd wykorzystany jako sonda molekularna w badaniach zmian struktury G-kwadrupleksów oraz monitorowania oddziaływania białko-kwas nukleinowy metodą ^{19}F NMR * - przybliżona wartość;

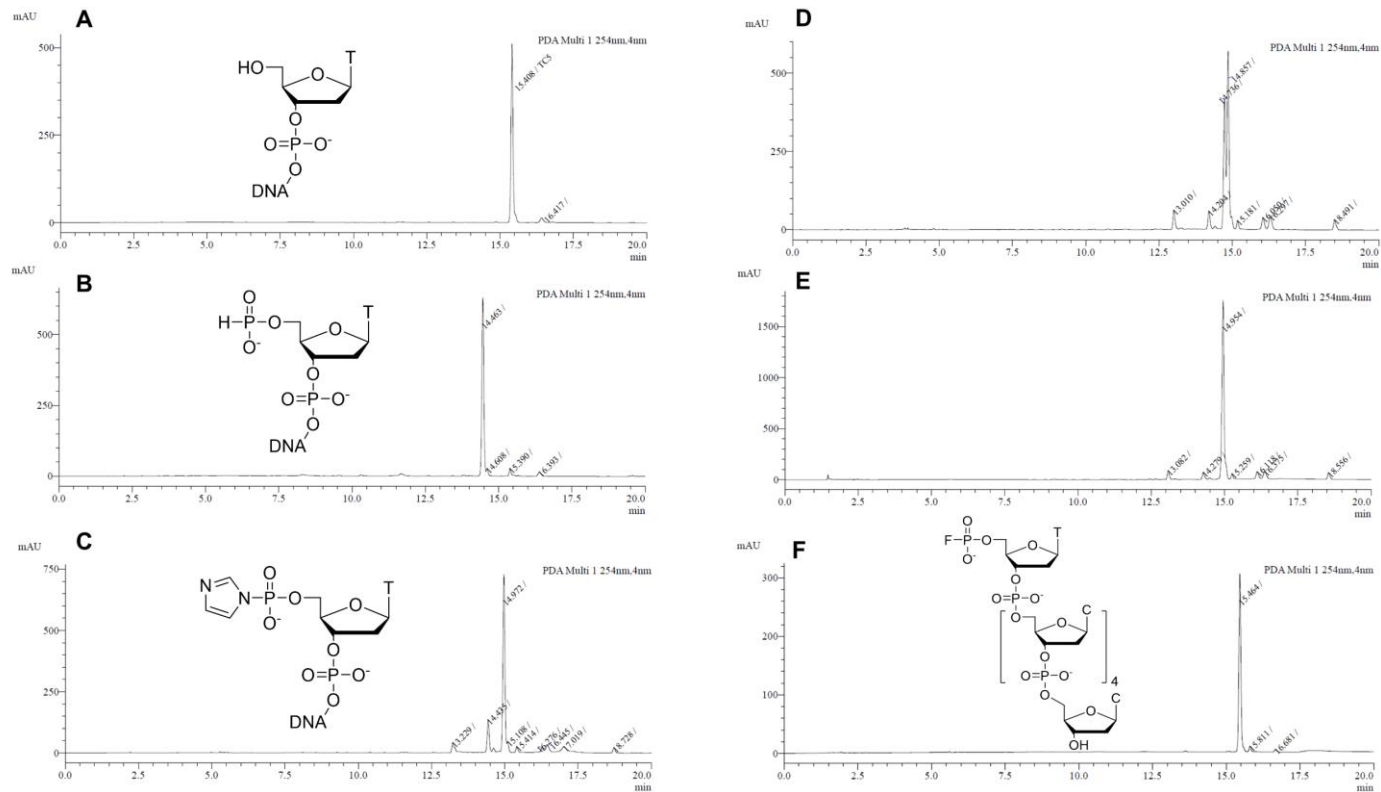
Oligonukleotydy zawierające grupę 5'-fluoro(mono)fosforanową otrzymałem metodą syntezy na podłożu stałym poprzez kilkuetapową funkcjonalizację grupy 5'-OH (Rys. 3-2).



Rys. 3-2. Schemat syntezy fluoro(mono)fosforanowych analogów nukleotydów (FPON) na podłożu stałym. Oznaczenia: B – zasada azotowa: T, C, A, G; TBAF – fluorek tetra-n-butyloamoniowy; AMA – mieszanina 1:1 30% amoniaku i 40% wodnego roztworu metyloaminy; n = 4 lub 22.

Podjednostki amidofosforynowe wykorzystałem do syntezy oligonukleotydu z grupą 5'-OH (I), który następnie w wyniku reakcji z H-fosfonianem difenylu został przekształcony w diester H-fosfonianowy, a ten w warunkach zasadowych ulegał hydrolizie do stabilnego 5'-H-fosfonianu (II). Kolejnym etapem reakcji było utlenianie H-fosfonianu do P-imidazolidu (III) w obecności CCl_4 , imidazolu oraz BSA (bis(trimetylosililo)acetamid), w wyniku czego powstawał P-imidazolid na końcu 5' oligonukleotydu. Ostatnim etapem syntezy była substytucja nukleofilowa jonami fluorkowymi, których źródłem jest fluorek tetra-n-butyloamoniowy (TBAF) rozpuszczony w DMSO, w obecności chlorku cynku, z utworzeniem wiązania P-F. Ostateczne przemycie złoża wodnym roztworem EDTA/ NaHCO_3 (w celu

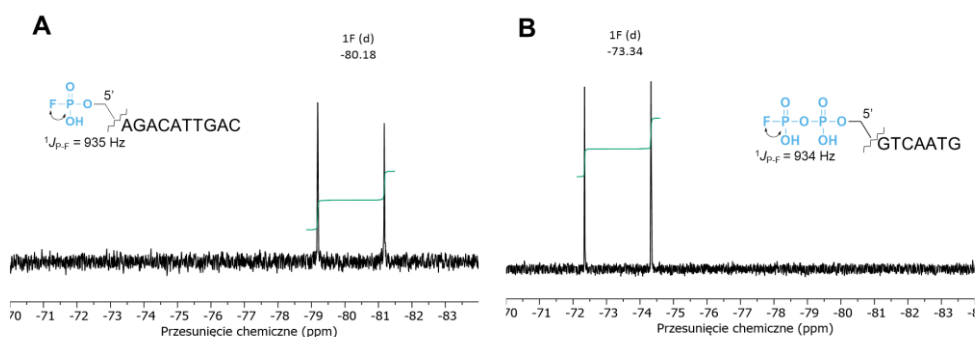
związania jonów cynku z jednoczesnym zachowaniem pH około 6,5), a następnie roztworem AMA skutkowało odcięciem oligonukleotydu od złoża z jednoczesną hydrolizą grup ochronnych, dając ostatecznie pożądany produkt (IV). Reprezentatywny przykład profili RP HPLC syntezy związku FPON1 (sekwencja TC₅) został przedstawiony na Rys. 3-3. W celu monitorowania przebiegu postępu reakcji chemicznych po każdym etapie pobierałem niewielką ilość złoża (1-2 mg) i oligonukleotyd odcinałem od fazy stałej roztworem AMA, odparowywałem roztwór do sucha, zawieszałem w niewielkiej ilości wody, zwirowywałem i analizowałem metodą RP HPLC. Potwierdzenie utworzenia odpowiednich związków pośrednich było możliwe dzięki analizom metodą spektrometrii mas z porównaniem wyników do mas teoretycznie obliczonych. Porównując profile HPLC na Rys. 3-3A oraz Rys. 3-3B, można zauważyć wyraźne skrócenie czasu retencji (15,4 min vs. 14,5 min) pomiędzy oligonukleotydami 5'-OH-TC₅ a 5'-HP-TC₅, co jest związane ze zwiększeniem polarności cząsteczki na skutek przyłączenia grupy H-fosfonianowej (wprowadzenie dodatkowego ładunku ujemnego). Utlenienie H-fosfonianu do P-imidazolidu nieznacznie wydłużyło czas retencji (Rys. 3-3C). Ostatnim etapem syntezy na podłożu stałym jest substytucja nukleofilowa jonem fluorkowym na atomie fosforu z odejściem reszty imidazolu. Pomimo wydłużenia czasu reakcji oraz zwiększenia nadmiaru jonów fluorkowych, po odcięciu oligonukleotydu od złoża i liofilizacji stopień konwersji do fluorofosforanu nie był zadowalający (Rys. 3-3D, 37% Im-P-TC₅ oraz 39% F-P-TC₅). Dlatego też, aby poprawić ostateczną konwersję, w przypadku każdej syntezy fluoro(mono)fosforanowych oligonukleotydów (FPON1, FPON3 oraz FP-hTeloC) przeprowadziłem dodatkową reakcję z TBAF w DMSO w obecności ZnCl₂ już po odcięciu oligonukleotydu z podłoża stałego. Zastosowane podejście przyniosło bardzo dobre rezultaty. Omawiana synteza oligonukleotydu FPON1 zakończyła się konwersją na poziomie 80% (Rys. 3-3E), a oczyszczony produkt charakteryzował się czystością na poziomie 95% (Rys. 3-3F). Za pomocą opisanej metody otrzymałem trzy oligonukleotydy przeznaczone do badań metodą ^{19}F NMR. Z wydajnością 15% wyizolowałem 10-nukleotyd przeznaczony do monitorowania tworzenia się dupleksów DNA (FPON3). Dwa kolejne związki to oligonukleotydy bogate w cytozyny FPON1 (20%) oraz FP-hTeloC (24%), zaprojektowane do monitorowania zmian strukturalnych związanych z tworzeniem/rozwijaniem *i*-motywów wywołanych zmianą pH roztworu, zmianą temperatury lub na skutek wiązania się z ligandem. Konwersje wyznaczone metodą HPLC oraz ostateczne wydajności oczyszczonych produktów (wydajności preparatywne) zostały przedstawione w Tabeli 3.1.



Rys. 3-3. Profile RP HPLC uzyskane podczas analizy mieszanin reakcyjnych syntezy oligonukleotydu FPON1 o sekwencji TC₅. A) Profil oligonukleotydu TC₅; B) Profil po pierwszym etapie syntezy - przyłączona grupa H-fosfonianowa do TC₅ w pozycji 5'; C) Profil aktywowanej podjednostki fosforanowej oligonukleotydu TC₅ (ImPTC₅); D) Profil po ostatnim etapie syntezy i liofilizacji. Dwa sygnały to mieszanina aktywowanego oligonukleotydu (ImPTC₅) oraz pożądanego produktu (oligonukleotydu z fluorofosforanem na końcu 5' – FPON1; E) Profil HPLC po dodatkowym etapie reakcji z TBAF; F) Profil oczyszczonego produktu FPON1.

3.2.2 Charakterystyka ^{19}F NMR oraz HRMS

Każdy z otrzymanych fluorofosforanowych oligonukleotydów został scharakteryzowany metodą ^{19}F NMR. Na wszystkich zarejestrowanych widmach obserwowałem pojedynczy dublet, którego cechą charakterystyczną jest duża stała sprzężenia spinowo-spinowego przez jedno wiązanie pomiędzy jądrem fluoru a jądrem fosforu ($^1J_{\text{P-F}}$), wynosząca około 935 Hz. Przesunięcie chemiczne ^{19}F NMR grupy fluoro(mono)fosforanowej (~ -80 ppm) jest inne niż grupy fluoro(di)fosforanowej (~ -73 ppm), co umożliwia jednoznaczne rozróżnienie tych dwóch reszt na widmach NMR (Rys. 3-4A i 4B). Przesunięcia chemiczne ^{19}F (δ_{F}) na widmach próbek rozpuszczonych w ciężkiej wodzie (D_2O) dla oligonukleotydów FPON1, FPON3 oraz FP-hTeloC przyjmują wartości około -80 ppm, natomiast stałe sprzężenia $^1J_{\text{P-F}}$ wynoszą kolejno 936 Hz, 935 Hz oraz 934 Hz). Sygnały ^{19}F NMR oligonukleotydów modyfikowanych 5'-fluoro(di)fosforanem charakteryzują się innym przesunięciem chemicznym na widmie i pojawiają się w regionie około -74 ppm, a stałe sprzężenia $^1J_{\text{P-F}}$ wynoszą od 932 Hz dla FPPON11 do 936 Hz dla FPPON15). Brak znaczących różnic δ_{F} oraz $^1J_{\text{P-F}}$ na widmach ^{19}F NMR świadczy o braku wpływu rodzaju pierwszej zasady azotowej od strony 5' nici czy długości łańcucha oligonukleotydowego na te parametry w pojedynczej cząsteczce DNA. Zmiany w przesunięciach i stałych sprzężenia zostały wcześniej zaobserwowane dla fluorofosforanowych analogów mononukleotydów, które w obrębie łańcucha fosforanowego posiadały inne modyfikacje, takie jak obecność atomu siarki (S^-), grupy boranowej (BH_3^-) czy grupy imidowej (NH) (117).



Rys. 3-4. Widma ^{19}F NMR oligonukleotydów rozpuszczonych w D_2O . A) Widmo ^{19}F NMR FPON3; B) Widmo ^{19}F NMR FPPON2.

Podsumowując, widma ^{19}F NMR oligonukleotydów potwierdziły obecność grupy fluorofosforanowej w obrębie oligonukleotydu, natomiast ostatecznym potwierdzeniem struktur otrzymanych związków były pomiary metodą spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (HRMS). Wartości stałych sprzężenia $^1J_{\text{F-P}}$ oraz wyniki pomiarów HRMS fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów zestawiono w Tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Wartości stałych sprzężenia $^1J_{F-P}$ oraz wyniki pomiarów HRMS fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów.

Oligo.	Liczba nt. ^[a]	Koniec 5' ^[b]	Sekwencja (5'→3')	Skład	Teoret. (m/z)	Zmierzone (m/z)	$\Delta \frac{m}{z}$	$\delta^{19}F$ (ppm)	$^1J_{F-P}$ (Hz)
FPON1 ^[c]	6	Fp	TCC CCC	C ₅₅ H ₇₂ FN ₁₇ O ₃₇ P ₆ ²⁻	883,63478	883,63531	1	-79,86 ^[f]	936
FPPON1 ^[c]	6	Fpp	TCC CCC	C ₅₅ H ₇₃ FN ₁₇ O ₄₀ P ₇ ²⁻	923,61795	923,61885	1	-73,06 ^[f]	935
FPPON2	7	Fpp	GTC AAT G	C ₆₉ H ₈₆ FN ₂₇ O ₄₅ P ₈ ²⁻	1139,65835	1139,65965	1	-73,34	934
FPON3 ^[d]	10	Fp	AGA CAT TGA C	C ₉₈ H ₁₂₀ FN ₄₀ O ₅₈ P ₁₀ ³⁻	1037,83489	1037,83648	2	-80,18	935
FPPON3 ^[d]	10	Fpp	AGA CAT TGA C	C ₉₈ H ₁₂₁ FN ₄₀ O ₆₁ P ₁₁ ³⁻	1064,49033	1064,49194	2	-73,49	935
FPPON4	10	Fpp	TGA CAT TGA C	C ₉₈ H ₁₂₂ FN ₃₇ O ₆₃ P ₁₁ ³⁻	1061,48648	1061,48788	1	-73,33	934
FPPON5	10	Fpp	GTC AAT GTC C	C ₉₇ H ₁₂₂ FN ₃₅ O ₆₄ P ₁₁ ³⁻	1053,48273	1053,48426	1	-73,51	934
FPPON6	10	Fpp	GGA CAT TGA C	C ₉₈ H ₁₂₁ FN ₄₀ O ₆₂ P ₁₁ ³⁻	1069,82197	1069,82293	1	-73,45	934
FPPON7	10	Fpp	ATC AAT GTC G	C ₉₈ H ₁₂₂ FN ₃₇ O ₆₃ P ₁₁ ³⁻	1061,48648	1061,48737	1	-73,30	934
FPPON8	10	Fpp	CGA CAT TGA T	C ₉₈ H ₁₂₂ FN ₃₇ O ₆₃ P ₁₁ ³⁻	1061,48648	1061,48751	1	-73,46	935
FPPON9	10	Fpp	GTC AAT GTC T	C ₉₈ H ₁₂₃ FN ₃₄ O ₆₅ P ₁₁ ³⁻	1058,48262	1058,48364	1	-73,54	934
FPPON10	13	Fpp	GTC AAT GTC AGC G	C ₁₂₇ H ₁₅₈ FN ₅₀ O ₈₁ P ₁₄ ³⁻	1377,20362	1377,20421	0	-73,52	934
FPPON11 ^[e]	15	Fpp	GGT TGG TGT GGT TGG	C ₁₅₀ H ₁₈₄ FN ₅₇ O ₉₉ P ₁₆ ⁴⁻	1220,42309	1220,42932	5	-73,26	932
FPPON12	16	Fpp	GGA TAC TTT TGT ATC C	C ₁₅₇ H ₁₉₄ FN ₆₂ O ₉₈ P ₁₇ ⁴⁻	1254,43380	1254,43400	2	-73,43	934
FPPON13	16	Fpp	GGA TAT TTT TAT ATC C	C ₁₅₈ H ₁₉₈ FN ₅₂ O ₁₀₃ P ₁₇ ⁴⁻	1254,18499	1254,18523	2	-73,64	935
FPPON14 ^[d]	16	Fpp	GTC AAT GTC AGC GAT A	C ₁₅₇ H ₁₉₅ FN ₆₂ O ₉₈ P ₁₇ ³⁻	1687,25737	1687,25876	1	-73,33	934
FPPON15	25	Fpp	CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG G	C ₂₄₇ H ₃₀₁ FN ₁₀₇ O ₁₅₂ P ₂₆ ⁵⁻	1604,24604	1604,24765	1	-73,39	936
FP-hTeloC ^[c]	24	Fp	(TAA CCC) ₄	C ₂₂₈ H ₂₈₉ FN ₈₄ O ₁₄₀ P ₂₄ ⁴⁻	1801,30192	1801,29517	4	-79,95 ^[f]	934

Uzupełnienie do tabeli 3.2: [a] – Liczba nt. - liczba nukleotydów; [b] FPP - fluoro(di)fosforan, FP - fluoro(mono)fosforan; [c] Oligonukleotyd wykorzystany jako sonda molekularna w badaniu struktur *i*-motyw metodą ^{19}F NMR; [d] Oligonukleotyd wykorzystany jako sonda molekularna do monitorowania tworzenia się dupleksów DNA metodą ^{19}F NMR; [e] Oligonukleotyd wykorzystany jako sonda molekularna w badaniach zmian struktury G-kwadrupleksów oraz monitorowania oddziaływania białko-kwas nukleinowy metodą ^{19}F NMR; [f] pomiar wykonano w buforze cytrynianowym o pH 4,2.

3.2.3 Synteza niemodyfikowanych oligonukleotydów

Aby zbadać wpływ umieszczenia na końcu 5' DNA grup fluoro(mono)- czy fluoro(di)fosforanowej na stabilność tworzenia się dupleksów DNA, G-kwadrupleksu i *i*-motywów, otrzymałem szereg niemodyfikowanych oligonukleotydów o sekwencji takiej samej jak ich fluorofosforylowane odpowiedniki (Tabela 3.3). Do tego celu wykorzystałem metodę syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym, wychodząc z 2 μ moli substratu. Otrzymałem dziesięć 10-nukleotydowych oligonukleotydów, wśród których znalazła się sekwencja ON3 identyczna jak dla związków znakowanych fluorofosforanem (FPON3 i FPPON3). Zsyntetyzowałem także sekwencje ON4-ON5, ON9 oraz ON20-ON25 zaprojektowane do badań tworzenia się dupleksów DNA. Z wydajnością preparatywną równą 38% i 30% wyizolowałem kolejno sekwencje tworzące *i*-motywy: ON1 oraz hTeloC. Ostatnią grupą niemodyfikowanych fluorem oligonukleotydów były G-kwadrupleksy. Dwie 15-nukleotydowe sekwencje, gdzie jedna z nich zawiera fosforan na końcu 5', wyizolowałem z wydajnościami 42% (PON11) i 57% (ON11) (Tabela 3.3). Struktury otrzymanych związków potwierdziłem metodą wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS).

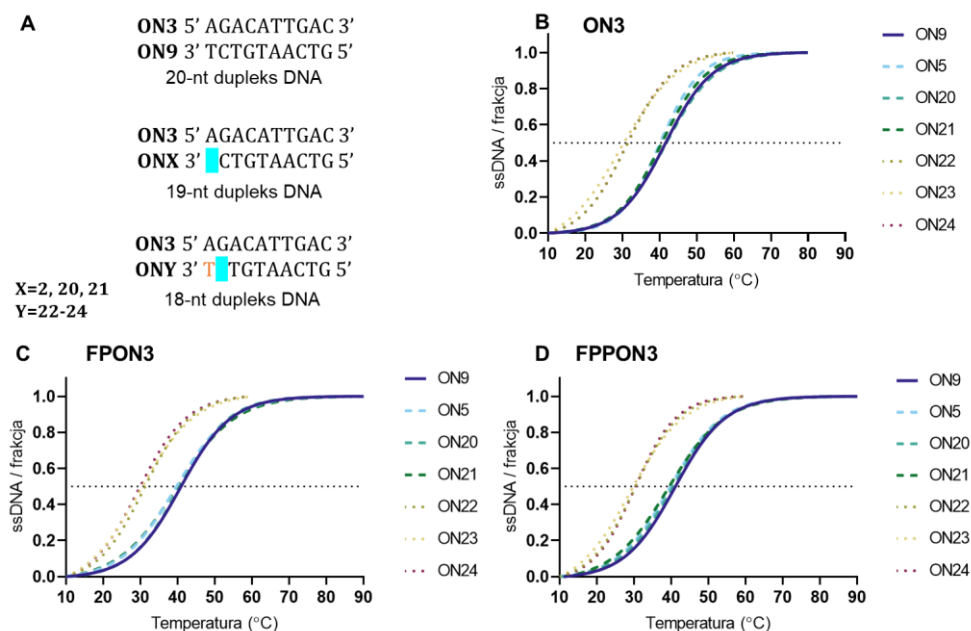
Tabela 3.3. Wydajności syntez niemodyfikowanych oligonukleotydów oraz wyniki ich analizy metodą spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (HRMS).

Lp.	Oligo.	Liczba nt.	Sekwencja (5'→3')	Wyd. prep. ^a	Formuła molekularna	Oblicz. (m/z)	Zmierzone (m/z)	$\Delta \frac{m}{z}$
1	ON1	6	TCC CCC	38%	C ₅₅ H ₇₂ N ₁₇ O ₃₅ P ₅ ²⁻	842,65379	842,65435	1
2	hTeloC	24	(TAA CCC) ₄	30%	C ₂₂₈ H ₂₈₉ N ₈₄ O ₁₃₈ P ₂₃ ⁴⁻	1780,80415	1780,80475	1
3	ON3	10	AGA CAT TGA C	16%	C ₉₉ H ₁₂₁ N ₄₀ O ₅₆ P ₉ ³⁻	1010,51423	1010,51660	2
4	ON4	10	TGA CAT TGA C	35%	C ₉₈ H ₁₂₁ N ₃₇ O ₅₈ P ₉ ³⁻	1007,51037	1007,51482	4
5	ON5	10	GTC AAT GTC C	20%	C ₉₇ H ₁₂₁ N ₃₅ O ₅₉ P ₉ ³⁻	999,50662	999,51110	4
6	ON9	10	GTC AAT GTC T	29%	C ₉₈ H ₁₂₂ N ₃₄ O ₆₀ P ₉ ³⁻	1004,50652	1004,51057	4
7	ON11	15	GGT TGG TGT GGT TGG	57%	C ₁₅₀ H ₁₈₄ N ₅₇ O ₉₄ P ₁₄ ³⁻	1573,59044	1573,59159	1
8	PON11 ^b	15	P-GGT TGG TGT GGT TGG	42%	C ₁₅₀ H ₁₈₅ N ₅₇ O ₉₇ P ₁₅ ³⁻	1600,24588	1600,24497	1
9	ON20	10	GTC AAT GTC G	27%	C ₉₈ H ₁₂₁ N ₃₇ O ₅₉ P ₉ ³⁻	1012,84201	1012,84612	4
10	ON21	10	GTC AAT GTC A	25%	C ₉₈ H ₁₂₁ N ₃₇ O ₅₈ P ₉ ³⁻	1007,51037	1007,51098	1
11	ON22	10	GTC AAT GTT T	40%	C ₉₉ H ₁₂₃ N ₃₃ O ₆₁ P ₉ ³⁻	1009,50640	1009,50718	1
12	ON23	10	GTC AAT GTG T	20%	C ₉₉ H ₁₂₂ N ₃₆ O ₆₀ P ₉ ³⁻	1017,84190	1017,84319	1
13	ON24	10	GTC AAT GTA T	30%	C ₉₉ H ₁₂₂ N ₃₆ O ₅₉ P ₉ ³⁻	1012,51026	1012,51180	2
14	ON25	10	TGA CAT TGA T	32%	C ₉₉ H ₁₂₂ N ₃₆ O ₅₉ P ₉ ³⁻	1012,51026	1012,51121	1

^a oligonukleotydy zostały otrzymane wychodząc z 2 μmoli substratu, ^b „P” odnosi się do grupy fosforanowej na końcu 5’.

3.2.4 Wpływ fluorofosforanu na stabilność struktur drugorzędowych DNA

Najważniejszymi oddziaływaniami stabilizującymi drugorzędowe struktury DNA są te, które występują pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi. Pomimo iż grupa fluorofosforanowa została wprowadzona na końcu 5' nici oligonukleotydowej, zbadałem jej wpływ na stabilność struktur DNA metodą spektroskopii absorpcyjnej UV/VIS (Rys. 3-5). Względą stabilność dupleksów określałem poprzez obserwację zmian absorbancji roztworu dwuniciowego DNA w funkcji temperatury (201). Termiczna denaturacja DNA (zwana także procesem mięknienia) to rozwinięcie struktury drugorzędowej DNA do formy pojedynczej nici (ssDNA) pod wpływem wzrostu temperatury. W trakcie rozwijania dupleksu DNA obserwowany jest efekt hiperchromowy, czyli wzrost absorbancji (podwyższenie natężenia pasma absorpcji) badanego materiału. Dupleks DNA jest stabilizowany głównie przez oddziaływania warstwowe, wiązania wodorowe oraz efekt hydrofobowy, które występują pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi. Wiązania wodorowe ograniczają rezonans pierścienia aromatycznego, co zmniejsza współczynniki absorpcji (współczynniki ekstynkcji) zasad azotowych. Kiedy podwójna helisa DNA dysocjuje do dwóch pojedynczych nici, następuje zerwanie wiązań wodorowych i osłabienie pozostałych oddziaływań, co prowadzi do zwiększenia absorbancji roztworu. Efekt hiperchromowy podczas rozwijania dupleksów DNA badany jest rutynowo dla długości fali 260 nm (maksimum pasma absorpcji). Absorbancja jednoniciowego DNA jest zazwyczaj o 37% wyższa niż dwuniciowego DNA przy tym samym stężeniu analitu. Efektem przeciwnym do hiperchromowego jest efekt hipochromowy, który jest przydatny przy badaniu struktur G-kwadruleksów oraz *i*-motywów, o czym będę pisał szczegółowo w dalszej części niniejszego rozdziału. Badanie zmian absorbancji próbki dwuniciowego DNA w funkcji temperatury umożliwia wyznaczenie tzw. krzywej mięknienia, a na jej podstawie obliczenie wartości temperatury denaturacji (T_m) (mięknienia, przejścia – temperatura, w której statystycznie połowa populacji nici DNA jest rozwinięta, a połowa znajduje się w kompleksie). Wartość T_m zależy od długości kwasu nukleinowego, liczby wiązań wodorowych, jonów, które mogą dodatkowo stabilizować kompleks, czy pH oraz siły jonowej (202,203). Im wyższe T_m w danych warunkach, tym stabilniejsza struktura DNA. Dla DNA o ustalonej długości T_m zależy od sekwencji DNA i rośnie wraz ze wzrastającą zawartością par G-C.

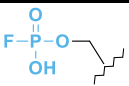
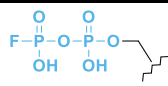


Rys. 3-5. Badanie duplexów DNA metodą UV/VIS. A) Przykłady badanych komplementarnych duplexów DNA i duplexów, w których jedna z zasad azotowych była niekomplementarna (kolor niebieski, A). Kolorem pomarańczowym zaznaczono tyminę, która prawdopodobnie nie bierze udziału w stabilizacji podwójnej helisy DNA (A). Dopasowane do danych doświadczalnych krzywe mięknienia badanych duplexów DNA dla: B) ON3, C) FPON3 oraz D) FPPON3.

Stabilność duplexów FPON3, FPPON3 oraz ich niemodyfikowanego odpowiednika ON3 z komplementarną sekwencją ON9 oraz sekwencjami posiadającymi jedną niekomplementarność na ostatniej (ON5, ON20-ON21) lub przedostatniej pozycji (ON22-ON24) na końcu 3' nici, została zbadana poprzez monitorowanie absorpcji przy 260 nm w trakcie powolnej zmiany temperatury w zakresie 10°C – 90°C w buforze fosforanowym o pH 7,0 (Rys. 3-5A-D). Na podstawie otrzymanych krzywych mięknienia wyznaczyłem T_m , co zostało dokładnie opisane w części eksperymentalnej. Wyznaczona temperatura mięknienia dla niemodyfikowanego duplexu (ON3:ON9) wyniosła 41,6°C. Wartości T_m wyznaczone dla duplexów FPON3 i FPPON3 z komplementarnym oligonukleotydem ON9 wyniosły kolejno 40,8°C oraz 41,0°C. Analizując trzy powyższe wyniki można zauważyć, że grupa fluoro(mono)fosforanowa obniża temperaturę mięknienia duplexu o 0,8°C, natomiast modyfikacja fluoro(di)fosforanowa obniża ją o 0,6°C w porównaniu z duplexem składającym się z sekwencji nie posiadających żadnych dodatkowych modyfikacji. Niższe wartości T_m oznaczają lekko destabilizujący wpływ grupy fluorofosforanowej na duplexy DNA, jednak zmiany te nie są znaczące, a wręcz można powiedzieć, że mieszczą się w błędzie pomiarowym.

Kolejne dziewięć przeprowadzonych eksperymentów to hybrydyzacje z nie w pełni komplementarnymi oligonukleotydami ON5 i ON20-ON21. Pojedyncza niekomplementarność została umieszczona na końcu 3' nici tworzącej dupleks z FPON3, FPPON3 czy ON3. Otrzymane wartości T_m dla eksperymentów z sekwencją bez modyfikacji na końcu 5' (ON3) mieszczą się w zakresie od 40,2°C do 41,8°C (wiersz 1–4, kolumna 3, Tabela 3.4), natomiast dla oligonukleotydów znakowanych FP oraz FPP są o około 1°C niższe (wiersz 1–4, kolumna 1–2, Tabela 3.4). Zaobserwowane różnice ΔT_m wynikające z niekomplementarności sekwencji na końcu 3' są bardzo niewielkie, przez co trudno je wykryć tradycyjnymi metodami (UV/VIS).

Tabela 3.4. Wyznaczone metodą UV/VIS temperatury mięknienia dupleksów DNA.

			5' AGA CAT TGA C 3' (ON3)					
Modyfikacja na końcu 5' →								
w.*	Komp. oligo	Sekwencja 3' → 5'	FPON3 (kol. 1)	ΔT_m	FPPON3 (kol. 2)	ΔT_m	ON3 (kol.3)	ΔT_m
1	ON9	TCT GTA ACT G	40,8 °C	0°C	41,0°C	0°C	41,6°C	0°C
2	ON5	<u>C</u> CT GTA ACT G	39,5°C	-1,3°C	39,6°C	-1,4°C	40,2°C	-1,4°C
3	ON20	<u>G</u> CT GTA ACT G	40,5°C	-0,3°C	40,3°C	-0,7°C	41,8°C	+0,2°C
4	ON21	A <u>C</u> T GTA ACT G	39,6°C	-1,2°C	39,1°C	-1,9°C	40,6°C	-1,0°C
5	ON22	T T <u>T</u> GTA ACT G	30,9°C	-9,9°C	30,1°C	-10,9°C	31,2°C	-10,4°C
6	ON23	T <u>G</u> T GTA ACT G	29,8°C	-11,0°C	29,0°C	-12,0°C	29,6°C	-12,0°C
7	ON24	T A <u>T</u> GTA ACT G	29,4°C	-11,4°C	30,2°C	-10,8°C	31,2°C	-10,4°C

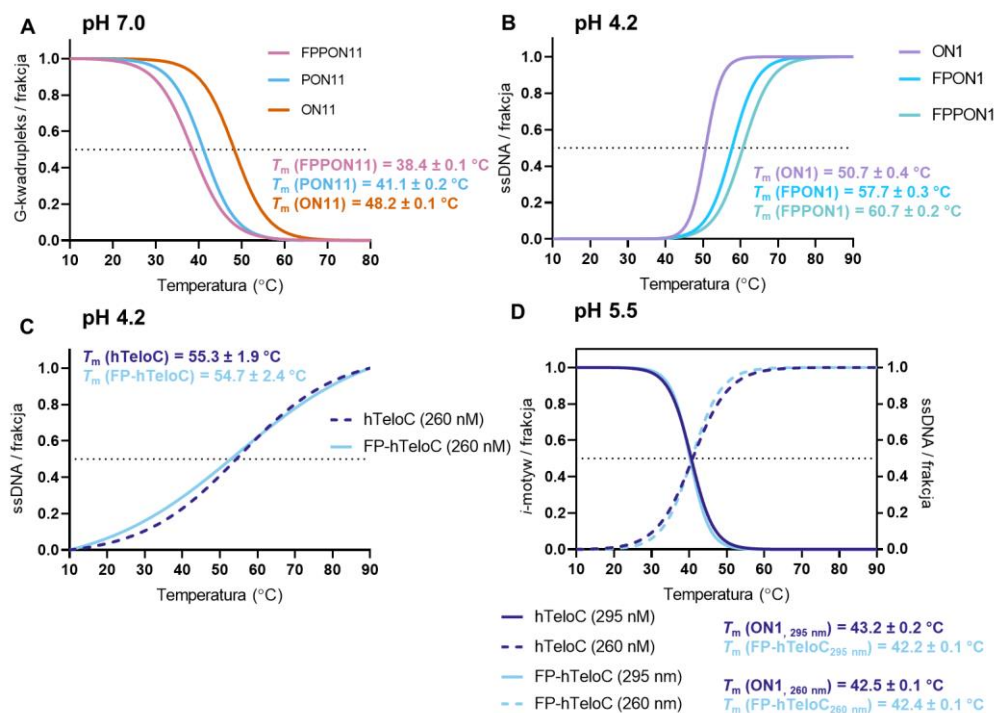
Rodzaj niekomplementarności (zasada azotowa) oraz miejsce występowania w sekwencji zostały podkreślone; na szaro zostały zaznaczone wyniki eksperymentów z sekwencją komplementarną; *w – wiersz tabeli; Odchylenia standardowe mieszczą się w zakresie $\pm 0,1^\circ\text{C} - 0,6^\circ\text{C}$ i nie zostały podane, aby zachować lepszą czytelność tabeli.

Kolejny zestaw eksperymentów obejmował sekwencje ON22-ON24, w których pojedyncze niekomplementarności znajdowały się na przedostatnim miejscu nici. W porównaniu z dupleksem komplementarnym (ON3:ON9), dupleksy pomiędzy ON9 a ON22-ON24 charakteryzowały się znacznie niższą stabilnością, a otrzymane T_m są o około 10°C niższe i przyjmują wartości od 29,0°C do 31,2°C (wiersz 5–7, Tabela 3.4). Porównując temperatury mięknienia pomiędzy modyfikacjami fluorofosforanowymi a ich brakiem, nie widać większych różnic w T_m .

Powyższe dane wskazują na brak istotnego wpływu grupy fluorofosforanowej i fluoro(di)fosforanowej na stabilność dupleksów DNA. Obniżenie T_m dla dupleksów niekomplementarnych jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, w których wpływ na stabilność tych struktur drugorzędowych mają zarówno pojedyncze, jak i podwójne niekomplementarności nukleotydowe, rodzaj nieparujących się zasad azotowych (transdukcje, transwersje) oraz umiejscowienie niekomplementarności w sekwencji oligonukleotydowej (204,205). Te ostatnie wydają się mieć największe znaczenie. Przykładowo, umiejscowienie niekomplementarności w środku 9-nukleotydowej nici zmienia wartość T_m nawet o 15°C na niekorzyść stabilności dupleksu (206,207). Temperatury mięknienia obniżone w zakresie 1°C-4°C zaobserwowano dla niekomplementarności znajdujących się na ostatnim i przedostatnim miejscu dupleksów DNA (208), natomiast podwójne i potrójne niekomplementarności powodują dalsze obniżenie T_m , ale zmiana ta zależy od rodzaju zasad azotowych (209). Obniżenie temperatury mięknienia o 10°C (Tabela 3.4, wiersz 5-7) jest najprawdopodobniej wynikiem braku utworzenia się wiązań wodorowych nie tylko pomiędzy guaniną a testowaną niekomplementarnością, ale także brakiem oddziaływania stabilizującego pomiędzy adeniną znajdującą się na końcu 5' jednej nici a komplementarną do niej tyminą. Efektem jest utworzenie 18-nukleotydowej podwójnej nici DNA o niższej wartości T_m . Kluczowy może być także brak parowania pomiędzy guaniną a cytozyną, która to para ma największy wkład w stabilizację dupleksów DNA.

Zbadałem wpływ grupy fluorofosforanowej na stabilność G-kwadrupleksu, FPPON11, sekwencji przyjmujących strukturę *i*-motywów, FPON1, FPPON1, FP-hTeloC, oraz ich niemodyfikowanych odpowiedników ON11, PON11, ON1 i hTeloC. W tym celu wykonałem analogiczne eksperymenty temperaturowe jak dla dupleksów DNA opisane powyżej, z tym, że pomiary wykonywałem przy innych długościach fali. Podczas rozwinięcia struktury G-kwadrupleksu (lub *i*-motywu) na skutek zwiększającej się temperatury, dochodzi do obniżenia intensywności absorbancji przy długości fali 295 nm (efekt hipochromowy) (210). Dlatego pomiary w przypadku tych sekwencji prowadziłem przy dwóch długościach fali, tj. 295 nm i porównawczo 260 nm. Pomiary absorbancji w funkcji temperatury wykonałem dla trzech oligonukleotydów o tej samej sekwencji przyjmującej strukturę G-kwadrupleksu: 5' GGT TGG TGT GGT TGG 3' (TBA), ale posiadających różne grupy funkcyjne na końcu 5': hydroksylową (OH, oligonukleotyd ON11), fosforanową (P, oligonukleotyd PON11) oraz fluoro(di)fosforanową

(FPP, oligonukleotyd FPPON11). Sekwencja niemodyfikowana, ON11, charakteryzuje się temperaturą mięknięcia o wartości 48,2°C. Obecność 5'-fosforanu obniża stabilność G-kwadrupleksu do 41,1°C, a wartość T_m oligonukleotydu FPPON11 obniża się o kolejne 3°C (Rys. 3-6A). Wyraźne obniżenie temperatur mięknięcia sekwencji modyfikowanych na końcu 5' oznacza destabilizację struktury drugorzędowej DNA.



Rys. 3-6. Profile temperaturowe uzyskane metodą UV/VIS. A) Wyniki dla G-kwadrupleksów badanych w 10 mM KH_2PO_4 , 70 mM KCl, 0,2 mM EDTA, pH=7,0, 10% D_2O , pomiar w 295 nm; B) Wyniki dla krótkich *i*-motywów badanych w pH 4,2, pomiar w 260 nm; C) Wyniki dla długich *i*-motywów w pH 4,2, pomiar w 260 nm; D) Wyniki dla długich *i*-motywów w pH 5,5, pomiar w 260 nm i 295 nm. Warunki: 50 mM cytrynian sodu, 10% D_2O ,

Następnie zbadałem wpływ grupy FP oraz FPP na stabilność sekwencji tworzących struktury *i*-motywu. Związki 6-nukleotydowe o sekwencji 5'-TCCCC-3' znakowane fluoro(mono)fosforanem (FPON1), fluoro(di)fosforanem (FPPON1) oraz niemodyfikowana sekwencja (ON1) zostały zbadane w pH 4,2, które zapewnia utworzenie stabilnej struktury drugorzędowej *i*-motywu. Uzyskane wyniki sugerują stabilizujący wpływ grupy fluoro(mono)fosforanowej (+7°C) oraz fluoro(di)fosforanowej (+10°C) w porównaniu do oligonukleotydu z grupą 5'-OH (ON1), dla którego wartość temperatury mięknięcia wyniosła

50,7°C (Rys. 3-6B). Ostatni zestaw eksperymentów UV/VIS odnosi się do dłuższej sekwencji hTeloC: 5' TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC 3', która w warunkach niskiego pH również związa się do struktury *i*-motywu. Wykonałem eksperymenty dla oligonukleotydu niemodyfikowanego, hTeloC, oraz jego 5'-fluoro(mono)fosforanowego odpowiednika FP-hTeloC w pH 4,2 oraz pH 5,5. Również w tym przypadku niższe pH zapewnia stabilniejszą strukturę *i*-motywu, lecz w pH 5,5, w którym równowaga kwasowo-zasadowa jest bliższa warunkom występującym w komórkach, omawiana sekwencja wciąż przyjmuje strukturę drugorzędową. Wartości temperatur mięknienia w pH 4,2 hTeloC oraz FP-hTeloC plasują się na poziomie 55°C, natomiast w pH 5,5 T_m obniża się do około 43°C. Uzyskane wyniki są porównywalne dla obu oligonukleotydów (Rys. 3-6C oraz Rys. 3-6D). Co ciekawe, omawiany wcześniej efekt hipochromowy widoczny był jedynie dla pomiarów w pH 5,5, natomiast w pH 4,2 obserwowano jedynie efekt hiperchromowy (tutaj wyjątkowo w 260 nm, a nie w 295 nm).

Tabela 3.5. Zestawienie wartości temperatur mięknienia uzyskanych metodą UV/VIS dla sekwencji oligonukleotydów tworzących struktury *i*-motywu oraz G-kwadrupleksu.

Sekwencja (5'→3')	Lza. ^[a]	Nazwa	pH 4.2		pH 5.5	
			260 nm	295 nm	260 nm	295 nm
TCCCCC	6	ON1	50,7 ± 0,4°C	n.d.*	---	---
TCCCCC	6	FPON1	57,7 ± 0,3°C	n.d.*	---	---
TCCCCC	6	FPPON1	60,7 ± 0,3°C	n.d.*	---	---
(TAACCC) ₄	24	hTeloC	55,3 ± 1,9°C	n.d.*	42,5 ± 0,1°C	43,2 ± 0,2°C
(TAACCC) ₄	24	FP-hTeloC	54,7 ± 2,4°C	n.d.*	42,4 ± 0,1°C	42,2 ± 0,1°C

[a] Lza.- liczba zasad azotowych; [*] nie zaobserwowano ani efektu hiperchromowego ani hipochromowego.

Podsumowując, zbadałem wpływ obecności grupy 5' fluoro(mono)- oraz 5' fluoro(di)fosforanowej na stabilność tworzenia się struktur drugorzędowych DNA takich jak: duplekсы, G-kwadrupleksy oraz struktury *i*-motywów. Na podstawie uzyskanych wyników można jednoznacznie stwierdzić, że FP oraz FPP nie mają wpływu na stabilność dupleksów DNA oraz dłuższej sekwencji *i*-motywu (FP-hTeloC). Obniżenie wartości T_m zaobserwowałem dla analogu fosforanowego (PON11) oraz fluoro(di)fosforanowego (FPPON11) sekwencji

tworzących G-kwadrupleks, a podwyższenie wartości T_m zaobserwowałem dla krótszych sekwencji *i*-motywów (ON1 vs. FPON1 i FPPON1, Tabela 3.5). Zmiany w stabilności mogą wynikać z dodatkowych oddziaływań ujemnie naładowanych grup fosforanowych/fluorofosforanowych, które mogą stabilizować lub destabilizować strukturę drugorzędową DNA, jednak dokładna przyczyna zmian T_m nie została ustalona. Opisane w niniejszym podrozdziale wyniki pozwoliły również na dobranie odpowiednich warunków temperaturowych dla przeprowadzonych następnie eksperymentów ^{19}F NMR.

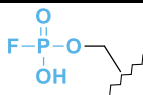
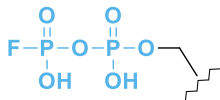
3.2.5 Zastosowanie sond molekularnych w badaniach metodą ¹⁹F NMR

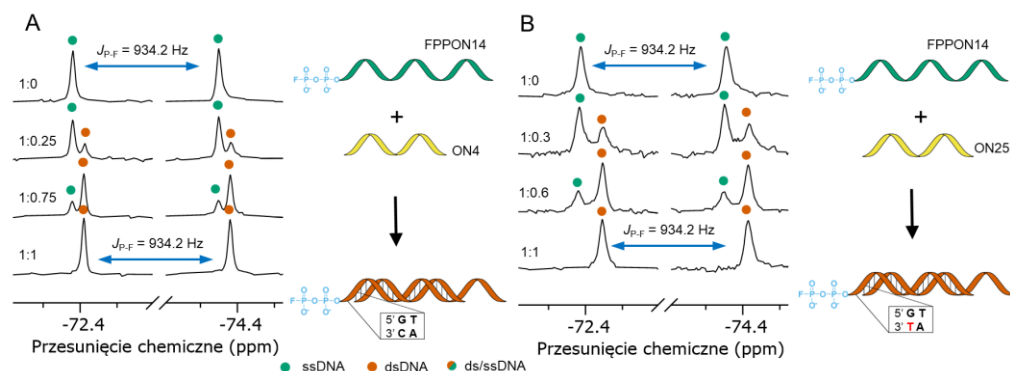
Opracowane podejścia syntetyczne miały na celu wytworzenie narzędzi biofizycznych, które umożliwią badania zmian strukturalnych i monitorowanie oddziaływań kwasów nukleinowych z białkami bądź ligandami metodą ¹⁹F NMR. Jako cel badawczy obrałem różnego rodzaju drugorzędowe struktury DNA, poczynając od dupleksów składających się z dwóch pojedynczych nici, gdzie jedna z nich była znakowana fluorowym znacznikiem, przechodząc do struktur takich jak G-kwadruplekсы czy *i*-motywy. Ponadto, zbadałem użyteczność zsyntetyzowanych sond molekularnych do monitorowania oddziaływania pomiędzy kwasem nukleinowym i białkiem oraz wiązania się małowcząsteczkowych ligandów do drugorzędowych struktur DNA.

3.2.5.1 Duplekсы DNA i niekomplementarności nukleotydowe

Fluorofosforanowe analogi oligonukleotydów wykorzystałem jako sondy molekularne do monitorowania procesu tworzenia się dupleksów DNA oraz wykrycia pojedynczych niekomplementarności nukleotydowych z wykorzystaniem metody ¹⁹F NMR. Na tym etapie badań przeprowadziłem dwa typy eksperymentów, które można rozróżnić ze względu na rodzaj utworzonych dupleksów DNA: a) duplekсы pomiędzy fluorofosforanowym analogiem oligonukleotydu a oligonukleotydem w pełni komplementarnym oraz b) duplekсы pomiędzy fluorofosforanowym analogiem oligonukleotydu a oligonukleotydem, który na swoim końcu 3' posiada jedną zasadę niekomplementarną do nici fluorowanej. Tabela 3.6 przedstawia oligonukleotydy wykorzystane jako fluorowane sondy, dla których wyniki badań ¹⁹F NMR zostały opisane w niniejszym podrozdziale.

Tabela 3.6. Sondy molekularne wykorzystane w badaniach dupleksów DNA metodą ¹⁹F NMR.

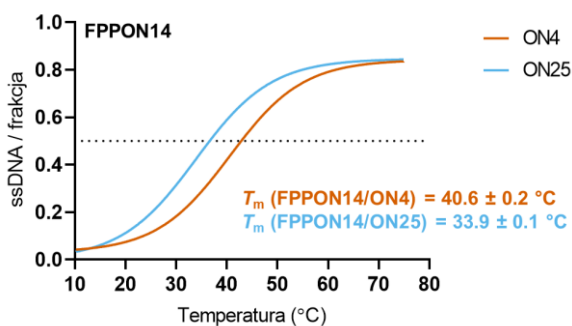
Nr.	Oligo.	Sekwencja (5'→3')	Modyfikacja na końcu 5'
1	FPON3	AGA CAT TGA C	
2	FPPON3	AGA CAT TGA C	
3	FPPON14	GTC AAT GTC AGC GAT A	



Rys. 3-7. Monitorowanie tworzenia się dupleksów DNA metodą ^{19}F NMR. A) Powstawanie duplesu pomiędzy FPPON14 a ON4; B) Powstawanie duplesu pomiędzy FPPON14 a ON25. Niekomplementarność została zaznaczona na schemacie czerwonym kolorem. Pomiary prowadzono w temperaturze 23°C .

Przykładowy eksperyment przebiegał następująco: 16-nukleotydowa sekwencja znakowana 5'-fluoro(di)fosforanem (FPPON14 – 5' GTC AAT GTC AGC GAT A 3') została rozpuszczona w stężeniu $200 \mu\text{M}$ w buforze do hybrydyzacji o pH 7,0. Dla tak przygotowanej próbki zarejestrowano widmo ^{19}F NMR (Rys. 3-7A i B górne widma). Następnie dodano niewielką objętość stężonego dekanukleotydu komplementarnego (ON4 – 5' TGA CAT TGA C 3'), aby jego stężenie końcowe w próbce wyniosło $50 \mu\text{M}$. Roztwór zawierający mieszaninę komplementarnych nici w stosunku 4:1 podgrzano do 95°C oraz ochłodzono na lodzie do temperatury około 4°C . W kolejnym kroku, w temperaturze równej 23°C wykonano pomiar ^{19}F NMR obserwując zmiany pojawiające się na widmie. Procedurę powtarzano aż do uzyskania pełnego kompleksu FPPON14:ON4 ($200 \mu\text{M} : 200 \mu\text{M}$). Po każdym dodaniu komplementarnego oligonukleotydu roztwór ogrzewano i ochładzano. Te dwie dość skrajne temperatury miały na celu całkowitą destabilizację struktur utworzonych przez dwie pojedyncze nici DNA (zerwanie wiązań wodorowych w trakcie osiągnięcia wysokiej temperatury), a następnie swobodne związanie się do duplesu DNA (tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi w trakcie ochładzania). Stosując opisane powyżej podejście na widmie ^{19}F NMR oligonukleotydu FPPON14 można zaobserwować jeden sygnał o przesunięciu chemicznym równym $-73,38 \text{ ppm}$, będący dubletem o stałej sprzężenia 934 Hz . Po dodaniu 0,25 ekwiwalenta ON4, na widmie fluorowym pojawił się nowy sygnał o przesunięciu chemicznym wynoszącym $-73,40 \text{ ppm}$. Jest to przesunięcie o $0,02 \text{ ppm}$ w górę pola magnetycznego oznaczające zmianę lokalnego otoczenia atomu fluoru na skutek ekranowania go przez otaczające elektrony, z jednoczesnym zmniejszeniem częstości rezonansowej jądra fluoru.

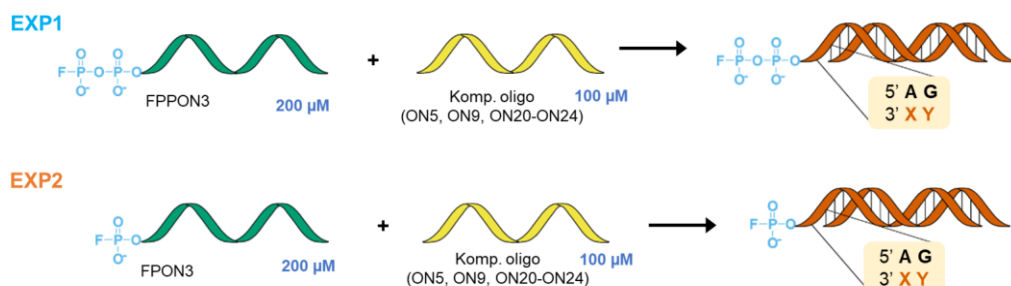
Dalsze miareczkowanie 10-nukleotydowej sekwencji prowadziło do zwiększenia intensywności nowego sygnału i zaniku rezonansu odpowiadającemu pojedynczej nici FPPON14 (Rys. 3-7A). W analogicznym eksperymencie, FPPON14 został zhybrydowany z oligonukleotydem ON25 (5' TGA CAT TGA $\underline{\text{T}}$ 3'). W utworzonym duplesie dziewięć zasad azotowych ze związku ON25 jest komplementarnych z sekwencją FPPON14, natomiast jedna zasada azotowa, tymina na końcu 3' ON25, jest niekomplementarna. Zarejestrowano widmo ^{19}F NMR pojedynczej nici DNA związku FPPON14, na którym zaobserwowano dublet o przesunięciu chemicznym równym -73,38 ppm oraz stałej sprzężenia wynoszącej 934 Hz. W wyniku dodania 0,3 ekwiwalenta ON25 (podgrzanie i ochłodzenie próbki jak opisano powyżej) zaobserwowano pojawienie się nowego sygnału o przesunięciu chemicznym równym -72,42 ppm ($^1J_{\text{P-F}} = 934 \text{ Hz}$), co jest zmianą przesunięcia sygnału o 0,04 ppm w górę pola (Rys. 3-7B). Ponadto, utworzenie duplesów DNA FPPON14:ON4 oraz FPPON14:ON25 zostało niezależnie potwierdzone za pomocą spektroskopii absorpcyjnej UV/VIS. W przeprowadzonych eksperymentach spektroskopowych ze zmianą temperatury zaobserwowano zmianę absorbancji przy 260 nm, a uzyskane dane przyjęły kształt krzywej sigmoidalnej, co jednoznacznie potwierdza rozwijanie się duplesów DNA w wyższych temperaturach. Z zebranych danych absorpcyjnych wyznaczono wartości temperatur mięknienia, które wynoszą 40,6°C dla pary komplementarnej oraz 33,9°C dla duplesu z jedną niekomplementarną parą zasad azotowych (Rys. 3-8).



Rys. 3-8. Profile temperaturowe UV/VIS eksperymentów z FPPON14 oraz ON4 i ON25. Pomiar absorbancji przy 260 nm.

W przeciwieństwie do duplesów utworzonych z dwóch 10-nukleotydowych nici oligonukleotydowych (Tabela 3.4), brak pełnej komplementarności w sekwencji duplesu DNA obniża wartość T_m o ponad 6°C, co jednak nadal pozwala na monitorowanie procesu tworzenia się duplesu DNA metodą ^{19}F NMR w 23°C. Eksperymenty, w których wykorzystano FPPON14

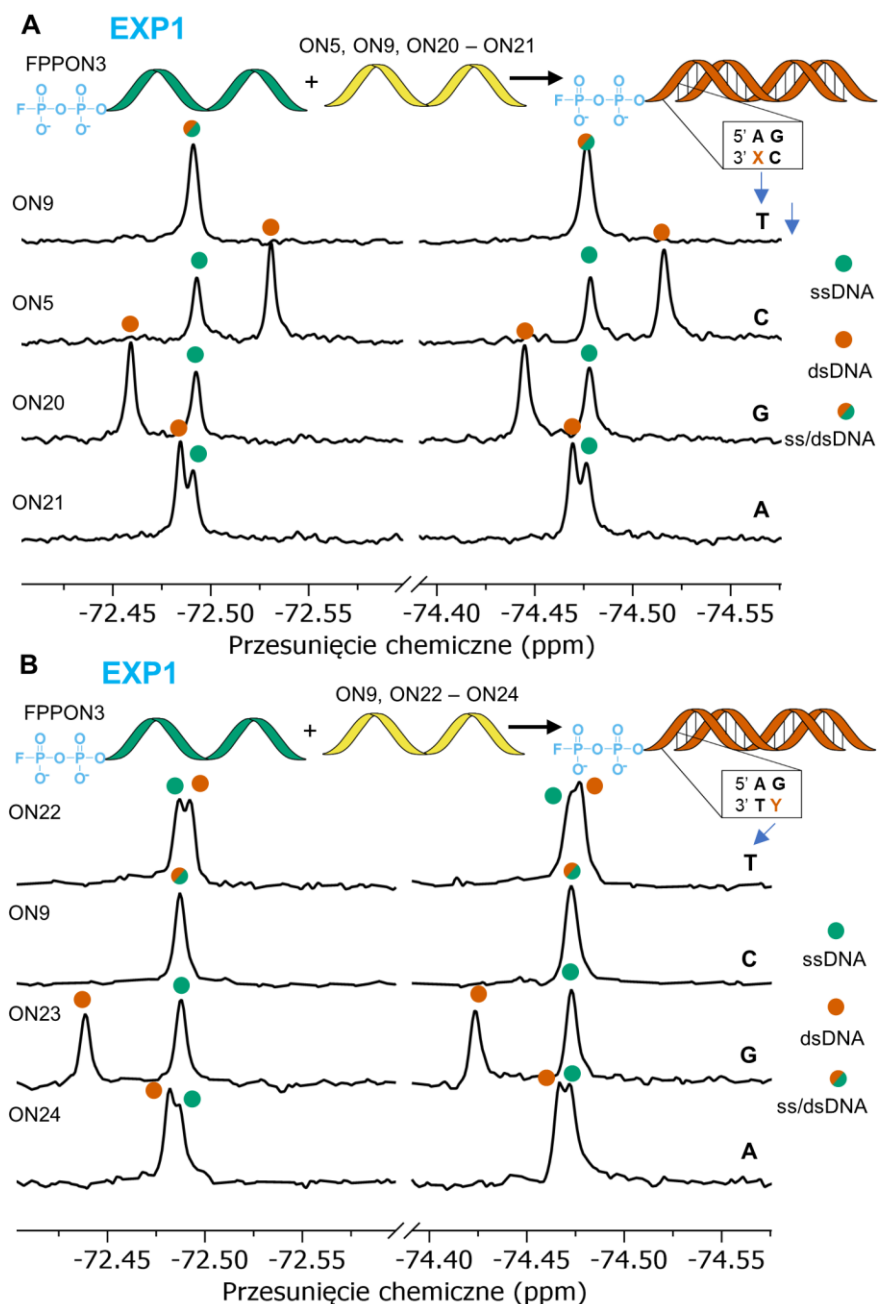
jako fluorową sondę molekularną, potwierdzają słuszność idei wprowadzonego fluorofosforanu oraz skuteczność metody ^{19}F NMR do monitorowania tworzenia się dupleksów DNA. Co więcej, porównanie zmian przesunięć chemicznych sygnałów ssDNA oraz dsDNA w obu wyżej przedstawionych eksperymentach (0,02 ppm dla eksp. z ON4 vs. 0,04 ppm dla eksp. z ON25) pozwala na odróżnienie eksperymentu z nicią komplementarną (ON4) i posiadającą jeden „mismatch” (ON25). Dlatego postanowiłem wykorzystać 10-nukleotydowe oligonukleotydy znakowane fluoro(mono)- oraz fluoro(di)fosforanem do identyfikacji pojedynczych niekomplementarności nukleotydowych za pomocą ^{19}F NMR.



Rys. 3-9. Schematycznie przedstawienie dwóch rodzajów przeprowadzanych eksperymentów z wykorzystaniem sondy fluoro(di)fosforanowej (EXP1) oraz fluoro(mono)fosforanowej (EXP2). Miejsca niekomplementarności zostały zaznaczone z prawej strony rysunku jako X oraz Y, gdzie X, Y – A, G lub T.

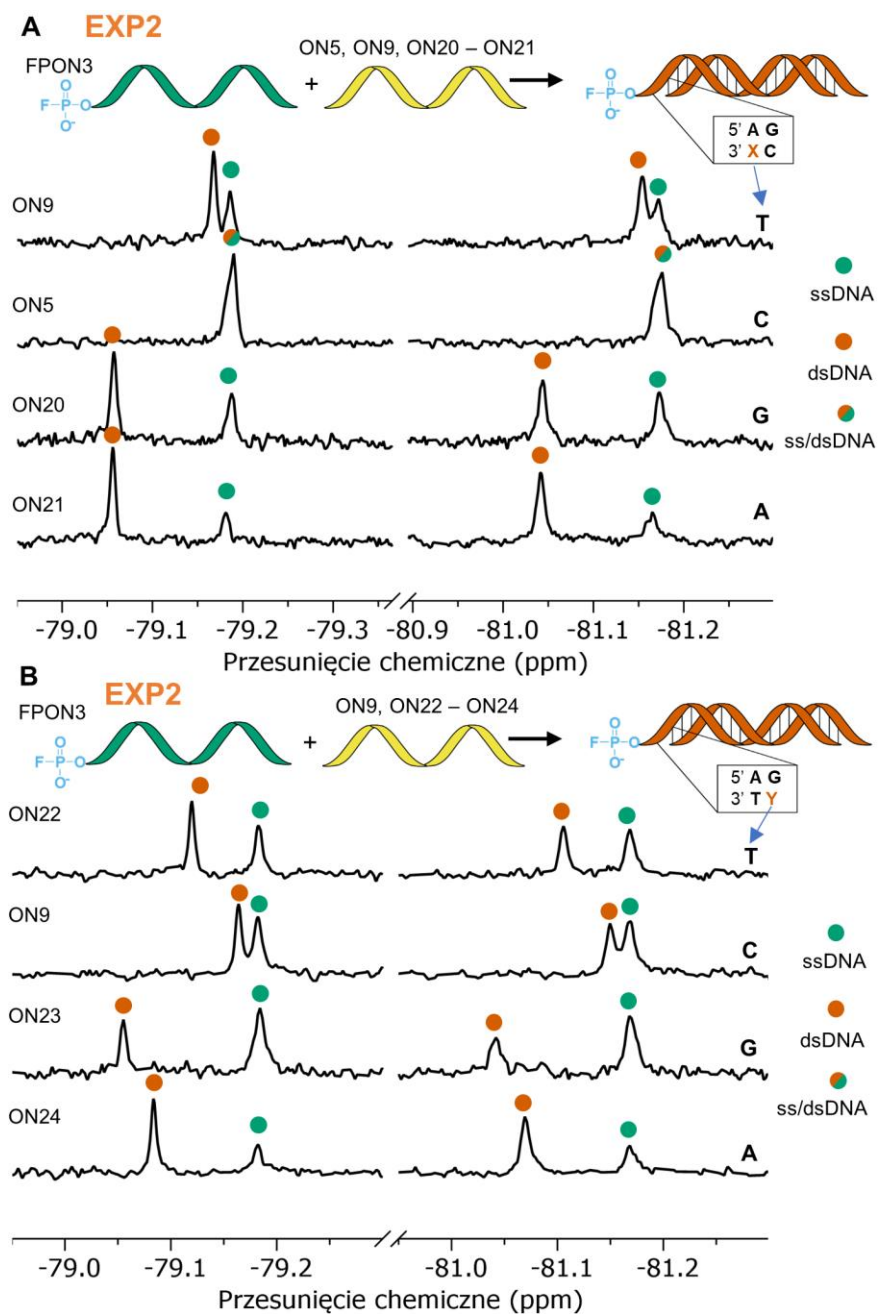
Stosując sekwencje FPON3 oraz FPPON3 (Tabela 3.6) monitorowałem tworzenie się dupleksów DNA z niemodyfikowanymi oligonukleotydami ON5, ON9, ON20 – ON24. Ze względu na zastosowanie dwóch rodzajów fluorowanych znaczników (ugrupowanie fluoromonofosforanowe lub fluoro(di)fosforanowe) badania dzielą się na dwa eksperymenty. W eksperymentach z grupy pierwszej (EXP1) wykorzystałem oligonukleotyd FPPON3, a w eksperymentach z grupy drugiej (EXP2) wykorzystałem oligonukleotyd FPON3 (Rys. 3-9). W obu eksperymentach monitorowałem tworzenie się dupleksów DNA metodą ^{19}F NMR, dodając do sekwencji fluorowanej oligonukleotydu komplementarnego w zakresie 0-200 μM (co 50 μM), dokładnie w ten sam sposób jak dla opisanych powyżej eksperymentów z sondą FPPON14. Aby zaprezentować wyniki w przejrzysty sposób, dla każdego eksperymentu przedstawiłem widmo ^{19}F NMR mieszaniny fluorowanego oligonukleotydu z oligonukleotydem komplementarnym w stosunku 2:1, tak aby na widmie NMR mieć możliwość zaobserwowania rezonansu od pojedynczej nici DNA oraz utworzonego dupleksu. Analiza zmiany przesunięć chemicznych sygnałów na widmie ^{19}F NMR pozwoliła na monitorowanie procesu tworzenia się dupleksów DNA oraz identyfikację niekomplementarności oligonukleotydowych.

Sekwencja FPPON3 (5' AGA CAT TGA C 3') została zhybrydyzowana z oligonukleotydem komplementarnym (ON9) oraz z oligonukleotydami ON5, ON20 – ON21 z niekomplementarną zasadą azotową na końcu 3', tak jak zostało to przedstawione na Rys. 3-10A (Y = C, X = T, C, G lub A). Dupleks FPPON3:ON9 nie spowodował zmian w przesunięciu chemicznym sygnału na widmie ^{19}F NMR (δ_{F} -73.48 ppm). Nowy sygnał przesunięty w górę pola o 0,038 ppm został zaobserwowany w eksperymencie z ON5, a nowe sygnały przesunięte w dół pola o 0,033 ppm i 0,007 ppm zostały zaobserwowane dla eksperymentów kolejno z ON20 oraz ON21 (Rys. 3-10A). Z przedstawionych czterech wyników wyraźne zmiany na widmach ^{19}F NMR zanotowałem dla dupleksów, w których adenina została przeciwstawiona cytozynie oraz guaninie. W kolejnych czterech hybrydyzacjach sprawdziłem, czy sonda fluoro(di)fosforanowa umożliwi rozróżnienie dupleksów, w których niekomplementarność jest na przedostatniej pozycji nici niefluorowanej (dupleksy z nićmi ON22 – ON24). Odpowiedni schemat został zaprezentowany na Rys. 3-10B (X = T, Y = T, C, G lub A). Powtórzony eksperyment pomiędzy FPPON3 a ON9 przyniósł identyczny rezultat, czyli brak zmian na widmie ^{19}F NMR. Nowy sygnał przesunięty w dół pola o 0,049 ppm zaobserwowano dla dupleksu z ON23, w którym występuje niezgodność pomiędzy dwiema guaninami. Natomiast bardzo niewielkie, lecz wciąż widoczne zmiany w przesunięciach chemicznych sygnałów, odnotowałem dla dupleksów z ON22 ($\Delta\delta_{\text{F}}$ = 0,0057 ppm) oraz ON24 ($\Delta\delta_{\text{F}}$ = 0,0052 ppm).



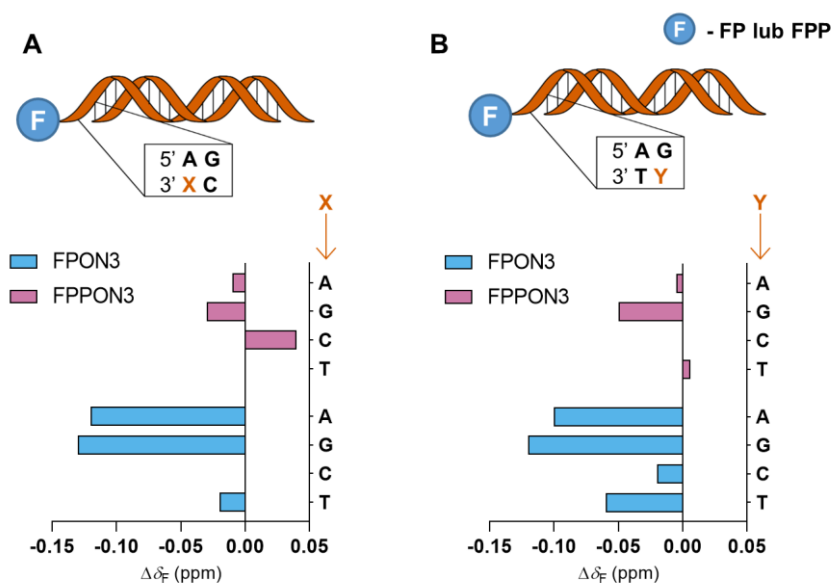
Rys. 3-10. Monitorowanie tworzenia się dupleksów DNA i identyfikacja niekomplementarności metodą ^{19}F NMR. Przedstawiono widma mieszanin FPPON3-oligonukleotyd komplementarny w stosunku molowym 2:1; A) Dupleksy FPPON3 z ON9 oraz oligonukleotydami ON20–ON21 posiadającymi niekomplementarność na końcu 3' nici (różne X); B) Dupleksy FPPON3 z ON9 oraz oligonukleotydami ON22–ON24 posiadającymi niekomplementarność na przedostatnim miejscu na końcu 3' nici (różne Y). Eksperymenty zostały wykonane w buforze fosforanowym o pH 7,0 w 23°C .

Analogiczne eksperymenty przeprowadziłem dla takiej samej sekwencji, ale znakowanej na końcu 5' fluoro(mono)fosforanem (FPON3). Grupa FP znajduje się bliżej cząsteczki oligonukleotydu niż grupa FPP, dlatego spodziewana jest większa czułość sondy molekularnej na zmiany w strukturze dupleksu DNA, a tym samym zmiany na widmach ^{19}F NMR powinny być inne. Sekwencja FPON3 (5' AGA CAT TGA C 3') została zhybrydyzowana z oligonukleotydem komplementarnym (ON9) oraz oligonukleotydami ON5, ON21 – ON22 z niekomplementarnym końcem 3', tak jak zostało to przedstawione na Rys. 3-11A (Y = C, X = T, C, G lub A). W wyniku utworzenia dupleksu z ON9 sygnał ^{19}F NMR oligonukleotydu FPON3 ($\delta_{\text{F}} = -79,19$ ppm) zmniejszył swoją intensywność i jednocześnie pojawił się nowy sygnał o δ_{F} mniejszym o 0,018 ppm. Bardzo duże zmiany w przesunięciach chemicznych sygnałów zanotowałem dla eksperymentów z oligonukleotydami ON20 ($\Delta\delta_{\text{F}} = 0,130$ ppm) oraz ON21 ($\Delta\delta_{\text{F}} = 0,125$ ppm), gdzie niekomplementarność dotyczyły zasad purynowych. Natomiast wyraźne poszerzenie sygnału uwidocznili dupleks z ON5. Sondę molekularną FPON3 wykorzystałem również do monitorowania tworzenia się dupleksów DNA z nici ON22 – ON24, które posiadają niekomplementarność na przedostatniej pozycji nici niefluorowanej, tak jak to zostało zaprezentowane na Rys. 3-11B (X = T, Y = T, C, G lub A). Dla każdego z czterech utworzonych dupleksów na widmach ^{19}F NMR zaobserwowałem wyraźne zmiany w postaci nowych sygnałów. Ponownie, największe zmiany w przesunięciach chemicznych zanotowałem dla hybrydyzacji z parami niekomplementarnych zasad purynowych i są to dupleksy z ON23 ($\Delta\delta_{\text{F}} = 0,129$ ppm) oraz ON24 ($\Delta\delta_{\text{F}} = 0,098$ ppm). Dupleks, w którym wystąpiła niekomplementarna para guanina:tymina (ON22) mógł zostać zidentyfikowany poprzez pojawienie się nowego sygnału o $\Delta\delta_{\text{F}} = 0,063$ ppm, a najmniejszą zmianę uwidocznili dupleks z komplementarną sekwencją ON9 ($\Delta\delta_{\text{F}} = 0,018$ ppm).



Rys. 3-11. Monitorowanie tworzenia się dupleksów DNA i identyfikacja niekomplementarności metodą ^{19}F NMR. Przedstawiono widma mieszanin FPON3-oligonukleotyd komplementarny w stosunku molowym 2:1; A) Dupleksy FPON3 z ON9 oraz oligonukleotydami ON20 – ON21 posiadającymi niekomplementarność na końcu 3' nici (różne X); B) Dupleksy FPON3 z ON9 oraz oligonukleotydami ON22 – ON24 posiadającymi niekomplementarność na przedostatnim miejscu na końcu 3' nici (różne Y). Eksperymenty zostały wykonane w buforze fosforanowym o pH 7,0 w 23°C .

Monitorowanie szesnastu hybrydyzacji DNA było możliwe poprzez obserwację zmian intensywności sygnałów na widmach ^{19}F NMR, a w szczególności poprzez zmianę przesunięcia chemicznego sygnału odpowiadającemu utworzonemu dwuniciowemu dupleksowi. Aby odpowiednio zobrazować otrzymane dane, wykonałem wykresy przedstawiające różnice pomiędzy przesunięciem chemicznym pojedynczej nici i nici podwójnej ($\Delta\delta_{\text{F}} = \delta_{\text{F ssDNA}} - \delta_{\text{F dsDNA}}$). Najmniejsze zmiany w δ_{F} zaobserwowałem dla oligonukleotydu z modyfikacją 5'-fluoro(di)fosforanową (Rys. 3-12).

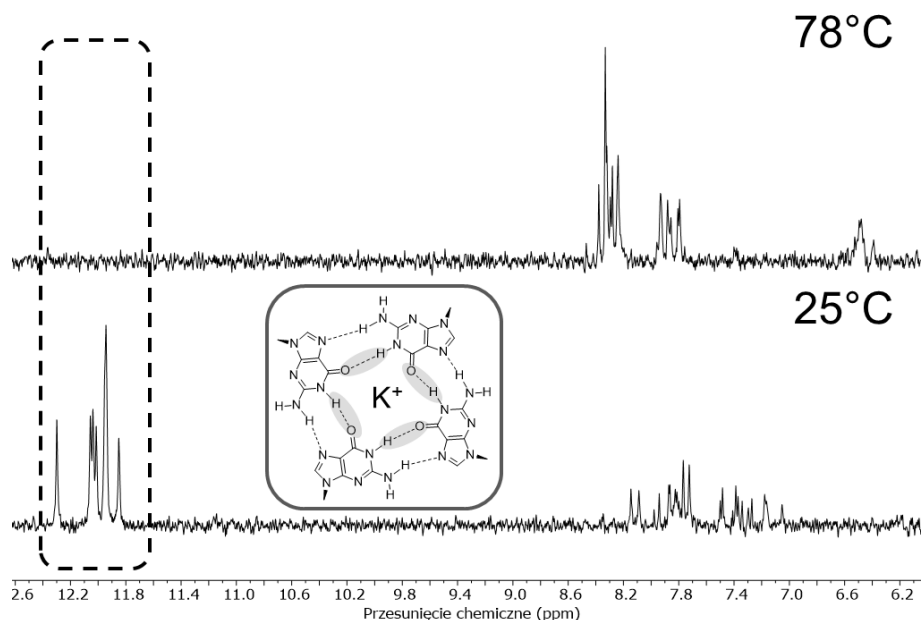


Rys. 3-12. Zmiany przesunięć chemicznych pomiędzy sygnałami pojedynczych nici DNA oraz dupleksami DNA ($\Delta\delta_{\text{F}} = \delta_{\text{F ssDNA}} - \delta_{\text{F dsDNA}}$). A) Wyniki eksperymentów, w których identyfikowano niekomplementarność na ostatniej pozycji 5'/3'. B) Wyniki eksperymentów, w których identyfikowano niekomplementarność na przedostatniej pozycji 5'/3'.

3.2.5.2 G-kwadrupleks i oddziaływanie z trombiną

Sekwencje oligonukleotydowe bogate w powtórzenia guaninowe są zdolne do tworzenia niekanonicznych struktur zwanych G-kwadrupleksami (211). W stabilizację tych drugorzędowych struktur DNA zaangażowane są wiązania wodorowe typu Hoogsteena, tworzące się pomiędzy czterema guaninami oraz centralnie ułożonym jednowartościowym kationem, którym najczęściej jest jon potasu (K^+). G-kwadrupleksy zostały scharakteryzowane jako istotne elementy biorące udział w regulacji ekspresji genów oraz stabilizacji genomu (212-214). Małe cząsteczki selektywnie oddziałujące z G-kwadrupleksami zostały zidentyfikowane jako modulatory ekspresji genu oraz jako leki wykorzystywane w terapiach przeciwnowotworowych (215). Dlatego opracowywanie metod badania tych struktur DNA znajduje się w centrum zainteresowań wielu grup badawczych.

Użyteczność metody ^{19}F NMR w badaniu G-kwadrupleksów została zaprezentowana poprzez wprowadzenie fluoro(di)fosforanu na koniec 5' nici aptameru DNA wiążącego trombinę (ang. *thrombin binding aptamer*, TBA). TBA jest to 15-sto nukleotydowa (GGT TGG TGT GGT TGG) sekwencja DNA stabilizowana przez jony potasu i tworząca G-kwadrupleks zbudowany z dwóch tetrad guaninowych oraz pętli TGT (216). W 1992 roku metodą SELEX, TBA zidentyfikowano jako aptamer silnie wiążący się z trombiną (nanomolarna stała wiązania), czego wynikiem jest inhibicja tworzenia się skrzepów fibrynowych (217,218). Cechą charakterystyczną stabilnej struktury G-kwadrupleksu jest utworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy grupami iminowymi/aminowymi, będącymi donorami wiązania wodorowego a atomami tlenu lub azotu, będącymi akceptorami wiązania wodorowego (Rys. 3-13, wstawka). Doskonałą metodą badawczą, która umożliwia jednoznaczne potwierdzenie utworzenia iminowych wiązań wodorowych w strukturze G-kwadrupleksu jest spektroskopia ^1H NMR, gdzie na widmach obserwuje się wyraźne sygnały rezonansowe występujące w zakresie mocno przesuniętym w stronę wyższych częstotliwości, tj. 11,5-13 ppm. Dlatego dla otrzymanej sekwencji FPPON11 zarejestrowałem dwa widma ^1H NMR, w temperaturze pokojowej (25°C) oraz w temperaturze wysokiej (78°C), w której dochodzi do rozerwania wiązań wodorowych, a w konsekwencji do całkowitego rozwinięcia G-kwadrupleksu do pojedynczej nici. Zgodnie z wcześniejszym założeniem charakterystyczne sygnały iminowe na widmie ^1H NMR zaobserwowałem w 25°C natomiast nie były one widoczne w 78°C (Rys. 3-13), co jednoznacznie potwierdza utworzenie się G-kwadrupleksu w niższej temperaturze (219).



Rys. 3-13. Widma ^1H NMR oligonukleotydu FPPON11 w niskiej oraz wysokiej temperaturze. Zakres absorpcji protonów iminowych został zaznaczony prostokątną obwódką. Wstawka: Kwartet guaninowy tworzący strukturę G-kwadrupleksu, stabilizowany przez centralnie ułożony jon potasu. Na szaro zostały zaznaczone wiązania wodorowe protonów iminowych.

W kolejnym kroku zbadałem wpływ podstawnika znajdującego się na końcu 5' nici oligonukleotydowej o sekwencji TBA na stabilność tworzenia się G-kwadrupleksu w roztworze. Do tego celu wybrałem trzy oligonukleotydy. Pierwszy z nich zakończony jest grupą 5'-hydroksylową (ON11), kolejny grupą 5'-fosforanową (PON11) i ostatni badany związek, posiadający grupę 5'-fluoro(di)fosforanową (FPPON11). Tak jak w przypadku omawianych wyżej dupleksów DNA, to jak trwała jest struktura G-kwadrupleksu odzwierciedla temperatura mięknięcia pomiędzy strukturą drugorzędową oligonukleotydu a pojedynczą, rozwiniętą nicią. Wartości T_m dla każdego oligonukleotydu zostały wyznaczone metodą spektroskopii absorpcyjnej przy 295 nm, co zostało dokładnie opisane w podrozdziale 3.2.4 (Rys. 3-6A). Ponadto, dla oligonukleotydu FPPON11 niezależnie wyznaczyłem temperaturę mięknięcia metodą ^{19}F NMR. Było to możliwe, gdyż sygnał ^{19}F NMR ($\delta_F = -72,43$ ppm) widoczny w niskich temperaturach (25°C – 45°C) zanikał w temperaturze wysokiej, a jednocześnie pojawiał się nowy sygnał o innym przesunięciu chemicznym ($\delta_F = -72,51$ ppm) odpowiadający rozwiniętej nici FPPON11 (Rys. 3-14A). Wynik uzyskany metodą ^{19}F NMR zanalizowałem poprzez integrację sygnałów oraz ich normalizację, a dane wykreśliłem w funkcji temperatury. Dopasowane równanie pozwoliło mi na wyznaczenie wartości T_m (Rys. 3-14B). Tabela 3.7 zestawia

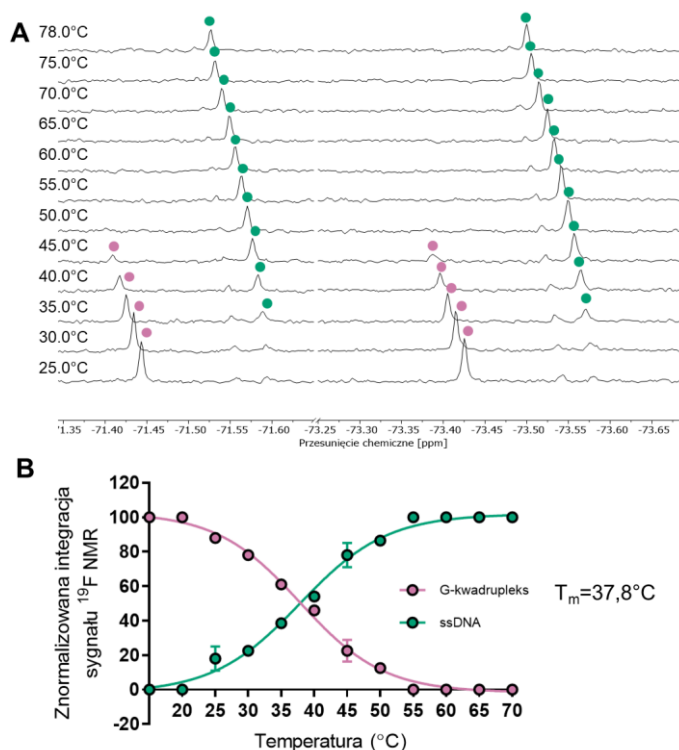
temperatury mięknienia uzyskane obydwoma metodami. Jak można zauważyć, zamiana grupy hydroksylowej na fosforanową obniża T_m o około 7°C (ON11 vs. PON11), natomiast obecność fluoro(di)fosforanu destabilizuje strukturę G-kwadrupleksu o kolejne 3°C (PON11 vs. FPPON11). Co więcej, wartości T_m uzyskane metodą ^{19}F NMR dla FPPON11 są zgodne z wartościami otrzymanymi metodą spektroskopii absorpcyjnej (odpowiednio $37,8^\circ\text{C}$ dla ^{19}F NMR oraz $38,4^\circ\text{C}$ dla UV/VIS), co po raz kolejny potwierdza użyteczność zastosowanego znacznika fluoro(di)fosforanowego w badaniach zmian struktur drugorzędowych oligonukleotydów metodą ^{19}F NMR. Analizując wartości T_m otrzymane metodą ^{19}F NMR można także zauważyć, że zarówno analiza sygnału odpowiadającemu strukturze G-kwadrupleksu, jak i sygnału odpowiadającemu strukturze rozwiniętej nici DNA pozwala na wyznaczenie temperatury mięknienia, a uzyskane wartości są bardzo zbliżone do siebie (Tabela 3.7).

Tabela 3.7. Porównanie wyznaczonych temperatur mięknienia sekwencji tworzących G-kwadrupleks.

5' GGT TGG TGT GGT TGG 3'			
Oligo.	Grupa na końcu 5' nici	T_m [$^\circ\text{C}$]	Metoda
ON11	OH	$48,2 \pm 0,1$	UV/VIS
PON11	P	$41,1 \pm 0,2$	UV/VIS
FPPON11	FPP	$38,4 \pm 0,1$	UV/VIS
		$37,8 \pm 0,5$ ^[a]	^{19}F NMR
		$37,8 \pm 0,7$ ^[b]	^{19}F NMR

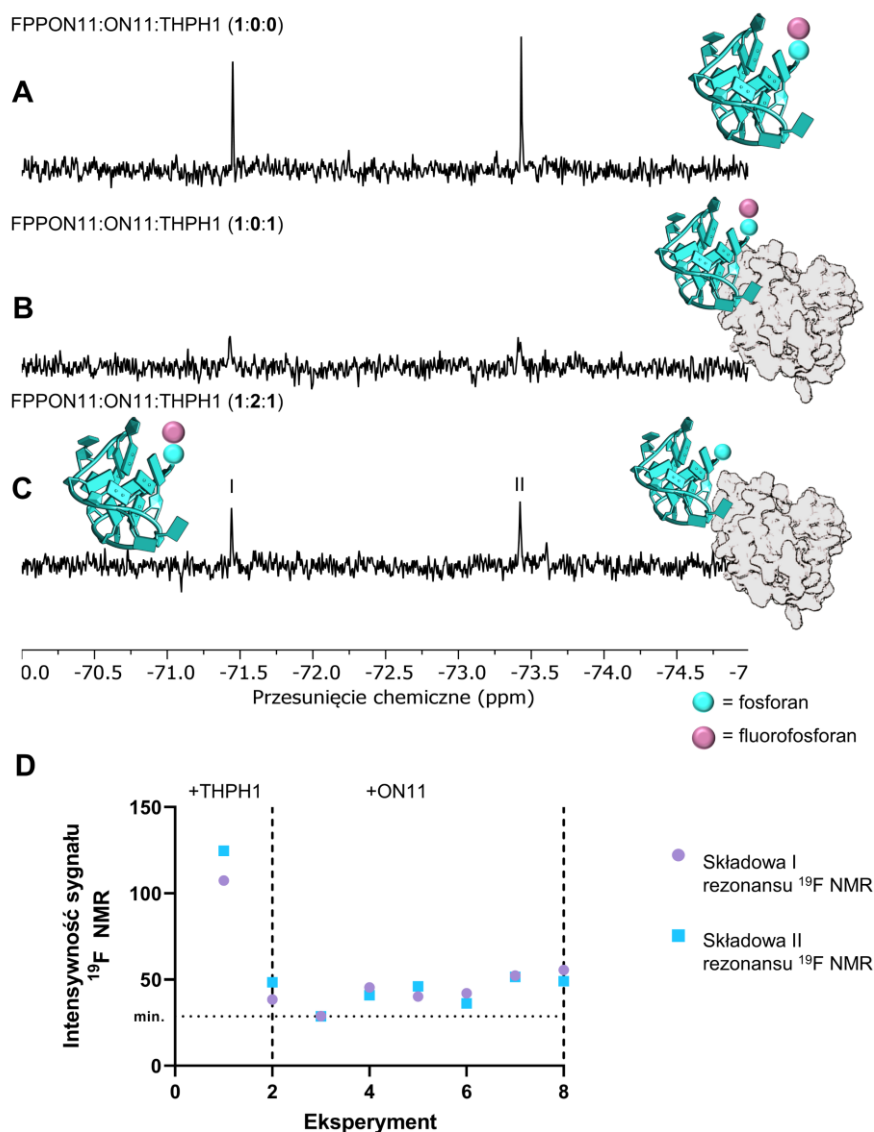
[a] wyznaczone na podstawie sygnału ^{19}F NMR odpowiadającemu G-kwadrupleksowi,

[b] wyznaczone na podstawie sygnału ^{19}F NMR odpowiadającemu rozwiniętej nici FPPON11.



Rys. 3-14. Wyznaczenie temperatury mięknienia metodą ^{19}F NMR oligonukleotydu FPPON11. A) Widma ^{19}F NMR w różnych temperaturach. Na różowo zaznaczono sygnał odpowiadający strukturze G-kwadrupleksu, na zielono zaznaczono sygnał odpowiadający strukturze rozwiniętej nici FPPON11. B) Analiza sygnałów ^{19}F NMR oraz wyznaczenie T_m .

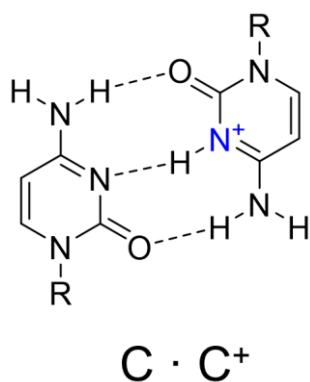
Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają możliwość monitorowania tworzenia się G-kwadrupleksu metodą ^{19}F NMR, dlatego w kolejnym kroku wykorzystałem oligonukleotyd FPPON11 jako sondę molekularną do monitorowania procesu oddziaływania pomiędzy białkiem a kwasem nukleinowym. Do tego celu wybrałem białko trombinę (THPH1), którą dodawałem porcjami do roztworu FPPON11, rejestrując po każdym dodaniu białka widmo ^{19}F NMR. Dodanie białka do roztworu oligonukleotydu w stosunku 1:1 spowodowało znaczne poszerzenie się sygnału na widmie, co wynika ze związania się stosunkowo niewielkiej cząsteczki jaką jest oligonukleotyd z większą molekułą białka (Rys. 3-15 A-C). Poszerzenie linii rezonansowych wynika ze skrócenia się wartości czasu T_2 , co z kolei wynika ze spadku ruchliwości niewielkiej molekuly jaką jest oligonukleotyd po związaniu się z dużym białkiem (220). Następnie, użyłem nieznakowanego fluorem oligonukleotydu ON11 (100 μM) jako cząsteczki wypierającej, która w sposób kompetycyjny wyparła fluorowany ligand, czego efektem było przywrócenie intensywności sygnału na widmie ^{19}F NMR (Rys. 3-15D).



Rys. 3-15. Monitorowanie oddziaływania białko-kwas nukleinowy metodą ^{19}F NMR. A-C) Widma ^{19}F NMR kolejno FPPON11 (50 μM) rozpuszczonego w buforze (10 mM KH_2PO_4 , 70 mM KCl, 0,2 mM EDTA, pH 7,0, 10% D_2O), następnie widmo zarejestrowane po dodaniu równomolowej ilości trombiny (THPH1) oraz widmo ^{19}F NMR po dodaniu ON11. D) Analiza intensywności sygnałów ^{19}F NMR w trakcie trwania doświadczenia. W eksperymencie 1 i 2 obserwowano zmniejszenie intensywności sygnału na skutek utworzenia kompleksu FPPON11:THPH1. W kolejnych eksperymentach do próbki dodawano ON11.

3.2.5.3 Struktury *i*-motywu oraz oddziaływanie z ligandami

Czteroniciowe struktury DNA składające się z dwóch równolegle do siebie ułożonych dupleksów, stabilizowane przez oddziałujące pomiędzy sobą cytozyny, gdzie jedna z nich jest protonowana (oznaczenie $\text{C}\cdot\text{C}^+$) (Rys. 3-16) nazywa się strukturami *i*-motyw (ang. *i*-motif). Struktury te tworzą się i są stabilne w pH w zakresie 4,5-5,5, dlatego ich rola jako cząsteczek o zdefiniowanej funkcji biologicznej w warunkach fizjologicznych pozostaje wciąż niepewna. W ostatniej dekadzie badania skupione wokół struktur *i*-motywów wykazały, iż tworzą się one nawet w neutralnym pH (221,222), a ponadto stabilizowane są w warunkach zatłoczenia molekularnego (ang. *molecular crowding*) (223). W literaturze odnajduje się przykłady, w których *i*-motywy zidentyfikowano w komórkach, co sugeruje, że struktury te mogą brać udział w regulacji i ekspresji genów (91), tym samym stając się celami terapeutycznymi. Oddziaływania pomiędzy różnymi ligandami a strukturami *i*-motywów zostały przebadane w celu wyselekcjonowania cząsteczek stabilizujących te drugorzędowe struktury DNA (224-226).

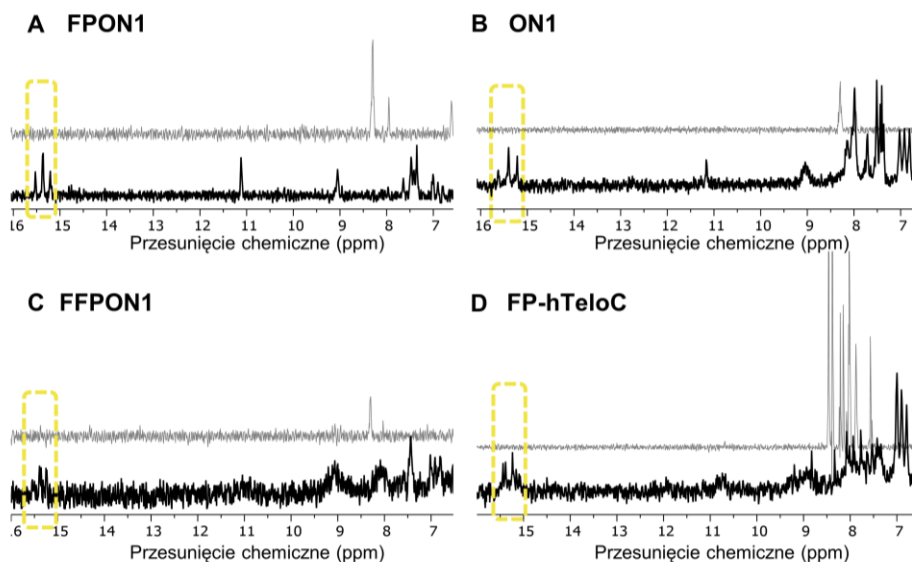


Rys. 3-16. Para cytozyn stabilizująca strukturę *i*-motywu. Na niebiesko zaznaczono protonowany atom azotu.

Jedną z pierwszych zbadanych sekwencji przyjmujących strukturę *i*-motywu była odkryta w 1993 roku sekwencja DNA heksamery zbudowana z tyminy oraz pięciu cytozyn TCCCCC (90), a sama struktura drugorzędowa składa się z czterech pojedynczych cząsteczek DNA. Obecnie polimer ten jest wykorzystywany jako model do badania stabilności struktur *i*-motywów oraz wpływu wprowadzonych modyfikacji chemicznych w obrębie struktury pojedynczego nukleotydu na trwałość tego kompleksu. Zastosowanie modyfikacji fluorofosforanowej do badania struktur *i*-motywów w różnym pH oraz w różnej temperaturze metodą ^{19}F NMR

zaprezentowałem na przykładzie krótkiej sekwencji TCCCCC (ON1), którą wyznakowałem fluoro(mono)- (FPON1) oraz fluoro(di)fosforanem (FPPON1). Podobnie jak w przypadku omawianych wcześniej eksperymentów ze strukturą G-kwadrupleksu, tak i w tym przypadku, do wstępnej weryfikacji tworzenia się *i*-motywu w roztworze wykorzystałem spektroskopię ^1H NMR, za pomocą której obserwowałem sygnały rezonansowe protonów iminowych stabilizujących drugorzędową strukturę DNA w pH 4,2 (227). Wykonane widma ^1H NMR oligonukleotydów ON1, FPON1 oraz FPPON1 w temperaturach 10°C oraz 70°C wykazały

obecność w niskiej temperaturze sygnałów o charakterystycznym przesunięciu chemicznym wynoszącym $\delta_{\text{H}} = 15\text{--}16$ ppm, które zanikały w warunkach denaturujących (70°C), co potwierdza obecność struktury *i*-motywu (Rys. 3-17 A-C).



Rys. 3-17. Widma ^1H NMR badanych sekwencji przyjmujących strukturę *i*-motywu. Szarą linią zaprezentowano widmo zarejestrowane w 70°C , natomiast linią czarną widmo zarejestrowane w 10°C w 50 mM buforze cytrynianowym o pH 4,2 z dodatkiem 10% D_2O ; A) 0,5 mM FPON1; B) 0,5 mM ON1; C) 0,1 mM FPPON1; D) 0,25 mM FP-hTeloC.

Widma ^{19}F NMR zarejestrowane w warunkach faworyzujących występowanie stabilnej struktury *i*-motyw oligonukleotydów FPON1 oraz FPPON1 (pH 4,2, 25°C) charakteryzują się pojedynczymi sygnałami, gdzie dla każdego z oligonukleotydów obserwuje się dublet o przesunięciu chemicznym $\delta_{\text{F}} = -79,86$ ppm oraz $\delta_{\text{F}} = -73,06$ ppm i stałych sprzężenia równych $J_{\text{P-F}} = 937$ Hz oraz $J_{\text{P-F}} = 935$ Hz, odpowiednio dla FPON1 oraz FPPON1. Po scharakteryzowaniu oligonukleotydów za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, związki FPON1 oraz FPPON1 wykorzystałem jako sondy molekularne w eksperymentach ^{19}F NMR ze zmianami temperatury lub pH (Rys. 3-18A). Eksperymenty temperaturowe przeprowadziłem w zakresie od 25°C do 70°C , z krokiem co 5°C w pH 4,20, rejestrując za każdym razem widmo ^{19}F NMR. W 25°C na widmie związku FPPON1 zarejestrowałem dublet ($\delta_{\text{F}} = -73,06$, $J_{\text{P-F}} = 935$ Hz), który wraz ze wzrostem temperatury zanikał, a w tym samym czasie pojawiał się nowy sygnał o innym przesunięciu chemicznym ($\delta_{\text{F}} = -72,24$, $J_{\text{P-F}} = 930$ Hz w 70°C) (Rys. 3-18B). Bardzo podobny wynik uzyskałem dla sondy wyznakowanej fluoro(mono)fosforanem, FPON1.

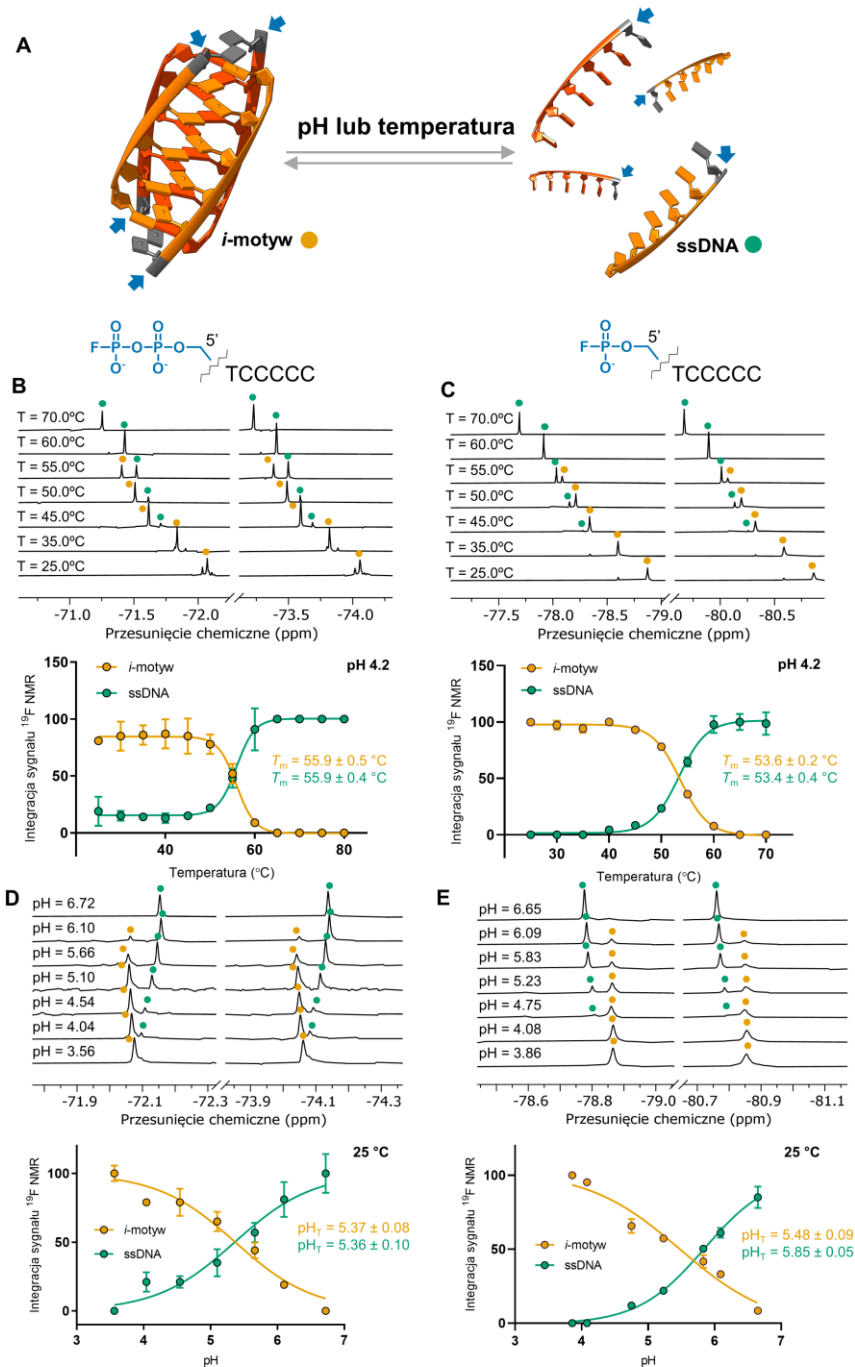
Ponownie, sygnał widoczny w 25°C ($\delta_{\text{F}} = -79,86$, $J_{\text{P-F}} = 936$ Hz) zanikał wraz ze wzrostem temperatury, a pojawiał się nowy dublet ($\delta_{\text{F}} = -78,68$, $J_{\text{P-F}} = 930$ Hz) (Rys. 3-18C). Dla każdej z sond oba sygnały obserwowałem w zakresie temperatur $40^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$, jednakże porównując widma zarejestrowane w 50°C można zauważyć, że w przypadku sondy FPPON1 nowy dublet pojawia się w zakresie wyższych częstotliwości rezonansowych, natomiast dla sondy FPON1 nowy sygnał przesunięty jest w stronę niższych częstości rezonansowych. Bardzo podobne obserwacje zanotowałem w eksperymentach w stałej temperaturze 25°C , ale ze zmianą pH w zakresie wartości od 3,5 do 7,0. Badania te przeprowadziłem, rozpoczynając od niskiej wartości pH równej około 3,5, którą stopniowo zwiększałem za pomocą bardzo małych porcji 0,1 M NaOH. Pomiar pH wykonywałem przy użyciu cienkiej szklanej elektrody chlorosrebrowej zanurzonej w badanym roztworze znajdującym się w probówce Eppendorfa, a objętość próbki nie przekraczała 600 μl . Po każdym ustaleniu pH probówkę NMR wypełnioną badanym roztworem inkubowałem w magnesie NMR przez 20 minut, a następnie wykonywałem pomiar widma ^{19}F NMR. Widmo sondy FPPON1 w pH 3,56 charakteryzuje się wyraźnie widocznym dubletem o $\delta_{\text{F}} = -73,07$, ($J_{\text{P-F}} = 935$ Hz), który zanika w pH wyższych, a w tym samym czasie pojawia się nowy dublet o $\delta_{\text{F}} = -73,15$ ($J_{\text{P-F}} = 934$ Hz, pH 6,72) (Rys. 3-18D). Bardzo podobny wynik uzyskałem dla sondy FPON1. Dublet widoczny w pH 3,86 ($\delta_{\text{F}} = -79,86$, $J_{\text{P-F}} = 936$ Hz) zanikał w pH bliskim obojętnemu (pH 6,65), a pojawił się nowy sygnał ($\delta_{\text{F}} = -79,77$, $J_{\text{P-F}} = 934$ Hz) (Rys. 3-18E). Tak jak w przypadku badań ze zmianami temperatury, zmiana pH spowodowała zanik jednego sygnału i powstanie nowego. Pozycja nowych sygnałów na widmach ^{19}F jasno ukazuje, że dla FPPON1 nastąpiło ekranowanie jądra fluoru, a dla sondy FPON1 odekranowanie jądra fluoru. W przypadku obydwu omawianych powyżej eksperymentów zmiany na widmach ^{19}F NMR można jednoznacznie przypisać zmianom strukturalnym badanego motywu DNA. Zarówno w niskim pH, jak i niskiej temperaturze struktura *i*-motywu jest stabilna, natomiast gdy te warunki zostaną zaburzone i przekroczą pewną graniczną wartość określaną temperaturą przejścia (T_m) oraz wartością pH przejścia (pH_T) *i*-motyw „rozwija się” do pojedynczych nici DNA. Obie te wartości są silnie zależne od budowy chemicznej nici DNA, długości łańcucha oligonukleotydowego, obecności lub braku dodatkowych modyfikacji, siły jonowej buforu czy warunków kwasowo-zasadowych. Pojawienie się nowego sygnału w wyższej temperaturze i w wyższym pH można przypisać pojedynczym, nieustrukturyzowanym niciom DNA (ssDNA). Analiza widm NMR poprzez normalizację intensywności sygnałów, ich odłożenie w funkcji temperatury lub pH oraz dopasowanie

odpowiedniego równania, pozwoliła na wyznaczenie charakterystycznych wartości T_m oraz pH_T badanych sekwencji *i*-motywów (Rys. 3-18). Temperatury mięknienia zostały także dodatkowo wyznaczone metodą UV/VIS (Rys. 3-6B), co po pierwsze, niezależnie potwierdziło rozwinięcie struktury drugorzędowej DNA do pojedynczych nici, a po drugie, umożliwiło porównanie otrzymanych dwiema niezależnymi metodami badawczymi wartości T_m , które są do siebie zbliżone (Tabela 3.8). Aby być całkowicie pewnym w założeniu, że badana sekwencja (TC_5) tworzy strukturę *i*-motywu, porównałem literaturowe wartości T_m oraz pH_T , z których wynika, iż pH przejścia mieści się w zakresie od 5,8 (228) do 6,1 (229), natomiast temperatura mięknienia, w zależności od pH zastosowanego buforu, przyjmuje wartości od 44,8°C do 51,5°C (227-229). Porównując dane literaturowe z danymi z Tabela 3.8 wnioskuje się, że wartości T_m oraz pH_T są zbieżne z wynikami otrzymanymi metodą ^{19}F NMR, dzięki czemu sygnał na widmach ^{19}F NMR można jednoznacznie przypisać strukturze *i*-motywu.

Tabela 3.8. Wyznaczone wartości pH przejścia (pH_T) oraz temperatury przejścia (T_m) metodami ^{19}F NMR oraz UV-VIS.

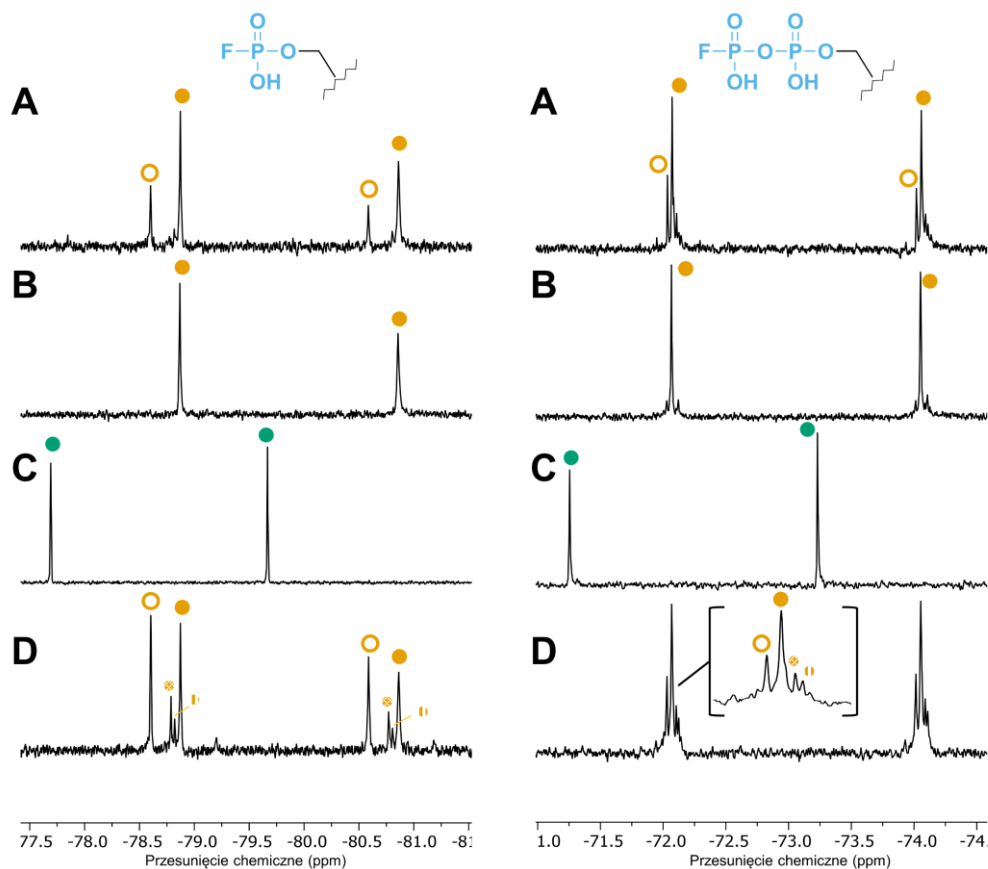
Sekwencja (5' → 3')	Oligo.	25°C	pH 4,2		pH 5,5	
		pH_T	T_m		T_m	
		^{19}F NMR [a]	^{19}F NMR [a]	$A_{260\text{nm}}$	^{19}F NMR [a]	$A_{295\text{nm}}$
TCCCCC	FPON1	$5,48 \pm 0,09$	$53,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$	$57,7 \pm 0,3^\circ\text{C}$	b.d.	b.d.
TCCCCC	FPPON1	$5,37 \pm 0,08$	$55,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$	$60,7 \pm 0,7^\circ\text{C}$	b.d.	b.d.
(TAACCC) ₄	Fp-hTeloC	$6,47 \pm 0,07$	$64,6 \pm 1,1^\circ\text{C}$	$54,7 \pm 2,4^\circ\text{C}$	$40,9 \pm 0,3^\circ\text{C}$	$42,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Warunki: 50 mM cytrynian sodu, 10% D_2O ; [a] zanalizowano sygnał ^{19}F NMR odpowiadający *i*-motywowi;



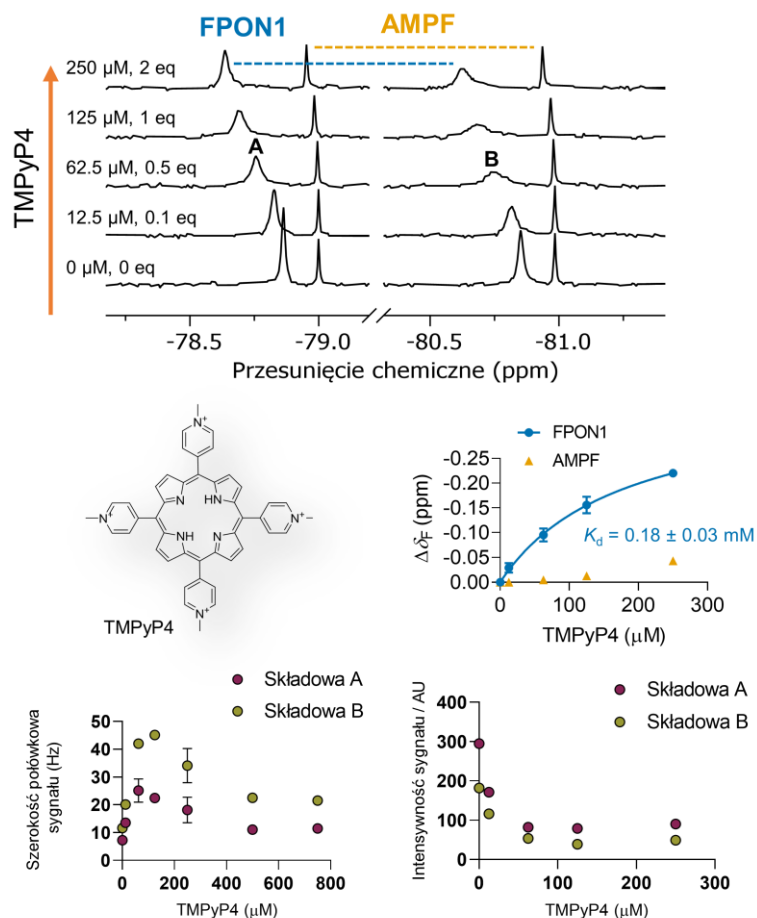
Rys. 3-18. Monitorowanie rozpadu struktur *i*-motywów oligonukleotydów FPPON1 oraz FPPON1 metodą ^{19}F NMR. A) Schematyczne przedstawienie struktury przestrzennej *i*-motywu oraz jej pojedynczych części DNA. Niebieską strzałką oznaczono pozycję grup fluorofosforanowych; B) i D) Sonda FPPON1 w badaniach ze zmianą pH oraz temperatury; C) i E) Sonda FPPON1 w badaniach ze zmianą pH oraz temperatury.

Ogromną zaletą metody magnetycznego rezonansu jądrowego jest możliwość zaobserwowania nawet niewielkich zmian strukturalnych w cząsteczce. Wykorzystanie do obserwacji jąder fluoru-19 jest tu szczególnie korzystne ze względu na bardzo dużą dyspersję przesunięć chemicznych, dzięki czemu nawet niewielka zmiana w otoczeniu elektronowym jądra fluoru skutkująca bardzo niewielką zmianą energii rezonansowej jest wyraźnie widoczna na widmie. Dlatego przewagą metody magnetycznego rezonansu jądrowego nad innymi metodami spektroskopowymi jest możliwość zaobserwowania zmian dotyczących poszczególnych indywiduów (atomów) chemicznych, co jest niemożliwe do uzyskania na przykład za pomocą spektroskopii absorpcyjnej w zakresie UV/VIS czy metod fluorescencyjnych, które dostarczają „ogólnych” danych na temat zmian w badanym układzie. Właśnie dzięki technice ^{19}F NMR możliwe było zaobserwowanie kilku różnych topologii struktury *i*-motywu zbudowanej z oligonukleotydów FPON1 czy FPPON1. Widma ^{19}F NMR świeżo przygotowanych roztworów FPON1 oraz FPPON1 w buforze o pH 4,2 (warunki faworyzujące powstanie *i*-motywów) zwykle charakteryzowały się obecnością więcej niż jednego sygnału (Rys. 3-19A). Co najmniej 48-godzinna inkubacja w temperaturze pokojowej pozwoliła na zaobserwowanie pojedynczego dubletu (Rys. 3-19B). Pojedynczy sygnał na widmie ^{19}F NMR zaobserwowano również w pomiarze kontrolnym, w którym próbkę podgrzano do 70°C, potwierdzając tym samym obecność jednej, takiej samej fluorowanej cząsteczki w roztworze (Rys. 3-19C). Widmo wykonane natychmiast po ochłodzeniu próbki do 25°C charakteryzuje się co najmniej czterema dobrze od siebie rozdzielonymi (różne przesunięcia chemiczne) sygnałami, każdy o innej intensywności. Ponadto różnice w położeniu sygnałów na widmie są większe dla sondy fluoro(mono)fosforanowej (FPON1) niż fluoro(di)fosforanowej (FPPON1) (Rys. 3-19D). Ten dość zaskakujący wynik można zinterpretować jako utworzenie się struktur *i*-motywów o niejednorodnej topologii wynikającej z różnego ułożenia się względem siebie (równoległe bądź antyrównoległe) pojedynczych nici DNA. Wtedy takie struktury nie są magnetycznie ekwiwalentne i charakteryzują się sygnałami o różnych przesunięciach chemicznych na widmie ^{19}F NMR. Podobną obserwację uzyskałem w badaniach ^1H NMR sekwencji TC₄, w których w miarę upływu czasu obserwowałem zmianę zestawu sygnałów protonowych, a wyniki zinterpretowałem jako występowanie równowagi pomiędzy formami R oraz S struktury *i*-motyw (230). Innym przykładem są badania 21-nukleotydowej sekwencji bogatej w cytozyny, która w zależności od pH (od 6 do 9), związała się do dwóch form: głównej (5'E) występującej w przewodzie oraz drugorzędnej (3'E) (231).



Rys. 3-19. Widma ^{19}F NMR sond FPON1 oraz FPPON1 zarejestrowane po różnym czasie od rozpuszczenia w buforze cytrynianowym o pH 4,2. A) Widma zarejestrowane po godzinie od przygotowania; B) Widmo tej samej próbki co w A ale po 48h (inkubacja w temperaturze pokojowej, w probówce NMR); C) Widmo ^{19}F NMR zarejestrowane w 70°C ; D) Widma zarejestrowane natychmiast po ochłodzeniu z 70°C do 25°C . Żółte kropki oznaczają różne topologie struktury *i*-motywu, zielone kropki oznaczają ssDNA. Bufor: 50 mM bufor cytrynianowy pH 4,2, 10% D_2O .

W kolejnej części badań wykorzystałem oligonukleotyd FPON1 jako sondę molekularną do monitorowania oddziaływania pomiędzy drugorzędową strukturą kwasu nukleinowego a małą cząsteczkowym ligandem, TMPyP4. TMPyP4 jest dodatnio naładowaną porfiryną (kation), która została zidentyfikowana jako związek interkalujący strukturę G-kwadrupleksów (232), inhibując tym samym aktywność telomeraz czy blokując wzrost klonogeny oraz rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych w organizmie (233-235). Ponadto wykazano,



Rys. 3-20. Monitorowanie oddziaływania pomiędzy sondą molekularną FPON1 a ligandem TMPyP4 metodą ^{19}F NMR. U góry zostały przedstawione widma ^{19}F NMR zarejestrowane w trakcie miareczkowania oligonukleotydu roztworem TMPyP4. W środkowej części znajduje się od lewej struktura liganda, a z prawej analiza zmian przesunięć chemicznych ($\Delta\delta_F = [\delta_F(\text{FPON1} + \text{TMPyP4}) - \delta_F(\text{FPON1})]$) i analogicznie dla AMPF) wraz z wyznaczoną stałą dysocjacji. Na samym dole wykresy prezentują zmianę szerokości połówkowych oraz intensywności składowych sygnału FPON1. Warunki eksperymentu: 500 μM FPON1, 100 μM AMPF, 50 cytrynian sodu pH 4,2, 10% D_2O , 25°C. Wykonano dwa powtórzenia, dane przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe.

że TMPyP4 oddziałuje także ze strukturami *i*-motyw poprzez mechanizm nieinterkalacyjny (236), dlatego wybrałem ten związek do badań interakcji z sondą FPON1. Oligonukleotyd FPON1 rozpuściłem w buforze o pH 4,2, a następnie odczekałem co najmniej 48 h do swobodnego zwinienia się cząsteczek w strukturę *i*-motywu, po czym rejestrowałem widmo ^{19}F NMR. W kolejnych krokach dodawałem do roztworu oligonukleotydu roztwór liganda, TMPyP4 (0-250 μM , 0-2 eq), inkubowałem próbkę w magnesie NMR przez 20 minut w 25°C, po czym rejestrowałem widmo ^{19}F NMR. Jak można zaobserwować na widmach ^{19}F NMR, wraz ze wzrostem stężenia liganda sygnał ulegał przesunięciu w dół pola magnetycznego oraz

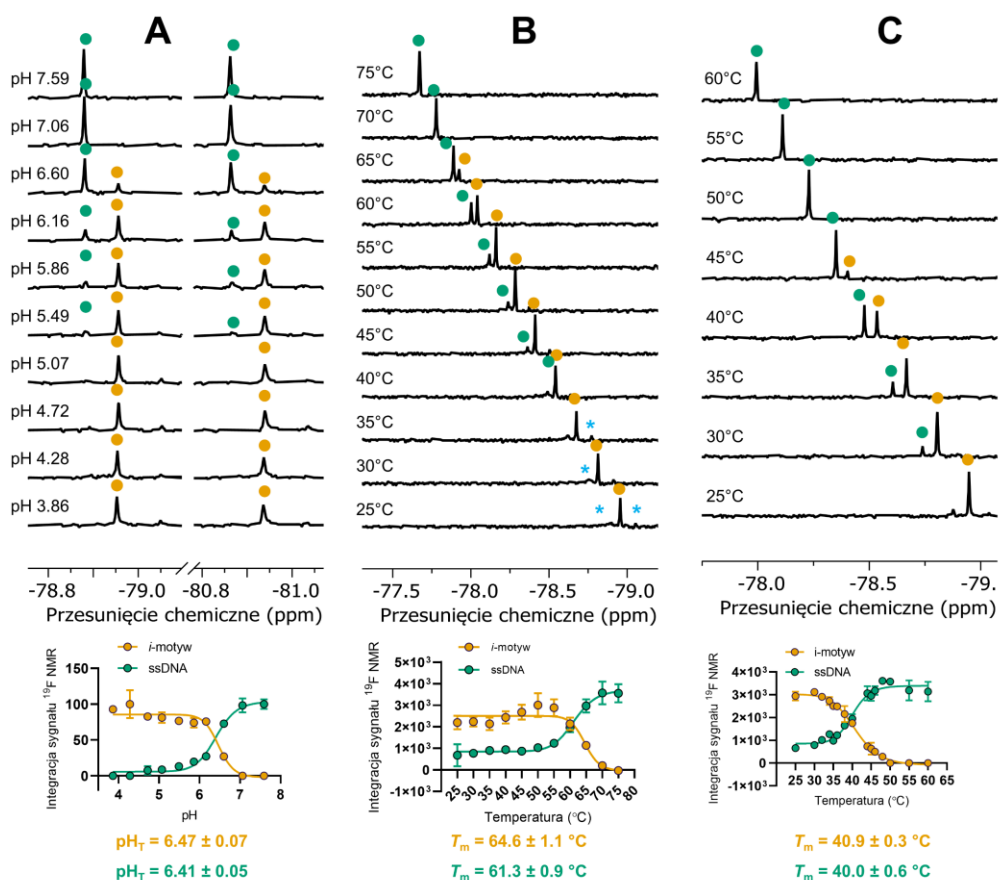
znacznemu poszerzeniu, co interpretuję jako efekt oddziaływania związku z badaną strukturą DNA (Rys. 3-20). Aby potwierdzić, iż obserwowane zmiany na widmach ^{19}F NMR wynikają z oddziaływania pomiędzy *i*-motywem a TMPyP4, w badanej próbce znajdował się fluorowany nukleotyd – 5'-fluoromonofosforan adenozy (AMPF), którego sygnał pozostawał w trakcie eksperymentu na niezmienniej pozycji (kontrola negatywna). Ponadto, dodanie dwóch ekwiwalentów TMPyP4 doprowadziło do częściowego przywrócenia intensywności sygnału (na skutek jego zwężenia), co może wynikać z saturacji kompleksu w obecności nadmiaru liganda. Dane uzyskane na widmach ^{19}F NMR zostały zanalizowane poprzez wykreślenie zależności pomiędzy zmianami przesunięcia chemicznego w funkcji stężenia dodawanego liganda, a dopasowanie odpowiedniego równania pozwoliło na wyznaczenie stałej dysocjacji K_d , która wyniosła $0,18 \pm 0,03$ mM (Rys. 3-20).

Wyniki uzyskane dla 6-nukleotydowej sekwencji DNA tworzącej *i*-motyw (FPON1 oraz FPPON1) były pozytywnym zaskoczeniem, dlatego jako cel do dalszych badań obrałem dłuższą niż oligonukleotydową składającą się z 24-nukleotydów, a w literaturze oznaczaną skrótem hTeloC (5'- TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC -3'). Motyw ten został zidentyfikowany w ludzkim genomie w sekwencjach telomerów (237), a małowzrostkowe związki oddziałujące z tym konkretnym kwasem nukleinowym są uznawane za potencjalne regulatory ekspresji genów. Badanie oddziaływań pomiędzy hTeloC a różnymi związkami chemicznymi zostało przeprowadzone za pomocą wielu metod badawczych, takich jak dichroizm kołowy (CD), emisja fluorescencji czy absorpcja w zakresie UV/VIS (224,238). Aby opracować nową metodę umożliwiającą poszukiwania związków oddziałujących z hTeloC, otrzymałem 5'-fluoro(mono)fosforanową pochodną, FP-hTeloC. Badania wstępne potwierdzające tworzenie się niekanonicznej struktury *i*-motywu przez FP-hTeloC zostały wykonane analogicznie jak dla związków FPON1 oraz FPPON1. Najpierw, zarejestrowane w różnych temperaturach widma ^1H NMR potwierdziły obecność w 25°C oraz brak w 70°C charakterystycznych sygnałów protonów iminowych zaangażowanych w stabilizację struktury *i*-motywów (Rys. 3-17D). Następnie, za pomocą fluorowego magnetycznego rezonansu jądrowego monitorowałem rozwijanie się struktury *i*-motywu na skutek zmian pH oraz temperatury, wyznaczając tym samym temperaturę mięknięcia (w różnych pH) oraz pH przejścia w 25°C (Tabela 3.8). Ponadto, w niezależnym eksperymencie z rejestracją zmian absorbancji w 260 nm oraz 295 nm w różnych pH obserwowałem zmiany intensywności

absorpcji wraz ze wzrostem temperatury (Rys. 3-6C i D), co zostało dokładnie opisane w podrozdziale 3.2.4.

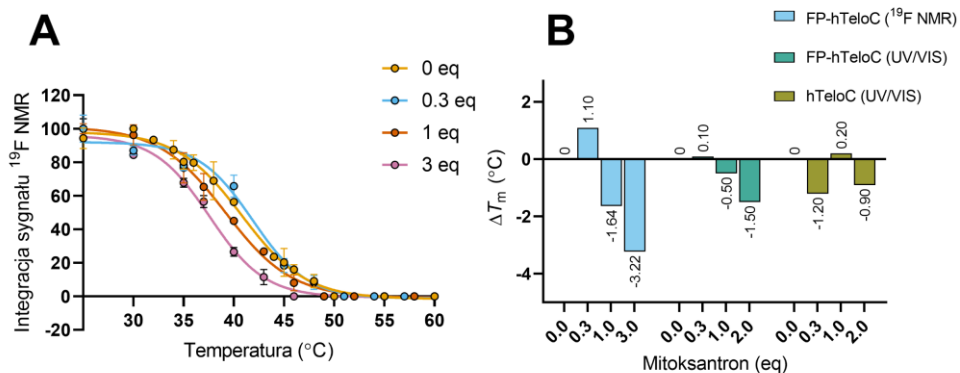
Metoda ^{19}F NMR została wykorzystana do wyznaczenia dokładnej wartości pH przejścia (pH_T). Jest to taka wartość pH, w której w stanie równowagi, statystycznie rzecz biorąc, połowa cząsteczek oligonukleotydu FP-hTeloC jest zwinęta do struktury *i*-motywu, a połowa rozwinięta do pojedynczej nici DNA. Przeprowadziłem eksperyment, w którym za pomocą roztworu NaOH zmieniałem wartość pH roztworu (pomiar wykonywałem szklaną elektrodą chlorosrebrową), rozpoczynając od pH około 4. W najniższym ustalonym pH (3,89) na widmie ^{19}F NMR zaobserwowałem jeden wyraźny dublet o przesunięciu chemicznym równym $\delta_F = -79,94$ ppm. Wraz z dodawaniem kolejnych porcji zasady sodowej sygnał zanikał z jednoczesnym pojawieniem się nowego sygnału, którego intensywność wzrastała w całym zakresie testowanego pH (końcowa wartość pH wyniosła 7,59). Przesunięcie chemiczne sygnału w warunkach lekko zasadowych (pH 7,59) wyniosło $\delta_F = -79,87$ ppm, a tym samym różnica pomiędzy sygnałem początkowym, a końcowym równa się $\Delta\delta_F = -0,07$ ppm, co jest aż nadto wystarczające do rozróżnienia obydwu rezonansów (Rys. 3-21A). Analiza sygnałów odpowiadających strukturze *i*-motywu oraz ssDNA poprzez ich integrację oraz dopasowanie odpowiedniego równania do danych pozwoliło mi na wyznaczenie wartości pH przejścia, która dla pierwszego przypadku wyniosła $6,47 \pm 0,07$, a dla drugiego $6,41 \pm 0,05$, a wartości te są zgodne z danymi literaturowymi (221,239). W kolejnym kroku wyznaczyłem temperatury mięknięcia FP-hTeloC metodą ^{19}F NMR oraz UV/VIS, stosując bufony o dwóch wartościach pH, tj. 4,2 oraz 5,5 (Rys. 3-21C i D). Jak można było się spodziewać, zmiany na widmach ^{19}F NMR (zanik początkowego sygnału i pojawienie się nowego w wyższej temperaturze) pozwoliły w prosty i jasny sposób na obserwację rozwijania się struktury *i*-motywu. Z otrzymanych danych wyznaczyłem wartości temperatur mięknięcia i są to $64,6^\circ\text{C}$ w niższym pH oraz $40,9^\circ\text{C}$ w pH wyższym (dane ^{19}F NMR, analiza sygnału rezonansowego *i*-motywu). W analogicznych warunkach przeprowadziłem eksperymenty metodą UV/VIS z detekcją absorbancji przy 260 nm w pH 4,2 oraz przy 260 nm i 295 nm w pH 5,5 (rozdział 3.2.4). Porównując zebrane dane (Tabela 3.8) zaobserwować można wyraźną różnicę w wartościach T_m uzyskanych dwiema metodami badawczymi w pH 4,2 ($64,6^\circ\text{C}$ - ^{19}F NMR vs. $54,7^\circ\text{C}$ - UV/VIS). Rozbieżność ta może wynikać z niejednorodności struktur występujących w badanym roztworze. Podczas gdy metodą UV/VIS analizuje się całą próbkę, a otrzymany wynik odnosi się do wszystkich cząsteczek w roztworze,

metoda ^{19}F NMR pozwala na analizę konkretnego sygnału, który odpowiada tylko i wyłącznie jednej topologii *i*-motywu. Na widmach ^{19}F NMR zarejestrowanych w niższych temperaturach wyraźnie widać więcej niż jeden sygnał, co może sugerować obecność mniejszych populacji *i*-motywów o innej topologii. Drugim powodem rozbieżności może być niewystarczający czas inkubacji w danej temperaturze, który wynosił 20 minut lub zbyt mało punktów pomiarowych pomiędzy kolejnymi eksperymentami. Pomimo pewnych różnic w wynikach uzyskanych tymi dwiema niezależnymi metodami, można stwierdzić, że zarówno wartości pH_T , jak i T_m są zbliżone do wartości literaturowych (221,239).



Rys. 3-21. Wykorzystanie sondy FP-hTeloc do wyznaczenia pH przejścia oraz temperatur mięknienia metodą ^{19}F NMR. A) Zestaw widm zarejestrowany w różnym pH oraz analiza pól powierzchni sygnałów; B) Zestaw widm zarejestrowany w różnej temperaturze w pH 4,2. Niebieskimi gwiazdkami oznaczono rezonanse ^{19}F NMR, które mogą odpowiadać strukturze *i*-motywu o różnej topologii oraz analiza pól powierzchni sygnałów; C) Zestaw widm zarejestrowany w różnej temperaturze w pH 5,5 oraz analiza pól

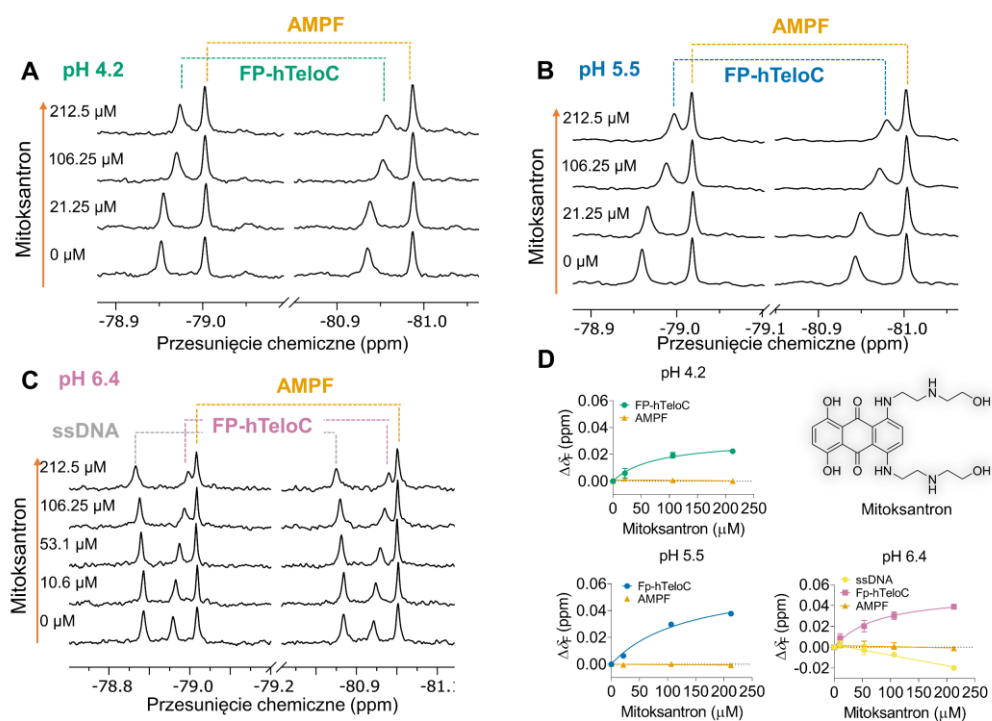
powierzchni sygnałów. Dla lepszej przejrzystości rysunku przedstawiono lewą składową sygnału w eksperymentach ze zmianą temperatury.



Rys. 3-22. Wpływ mitoksantronu na stabilność struktur *i*-motywów o sekwencjach FP-hTeloC oraz hTeloC w pH 5,5 (50 mM cytrynian sodu, 10% D_2O). A) Profile temperatur topnienia uzyskane metodą ^{19}F NMR. Na widmach poddano analizie sygnał odpowiadający strukturze drugorzędowej FP-hTeloC. Temperatura uzyskana bez mitoksantronu to $40,9 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. B) Zmiany T_m pod wpływem mitoksantronu. Przedstawiono wyniki uzyskane dwiema metodami badawczymi tj. ^{19}F NMR oraz UV/VIS z detekcją przy 295 nm. Wartości T_m bez liganda zgodnie z Tabela 3.8.

FP-hTeloC został wykorzystany jako sonda molekularna do monitorowania oddziaływania z mitoksantronem, który jest związkiem interkalującym DNA. Hamuje on działanie topoizomerazy II (240) oraz zaburza procesy transkrypcji i translacji. Mitoksantron znalazł zastosowanie w leczeniu białaczki (241), chłoniaka nieziarniczego (ang. *non-Hodgkin lymphoma*) oraz jest stosowany w celu spowolnienia postępowania stwardnienia rozsianego (242). Ponadto wykazano, że mitoksantron oddziałuje z G-kwadrupleksami oraz strukturami *i*-motywów, a dokładniej z sekwencją hTeloC (5'-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-3') (238). Mnogość terapeutycznych zastosowań mitoksantronu zachęca do poszukiwania innych związków oddziałujących z sekwencjami DNA tworzącymi *i*-motywy, do czego niezbędne jest opracowywanie nowych, prostych metod badawczych. W niniejszym projekcie zweryfikowałem możliwość zastosowania fluoro(mono)fosforanowej sondy (Fp-hTeloC) do monitorowania interakcji hTeloC z mitoksantronem. Najpierw zbadałem wpływ mitoksantronu na stabilność struktury *i*-motywu poprzez wyznaczenie temperatur przejścia (w obecności mitoksantronu) metodą ^{19}F NMR oraz w niezależnych pomiarach z detekcją absorpcji. Jak się okazało, dodatek 0,3 ekwiwalenta mitoksantronu do FP-hTeloC powoduje niewielką stabilizację kompleksu oligonukleotyd:ligand ($\Delta T_m = +1,1^{\circ}\text{C}$), natomiast już trzykrotny nadmiar liganda znacznie obniża wartość temperatury mięknienia ($\Delta T_m = -3,22^{\circ}\text{C}$) (Rys. 3-22A i B). W badaniach z użyciem

spektroskopii UV/VIS obie sekwencje, hTeloC oraz FP-hTeloC, również wykazały efekt bardzo nieznacznej stabilizacji w kompleksie z niewielką ilością mitoksantronu (0,3 ekwiwalenta) i destabilizacji, gdy liganda było powyżej jednego ekwiwalenta (Rys. 3-22B). Dodatkowo, w trakcie eksperymentu zauważyłem, iż na skutek dodania większej ilości mitoksantronu, w probówce zaczął pojawiać się ciemnoniebieski osad. Warto zaznaczyć, że powyższe eksperymenty przeprowadziłem w buforze cytrynianowym o pH 5,5, w którym wartość pH może mieć wpływ na stabilizację i oddziaływanie nici DNA z ligandem. Dlatego metodą ^{19}F NMR wyznaczyłem równowagową stałą dysocjacji pomiędzy FP-hTeloC a mitoksantronem w trzech różnych pH: pH 4,2, dla którego struktura *i*-motywu jest najtrwalsza, pH 5,5, które jest wartością najczęściej stosowaną w literaturze dla sekwencji hTeloC oraz pH 6,4, będąc jednocześnie wyznaczonym wcześniej pH przejścia, gdzie na widmie ^{19}F NMR obserwuje się sygnały odpowiadające *i*-motywowi oraz rozplecionej nici DNA (ssDNA).



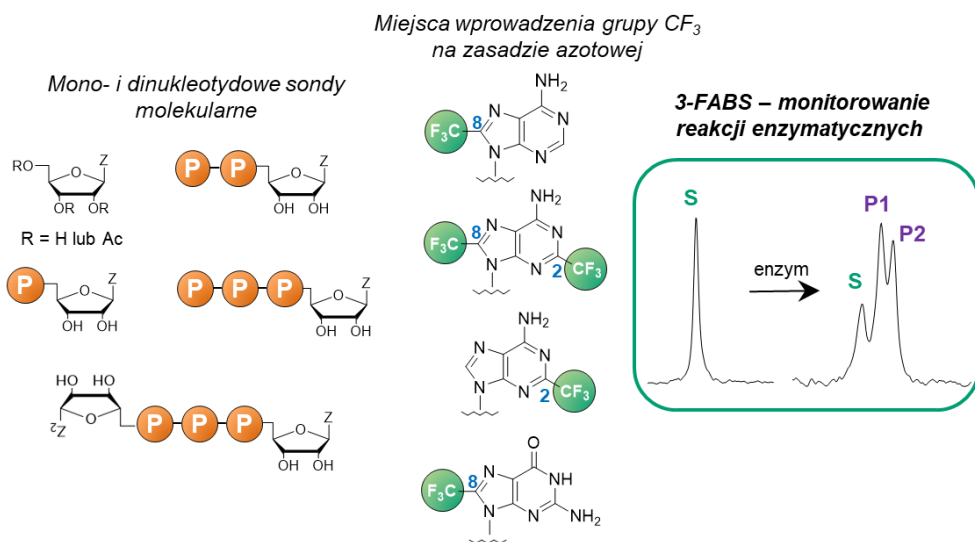
Rys. 3-23. Monitorowanie oddziaływania mitoksantronu z Fp-hTeloC metodą ^{19}F NMR. A) Miareczkowanie FP-hTeloC mitoksantronem w pH 4,2; B) Miareczkowanie Fp-hTeloC mitoksantronem w pH 5,5; C) Miareczkowanie FP-hTeloC mitoksantronem w pH_T = 6,4; D) Zmiany przesunięcia chemicznego w funkcji stężenia dodawanego mitoksantronu w różnym pH. ($\Delta\delta_F = [\delta_F(\text{FP-hTeloC} + \text{mitoksantron}) - \delta_F(\text{FP-hTeloC})]$; i analogicznie dla AMPF). Punkty na wykresie obliczono na podstawie dwóch oddzielnych eksperymentów, dane zaprezentowane jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. Warunki eksperymentów: 212,5 μM

FP-hTeloC, 80 μM AMPF, 50 mM cytrynian sodu o pH 4,2 i 5,5, 10% D_2O lub 50 mM kakodylan sodu, 100 mM NaCl, 10% D_2O , pH 6,4.

Eksperymenty wykonałem analogicznie jak dla oligonukleotydu FPON1 oraz liganda TMPyP4. FP-hTeloC rozpuszczono w buforze o odpowiednim pH, dodano AMPF jako nieoddziałującą z mitoksantronem kontrolę oraz rejestrowano widmo ^{19}F NMR. Następnie, przeprowadzono miareczkowanie roztworem mitoksantronu aż do osiągnięcia stosunku 1:1 (ligand:FP-hTeloC). Po każdym dodaniu liganda próbkę inkubowano w magnecie NMR w 25°C przez co najmniej 20 minut, a następnie rejestrowano widmo ^{19}F NMR. W warunkach pH 4,2 oraz pH 5,5 sygnały widoczne na widmie ^{19}F NMR o przesunięciu chemicznym kolejno -79,94 ppm oraz -79,95 ppm, w wyniku dodania mitoksantronu, przesunęły się w górę pola magnetycznego zmieniając swoje przesunięcia chemiczne do wartości -79,97 oraz -79,99 ppm (po dodaniu jednego ekwiwalentu liganda) (Rys. 3-23A, B). Bardziej złożoną sytuację można było zaobserwować w pH 6,4, ponieważ w tych warunkach tylko część FP-hTeloC była zwinęta w *i*-motyw, co bardzo dobrze widać na widmie ^{19}F NMR, na którym widoczne są trzy dublety odpowiadające kolejno strukturze ssDNA, strukturze *i*-motywu oraz kontroli wewnętrznej AMPF (Rys. 3-23C). Podobnie jak w eksperymentach w niższym pH, dodanie mitoksantronu spowodowało przesunięcie sygnału odpowiadającego *i*-motywowi w górę pola, jednakże jednocześnie obserwowano niewielkie przesunięcia chemiczne rezonansu ssDNA, którego położenie zmieniło się w przeciwną stronę, tj. w dół pola magnetycznego ($\Delta\delta_{\text{F}} = -0,02$ ppm). We wszystkich trzech eksperymentach sygnał odpowiadający molekułom kontrolnej (AMPF) pozostawał bez zmian w trakcie całego eksperymentu. Dlatego powyżej opisane zmiany w przesunięciach chemicznych można interpretować jako efekt oddziaływania pomiędzy FP-hTeloC a mitoksantronem. Dla wszystkich zebranych danych wykreśliłem zależności zmian wartości przesunięcia chemicznego w funkcji stężenia dodawanego mitoksantronu (Rys. 3-23D), a dla warunków najbardziej stabilnych (pH 4,2) dopasowałem matematyczny model opisujący oddziaływanie pomiędzy dwiema cząsteczkami w stosunku 1:1. Wyznaczona w ten sposób stała dysocjacji K_{d} wyniosła $0,07 \pm 0,03$ mM, co jest wartością zbliżoną do wartości literaturowej ($K_{\text{d}} = 0,120 \pm 0,003$ mM) zmierzonej jednak w innych warunkach (10 mM bufor kakodylowy, 100 mM NaCl, 0,05% Tween-20 oraz 5% DMSO) i inną metodą badawczą (SPR) (238).

3.3 Trifluorometylowane puryny jako sondy molekularne w badaniach ^{19}F NMR

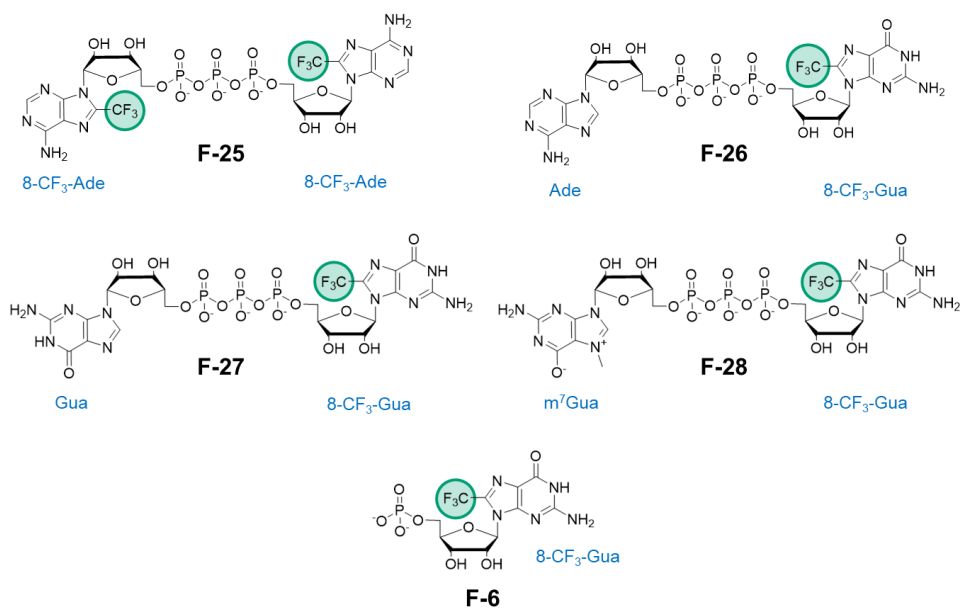
Zastosowanie znaczników fluorowanych w połączeniu z metodą ^{19}F zaprezentowałem na przykładzie mono- i dinukleotydów purynowych, w których jedną z zasad azotowych była adenina lub guanina podstawiona w pozycji C8 lub C2 grupą trifluorometylową (CF_3) (Rys. 3-24). Synteza przedstawionych poniżej związków została wykonana przez doktora Mikołaja Chromińskiego, została już opublikowana, więc nie będzie tutaj opisana. W niniejszym rozdziale zostaną natomiast zaprezentowane wyniki badań, w których trifluorometylowane puryny zastosowałem jako sondy molekularne w monitorowaniu reakcji enzymatycznych w czasie rzeczywistym oraz identyfikacji inhibitorów enzymów z wykorzystaniem techniki ^{19}F NMR. (Rys. 3-25). Badania te bardzo dobrze wpisują się w ideę *n*-FABS (ang. *n-fluorine atoms for biochemical screening*) (137,138), a w tym przypadku 3-FABS, która polega na wykorzystaniu trifluorowanej sondy molekularnej jako substratu lub kofaktora dla badanych białek w analizach wysokoprzepustowych do poszukiwania nowych inhibitorów z wykorzystaniem ^{19}F NMR (243).



Rys. 3-24. Zestawienie mono- oraz dinukleotydów zawierających ugrupowanie trifluorometylowe (CF_3). Z prawej strony wykorzystanie nukleotydów jako sond molekularnych w metodzie 3-FABS do monitorowania postępu reakcji enzymatycznej metodą ^{19}F NMR. Z – zasada azotowa, na niebiesko oznaczono numery atomów węgla, przy których znajduje się grupa CF_3 .

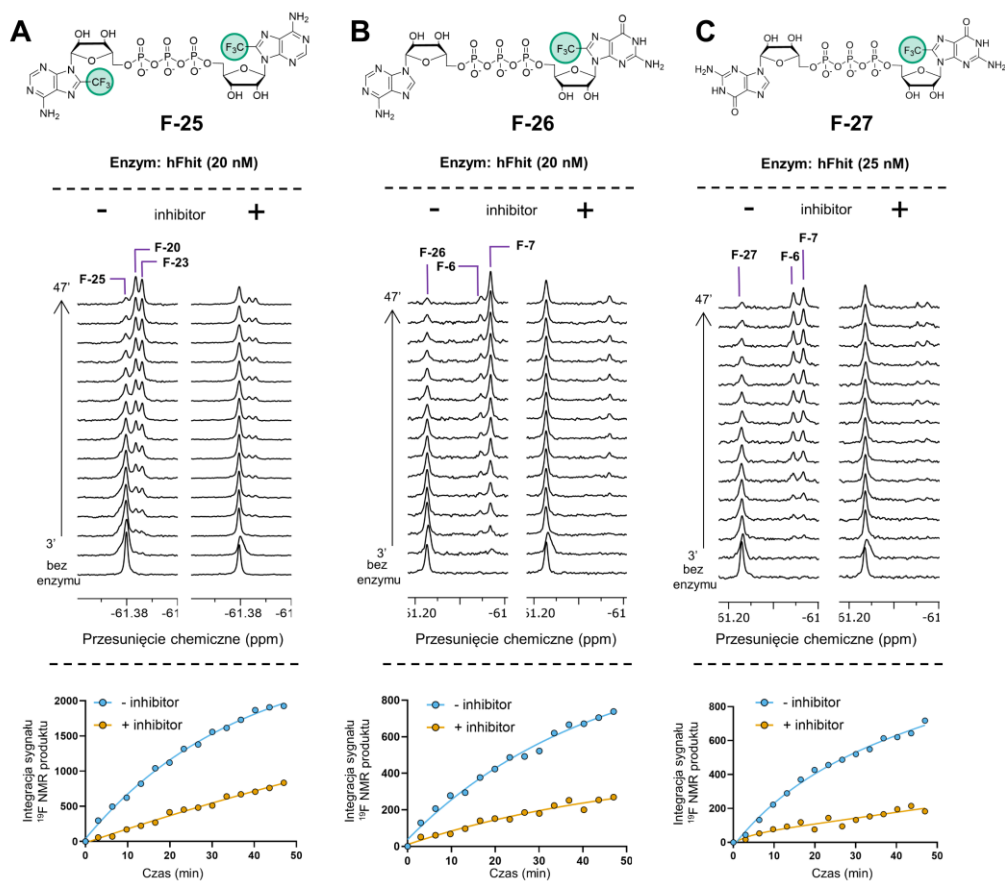
3.3.1 Aktywność katalityczna i specyficzność substratowa ludzkiego białka hFhit

W części pierwszej wyników badań własnych opisałem metodę biofizyczną badania aktywności enzymatycznej białka Fhit. Dla przypomnienia, metoda ta polega na przereagowaniu fluorofosforanowego substratu z Fhit, a postęp reakcji enzymatycznej określa się na podstawie uwolnionych w trakcie hydrolizy jonów fluorkowych. Ilość jonów fluorkowych jest wyznaczana za pomocą sondy fluorogenicznej, która po reakcji z jonami F^- wykazuje właściwości fluorescencyjne. Opisany eksperyment zalicza się do tak zwanego testu w punkcie końcowym (ang. *end-point assay*), ponieważ reakcja enzymatyczna trwa przez pewien określony czas i następnie jest analizowana. Badania opisane w kolejnych podrozdziałach miały na celu opracowanie testu kinetycznego (ang. *kinetic assay*), który umożliwi monitorowanie reakcji enzymatycznej w czasie rzeczywistym. Zaletą drugiego podejścia jest znacznie szybszy czas eksperymentu oraz możliwość obserwacji kinetyki enzymu w szerokim zakresie jego stężenia czy czasowym.



Rys. 3-25. Grafika przedstawia trifluorometylowane sondy molekularne wykorzystane w badaniach ^{19}F NMR wraz z numeracją stosowaną w tekście. Na niebiesko przedstawiono skróty zasad azotowych, z których zbudowane są związki. Ade – adenina, 8-CF₃-Ade – adenina z grupą CF₃ w pozycji ósmej, Gua – guanina, 8-CF₃-Gua – guanina z grupą CF₃ w pozycji ósmej, m⁷Gua – 7-metyloguanina.

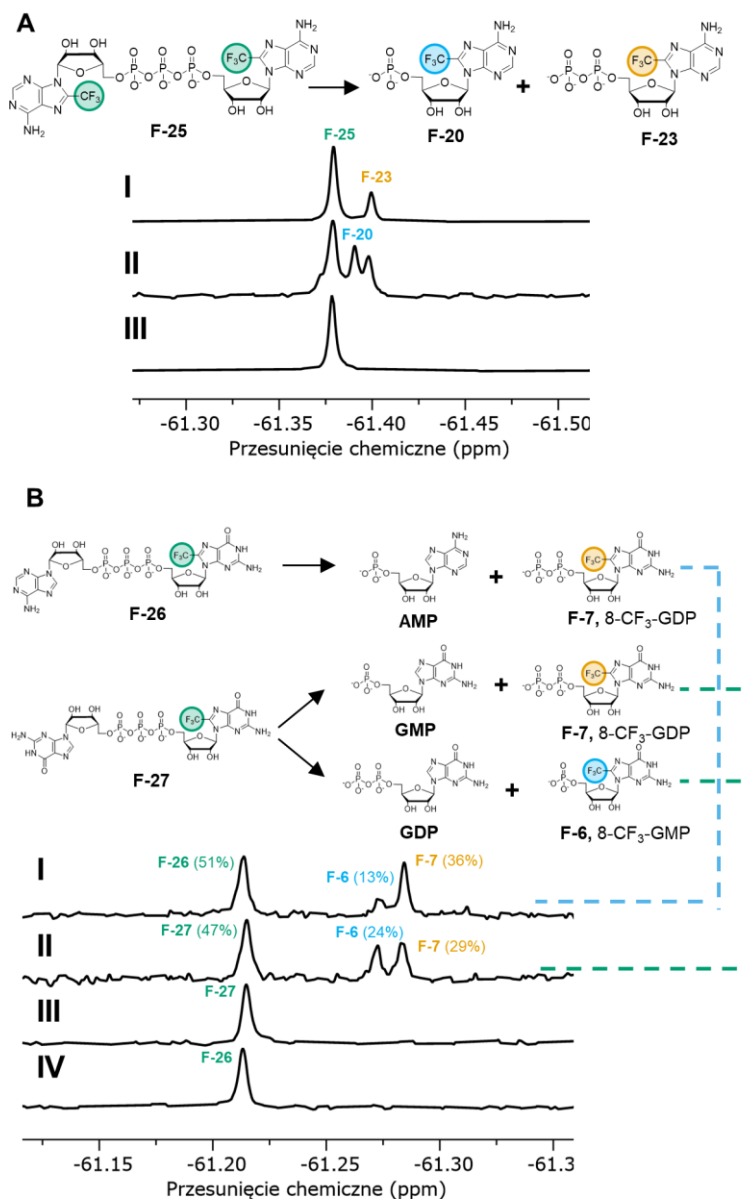
Trifluorometylowane dinukleotydy zostały wykorzystane jako sondy molekularne do monitorowania aktywności hydrolitycznej ludzkiego enzymu Fhit za pomocą metody ^{19}F NMR. Najpierw, sprawdziłem czy bis(trifluorometylowany) analog naturalnego substratu



Rys. 3-26. Degradacja enzymatyczna związków F-25-27 monitorowana metodą ^{19}F NMR w obecności oraz bez dodatku inhibitora. Na rysunku zostały przedstawione struktury związków (góra), widma ^{19}F NMR (środek) oraz wykresy przedstawiające przyrost produktów w czasie określony na podstawie integracji sygnałów ^{19}F NMR. A) F-25 z 20 nM hFhit +/- 2 μM inhibitor; B) F-26 z 20 nM hFhit +/- 2 μM inhibitor; C) F-27 z 25 nM hFhit +/- 2 μM inhibitor; W każdej reakcji użyto substratu o stężeniu 100 μM . Bufor: 50 mM MES-KOH pH 6,50, 1 mM MgCl_2 , 0,3% DMSO (v/v), 10% D_2O . Na każdy punkt pomiarowy składa się widmo ^{19}F NMR będące średnią z 32 skanów.

(8- CF_3 - Ap_3A -8- CF_3 , Rys. 3-25 struktura F-25) będzie akceptowany jako substrat przez enzym Fhit. Widmo zarejestrowane dla związku F-25 charakteryzuje się pojedynczym singletem o przesunięciu chemicznym równym -61,38 ppm, który odpowiada sześciu równocennym atomom fluoru (dwie grupy CF_3 , symetryczny związek). Po dodaniu enzymu Fhit (20 nM, 100 μM sondy F-25) intensywność sygnału zaczęła stopniowo maleć, a w górze pola pojawiły się dwa nowe sygnały, odpowiadające produktom przeprowadzonej reakcji i były to kolejno 8- CF_3 -AMP (F-20, $\delta_{\text{F}} = -61,39$ ppm) oraz 8- CF_3 -ADP (F-23, $\delta_{\text{F}} = -61,40$ ppm) (Rys. 3-26A). Przypisanie sygnałów do poszczególnych związków było możliwe dzięki zarejestrowaniu widma ^{19}F NMR mieszaniny nukleotydów F-25 i F-23 (Rys. 3-27 A-I), a następnie porównaniu wartości

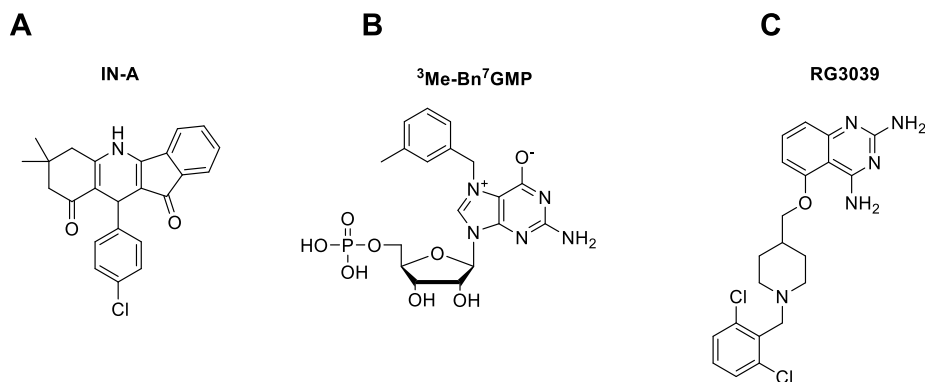
przesunięć chemicznych z danymi uzyskanymi podczas monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznej (Rys. 3-27A-II, A-III). Pomimo niewielkich różnic w położeniach na widmie sygnałów substratu oraz produktów, śledzenie reakcji metodą ^{19}F NMR było możliwe. Enzym Fhit akceptuje jako substraty nie tylko analogi dinukleotydów zawierające adeninę jako zasadę azotową, ale także związki guaninowe, co zostało przedstawione w podrozdziale 2.2.6. Dlatego w kolejnym etapie badań przeprowadziłem reakcje enzymatyczne w analogiczny sposób, ale jako substratów użyłem niesymetrycznych analogów dinukleotydów zbudowanych z 8-trifluorometylowanej guanozyny oraz adenozyiny (F-26, $\delta_{\text{F}} = -61,21$ ppm) lub guanozyny (F-27, $\delta_{\text{F}} = -61,21$ ppm). Podobnie jak w przypadku reakcji ze związkiem F-25, pojedynczy sygnał na widmie ^{19}F NMR zanikał od momentu dodania Fhit, a dwa sygnały o różnej intensywności i różnym przesunięciu chemicznym pojawiły się na widmie (Rys. 3-27A i B). Wiedząc, iż Fhit spośród zasad azotowych budujących nukleotydy preferuje adeninę, można założyć, że głównymi produktami hydrolizy sondy F-26 będą AMP oraz 8- CF_3 -GDP (F-7, $\delta_{\text{F}} = -61,28$ ppm). Jednak na widmach ^{19}F NMR zaobserwowano nie jeden, a dwa nowe rezonanse, co sugeruje rozerwanie wiązania pirofosforanowego również od strony 8-trifluorometylowanej guanozyny oraz powstanie produktów ADP oraz 8- CF_3 -GMP (F-6, $\delta_{\text{F}} = -61,27$ ppm) (Rys. 3-27B-I, B-IV). Podobną sytuację obserwuje się dla sondy F-27, której hydroliza następuje od strony guaniny i produktami są GMP oraz 8- CF_3 -GDP lub od strony 8-trifluorometylowanej zasady azotowej, a produktami w takim wypadku są GDP oraz 8- CF_3 -GMP (Rys. 3-27B-II, B-III). Ponadto, każdy z trzech omówionych powyżej eksperymentów powtórzono w obecności znanego inhibitora enzymu Fhit (185) (Rys. 3-28A), a spowolnienie reakcji enzymatycznej z powodzeniem obserwowano na widmach ^{19}F NMR (Rys. 3-26).



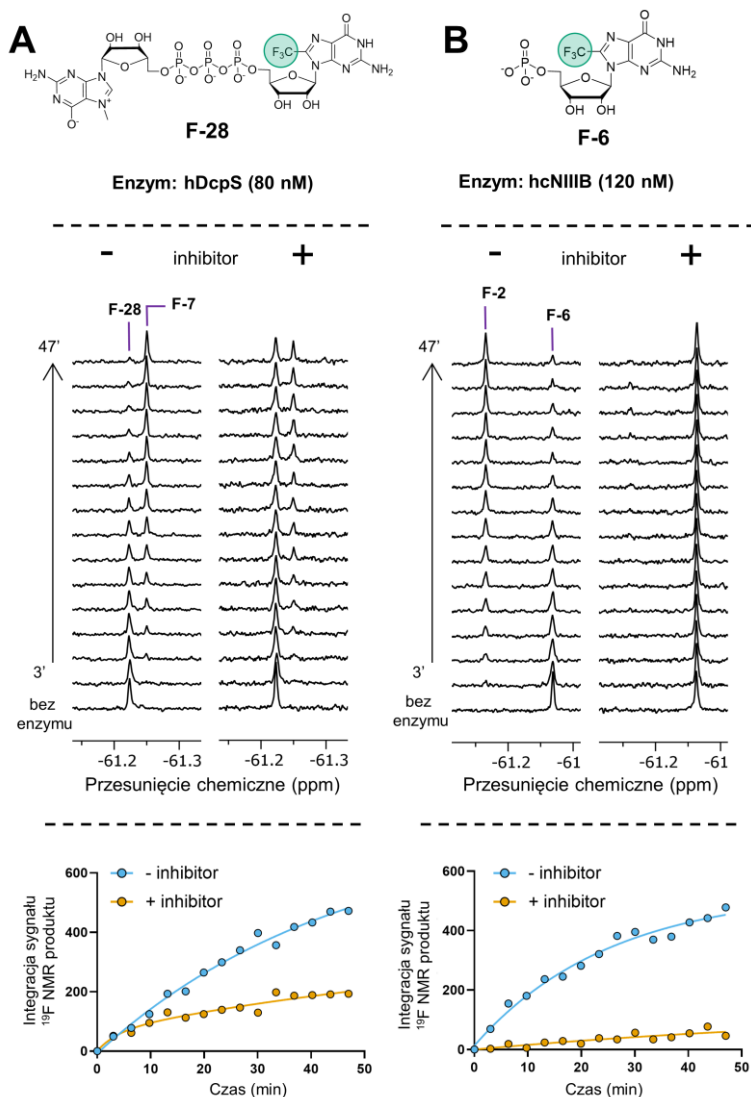
Rys. 3-27. Hydroliza sond molekularnych przez ludzki enzym Fhit oraz przypisanie sygnałów ^{19}F NMR do poszczególnych produktów. A) Schemat hydrolizy sondy F-25 do związków F-20 i F-23; A-I) Widmo ^{19}F NMR mieszaniny związków F-25 i F-23 (1:1); A-II) Widmo ^{19}F NMR przedstawiające postęp reakcji po około 20 minutach; A-III) Widmo ^{19}F NMR związku F-25 w buforze. B) Schematy reakcji przedstawiające główne ścieżki hydrolizy sond molekularnych F-26 oraz F-27. B-I, B-II) Zarejestrowany postęp reakcji enzymatycznej po około 20 minutach; B-III, B-IV) Widma ^{19}F NMR związków F-26 i F-27 przed dodaniem enzymu Fhit. Warunki: 50 mM MES-KOH pH 6,50, 1 mM MgCl_2 , 0,3% DMSO (v/v), 10% D_2O . F-25, F-26, F-27 – 100 μM , enzym Fhit 20–25 nM.

3.3.2 Aktywność katalityczna białek rozpoznających nukleotydy zawierające N7-metyloguaninę

Molekularne sondy wyposażone w znacznik trifluorometylowy zostały wykorzystane do badań aktywności enzymatycznej dwóch enzymów, które w komórkach zaangażowane są w metabolizm nukleotydów zbudowanych z N7-metyloguaniny. Pierwszym z nich jest ludzki enzym DcpS, który hydrolizuje strukturę końca 5' krótkich mRNA ($m^7\text{GpppN}_n$) powstających w komórce w wyniku degradacji cząsteczek mRNA (244). Enzym ten został również zidentyfikowany jako cel terapeutyczny, a jego inhibitory stosowane są jako terapeutyki w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni czy ostrej białaczki szpikowej (171,172,245,246). Trifluorometylowany analog końca 5'-mRNA (F-28, $100\ \mu\text{M}$) został rozpuszczony w buforze oraz inkubowany z ludzkim enzymem DcpS ($80\ \text{nM}$) z dodatkiem lub bez dodatku silnego inhibitora tego enzymu, RG3039. Przebieg reakcji enzymatycznej był monitorowany metodą ^{19}F NMR, w której sygnał rezonansowy substratu ($\delta_{\text{F}} = -61,22\ \text{ppm}$) zanikał w czasie, a pojawiał się jeden nowy sygnał o przesunięciu chemicznym równym $-61,25\ \text{ppm}$ (Rys. 3-29A). Substrat F-28 został selektywnie zhydrolizowany do 8- CF_3 -GDP (obecność jednego produktu) oraz $m^7\text{GMP}$, co jest zgodne z danymi literaturowymi na temat wysokiej specyficzności enzymu DcpS wobec 7-metyloguaniny. Ponadto, w reakcji z dodatkiem RG3039 zauważono znaczne spowolnienie reakcji enzymatycznej (Rys. 3-29A).



Rys. 3-28. Struktury związków chemicznych będących inhibitorami A) enzymu Fhit, B) enzymu cNIIIB, oraz C) enzymu DcpS.



Rys. 3-29. Degradacja enzymatyczna związków F-28 oraz F-6 monitorowana metodą ^{19}F NMR w obecności oraz bez dodatku inhibitora. Na rysunku zostały przedstawione struktury związków (góra), widma ^{19}F NMR (środek) oraz wykresy przedstawiające przyrost produktów w czasie określony na podstawie integracji sygnałów ^{19}F NMR; A) Monitorowanie degradacji enzymatycznej sondy F-28 przez hDcpS; B) Monitorowanie degradacji enzymatycznej sondy F-6 przez hcNIIIB.

Drugim zbadanym enzymem była ludzka nukleotydaza cNIIIB, która defosforyluje 5'-monofosforan 7-metyloguanozyny (m^7GMP) do 7-metyloguanozyny i fosforanu. Inhibitory tego białka są potencjalnymi modulatorami metabolizmu mononukleotydów w ścieżce degradacji mRNA. hcNIIIB hydrolizuje również nukleotydy pirymidynowe, natomiast takie związki jak AMP i GMP są bardzo słabymi substratami. Ponieważ wprowadzenie grupy CF_3

w pozycję C8 5'-monofosforanu guanozyny może powodować rozmycie gęstości elektronowej w obrębie zasady azotowej, a tym samym przybliżyć ją strukturalnie do 7-metyloguanozyny, sonda F-6 (8- CF_3 -GMP) została przetestowana jako potencjalny substrat dla hcNIIIB. 100 μM roztwór związku F-6 w buforze poddano analizie ^{19}F NMR, po czym dodano enzymu (120 nM). Zgodnie z oczekiwaniami sygnał widoczny w czasie zero (F-6, $\delta_{\text{F}} = -61,27$ ppm) eksperymentu stopniowo zanikał, a pojawił się nowy sygnał ($\delta_{\text{F}} = -61,17$ ppm) o innym przesunięciu chemicznym (Rys. 3-29B). Powtórzenie eksperymentu z dodatkiem selektywnego inhibitora niemal całkowicie zatrzymało reakcję enzymatyczną, co było bardzo dobrze widoczne na widmach ^{19}F NMR.

Podsumowując, trifluorometylowane puryny w pozycji C8 pełniły rolę sond molekularnych w badaniach metodą ^{19}F NMR. Wprowadzona modyfikacja nie zaburzyła oddziaływania nukleotydów z enzymami, dlatego możliwe było obserwowanie hydroliz enzymatycznych. Zmiany sygnałów na widmach NMR potwierdziły degradację substratów do mniejszych cząsteczek, a w obecności znanych inhibitorów obserwowano znaczne spowolnienie reakcji enzymatycznej. Zaletą wprowadzonej modyfikacji trifluorometylowej jest jej wszechstronność ze względu na możliwość badania kilku różnych enzymów. Ugrupowanie CF_3 jest również preferencyjne w metodzie ^{19}F NMR ze względu na pojedynczy, intensywny sygnał na widmach NMR, co ułatwia ich rejestrację oraz analizę.

4. Podsumowanie

Wspólnym mianownikiem kluczowych badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej jest ugrupowanie **fluorofosforanowe**, które w zależności od zastosowań danego związku zostało wprowadzone w obręb pojedynczego nukleotydu bądź oligonukleotydu. Synteza tak zmodyfikowanych analogów miała na celu uzyskanie nowych sond molekularnych, w oparciu o które opracowane zostały metody biofizyczne umożliwiające monitorowanie istotnych procesów biologicznych, takich jak przebieg reakcji enzymatycznych, identyfikacja inhibitorów czy monitorowanie zmian konformacyjnych zarówno krótkich, jak i długich oligonukleotydów. Opracowane rozwiązania umożliwiły wyznaczenie parametrów fizykochemicznych charakteryzujących oddziaływanie pomiędzy kwasem nukleinowym a białkiem oraz kwasem nukleinowym a małocząsteczkowymi ligandami (stała dysocjacji – metoda ^{19}F NMR) oraz określające potencjał cząsteczek jako inhibitorów (IC_{50} – metoda wysokoprzepustowa). Zaproponowana modyfikacja chemiczna stała się podstawą nowej klasy związków, które okazały się cennymi narzędziami badawczymi z możliwością wykorzystania ich w eksperymentach z użyciem różnych metod badawczych takich jak fluorowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego czy metody z detekcją fluorescencji.

Pierwszym projektem realizowanym w ramach projektu doktorskiego było opracowanie wysokoprzepustowej metody przesiewowej wykorzystującej fluoro(mono)fosforanowe analogi mononukleotydów jako sondy molekularne. Zaprojektowano eksperyment, w którym fluorofosforanowa sonda była hydrolizowana przez badany enzym do jonów fluorkowych, a te z kolei były ilościowo oznaczane przy użyciu czułej i selektywnej sondy fluorogenicznej. Metodę wysokoprzepustową opracowano dla trzech enzymów, tj. fosfodiesterazy z jadu węża (PDE-I), ludzkiego enzymu dekapującego (hDcpS) oraz ludzkiego i roślinnego enzymu Fhit (hFhit oraz AtFhit). Ponadto, z zasobów własnych oraz Laboratorium Chemii Bioorganicznej skompletowano dwie biblioteki związków. Pierwsza (BZ-1) składająca się z 76 związków oraz druga (BZ-2), będąca uzupełnieniem BZ-1 do 141 związków głównie pochodzenia nukleotydowego. Biblioteki te są jedyne w swoim rodzaju ze względu na obecność chemicznie modyfikowanych nukleotydów, które na co dzień nie są dostępne handlowo.

Fosfodiesterazę PDE-I wykorzystano jako enzym modelowy do walidacji formatu wysokoprzepustowego (HTS). W eksperymencie jako fluorową sondę wykorzystano

5'-fluoromonofosforan adenozy (AMPF), dobrano i zoptymalizowano warunki reakcji enzymatycznej tak, aby wartość parametru Z' była większa od 0,5, co świadczy o dobrej jakości metody i możliwości jej zastosowania w badaniach wysokoprzepustowych. Badania przesiewowe biblioteki BZ-1 pozwoliły na identyfikację sześciu silnych inhibitorów, dla których wyznaczono parametr IC_{50} . Następnie, metoda HTS została zaadaptowana dla enzymów hDcpS (m⁷GMPF jako sonda), hFhit (AMPF jako sonda) oraz AtFhit (AMPF jako sonda). Najsilniejsze inhibitory enzymu hDcpS zidentyfikowano wśród mono- i dinukleotydów zawierających 7-metyloguaninę. Podobny wynik uzyskano dla roślinnego Fhit, jednak dla tego enzymu zróżnicowanie inhibitorów było zdecydowanie większe. Poza inhibitorami 7-metyloguaninowymi wyróżniły się również analogi nukleotydów zbudowane z guaniny oraz adeniny, co świadczy o bardzo szerokim spektrum substratowym AtFhit. Największą uwagę poświęcono ludzkiemu enzymowi Fhit, który jest supresorem nowotworowym, i którego niski poziom zaobserwowano w komórkach rakowych, ale jego dokładna rola do dzisiaj nie jest znana. Wyniki HTS wyróżniły kilka potencjalnych inhibitorów hFhit wśród związków adeninowych, jednak wartości inhibicji były dość niskie (<65%). W związku z tym otrzymano szereg nowych analogów diadeninowych zawierających modyfikację 5'-tiofosfoestrową lub ugrupowanie difluorometyleno(bis)fosfonianowe i przebadano je metodą wysokoprzepustową. Najsilniejsze uzyskane inhibitory to ASP₄SA (IC_{50} = 13 μ M) oraz AppCF₂ppA (IC_{50} = 9 μ M).

Uzupełnieniem badań nad rolą enzymów z rodziny HIT były badania specyficzności substratowej i regioselektywności hydrolizy dinukleotydów metodą HPLC. Eksperymenty potwierdziły selektywność substratową hDcpS wobec substratów zbudowanych z 7-metyloguaniny. Ciekawe wyniki uzyskano dla ludzkiego Fhit, który hydrolizował wszystkie badane dinukleotydy, ale z różną regioselektywnością. Jednakowoż, wiązanie się z adenozyną było najbardziej preferowane.

W drugiej części rozprawy przedstawiono syntezę oraz zastosowanie jako sond molekularnych fluorofosforanowych analogów oligonukleotydów. Projekt obejmował opracowanie wydajnej syntezy związków znakowanych 5'-fluoro(mono)fosforanem (FPONy) oraz 5'-fluoro(di)fosforanem (FPPONy), które następnie zastosowano jako sondy molekularne w badaniach ¹⁹F NMR. Wykorzystano dwa podejścia syntetyczne, tj. połączenie syntezy na podłożu stałym oraz w roztworze (otrzymanie FPPON-ów) oraz syntezę na podłożu stałym (otrzymanie FPON-ów). Otrzymano 3 analogi znakowane fluoro(mono)fosforanem oraz

15 analogów znakowanych fluoro(di)fosforanem z wydajnościami w zakresie 19-58%, a wszystkie oligonukleotydy scharakteryzowano metodą spektroskopii ^{19}F NMR oraz spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (HRMS). Dwie 10-nukleotydowe sondy, FPON3 oraz FPPON3, wykorzystano do monitorowania powstawania dupleksów DNA oraz identyfikacji pojedynczych niekomplementarności nukleotydowych dzięki subtelny zmianom przesunięć chemicznych sygnałów na widmach ^{19}F NMR. Wyznakowany fluoro(di)fosforanem aptamer związający się w strukturę G-kwadrupleksu (FPPON11) umożliwił obserwację dwóch procesów na widmach ^{19}F NMR, tj. związania i rozwijania się struktury G-kwadrupleksu pod wpływem zmian temperatury oraz monitorowanie oddziaływania pomiędzy aptamerem a białkiem, trombiną. Sekwencje bogate w cytozyny, FPON1, FPPON1 oraz Fp-hTeloC, wykorzystano do monitorowania tworzenia i rozplatania się form nazywanych *i*-motywami. Rejestracja i analiza widm ^{19}F NMR w eksperymentach przy stałym pH, ale różnej temperaturze pozwoliła na wyznaczenie temperatur przejścia pomiędzy nicią pojedynczą a strukturą trzeciorzędową. Natomiast rejestracja i analiza widm ^{19}F NMR w eksperymentach przy stałej temperaturze, ale różnym pH pozwoliła na wyznaczenie wartości pH przejścia pomiędzy nicią pojedynczą DNA a strukturą trzeciorzędową. Fluorowane sondy tworzące *i*-motywy wykorzystano także do monitorowania oddziaływania oligonukleotydu z ligandami. Krótsza sekwencja, FPON1, oddziaływała z kationową porfiryń TMPyP4, natomiast fluorowany oligonukleotyd Fp-hTeloC oddziaływał z mitoksantronem. W obu przypadkach za pomocą metody ^{19}F NMR wyznaczono stałe dysocjacji badanych kompleksów, a uzyskane wartości były zbliżone do literaturowych.

W pracy położono zdecydowany nacisk na zastosowanie fluorowanych oligonukleotydów w badaniach ^{19}F NMR. Zaletą wybranej modyfikacji jest prosta i wydajna synteza chemiczna, w której ugrupowanie fluorofosforanowe wprowadza się postsyntetycznie do struktury oligonukleotydu selektywnie na końcu 5'. Po drugie, wprowadzenie modyfikacji na końcu nici oligonukleotydu spowodowało brak ingerencji w stabilność struktur dupleksów DNA oraz *i*-motywów, a oddziaływania aptamerów z ligandami/białkami zostały zachowane, co jest kluczowe przy projektowaniu wydajnych sond molekularnych.

Badania wykonane metodą ^{19}F NMR obejmowały także zastosowanie trifluorometylowanych nukleotydów jako sond molekularnych do monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznych. Wspomniane sondy umożliwiły śledzenie reakcji enzymatycznych katalizowanych przez trzy różne enzymy i były to: ludzki enzym Fhit, ludzki enzym DcpS oraz ludzka nukleotydaza cNIIIB. Obecność grupy CF_3 w obrębie zasad purynowych (adenina,

guanina) nie przeszkodziła w rozpoznaniu tych związków jako substratów przez hFhit czy hDcpS. Bardzo interesujący wynik uzyskano dla sondy 8-CF₃GMP. Związek ten nie posiada ładunku dodatniego na guaninie (specyficzność substratowa enzymu wynika z dodatniego ładunku na atomie azotu N7), a mimo to okazał się substratem dla enzymu cNIIIB. Metoda ¹⁹F NMR pozwoliła również na monitorowanie reakcji enzymatycznych bez i w obecności inhibitorów, a wyraźne różnice w przesunięciach chemicznych sygnałów substratów i produktów umożliwiły określenie postępu reakcji. Przedstawione rozwiązanie może zostać wykorzystane do opracowania wysokoprzepustowego testu biochemicznego z wykorzystaniem fluorowanych sond (n-FABS) i techniki ¹⁹F NMR do poszukiwania i identyfikacji inhibitorów badanych enzymów.

5. Część eksperymentalna

5.1 Informacje ogólne

5.1.1 Odczynniki chemiczne i rozpuszczalniki

Wszystkie odczynniki zakupiono w Sigma-Aldrich® (Merck) lub ChemPur i użyto bez dodatkowego oczyszczania. Rozpuszczalniki o czystości cz.d.a. zakupiono w POCh i użyto bez osuszania z wyjątkiem DMF i DMSO, które wysuszono nad sitami molekularnymi 4Å. Reagenty i acetonitryl (<30 ppm H₂O) do syntezy oligonukleotydów zakupiono w Merck lub Roth i wykorzystywano bez dodatkowego osuszania. Podłoża CPG do syntezy DNA na podłożu stałym pochodziły z SigmaAldrich®, natomiast podłoża polistyrenowe z GE Healthcare. Amidofosforyny zakupiono w ChemGenes i rozpuszczano w bezwodnym acetonitrylu (<30 ppm H₂O) bezpośrednio przed syntezą (ilość potrzebna do syntezy + 200 µl roztworu do przemycia wężyków). Wodny roztwór wodorowęglanu trietyloamoniowego (TEAB) otrzymywano poprzez nasycenie 1,2 M wodnego roztworu trietyloaminy gazowym CO₂ w temperaturze 4°C przez około 2 doby, do osiągnięcia pH 7,8. Bufory do chromatografii jonowymiennej na złożu Sephadex przygotowywano przez rozcieńczenie 1,2 M buforu TEAB wodą destylowaną. Bufory do HPLC sporządzano z odczynników czystości HPLC firmy J.T.Baker i filtrowano pod zmniejszonym ciśnieniem na sączkach 0,45 µm MF-Millipore™ (bufor A) lub nylonowych (bufory z metanolem lub acetonitrylem).

5.1.2 Metody oczyszczania związków

5.1.2.1 Chromatografia cieczowa (RP-HPLC)

Analizy postępu reakcji chemicznych oraz analizy czystości ostatecznych form otrzymanych związków zostały wykonane na aparatach Agilent Technologies Series 1200 lub Shimadzu LC-40 Series wyposażonych w kolumnę Supelcosil LC-18-T (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) przy przepływie 1,3 ml/min lub kolumnę Gemini NX-C18 110 Å (15 cm x 4,6 mm, 3 µm) przy przepływie 1 ml/min z detekcją UV przy 254 nm oraz detekcją fluorescencyjną (wzbudzenie 280 nm, detekcja 337 nm). Bufor A (0,05 M octan amonu pH 5,9): 3,854 g octanu amonu rozpuszczano w 1 l wody MQ, doprowadzano do pH 5,9 za pomocą 50% kwasu octowego; Bufor B (bufor A + metanol 1:1_{v/v}): sporządzano mieszaninę 1:1_{v/v} metanolu i buforu A. Program dobierano w zależności od polarności badanych związków, im mniej polarny związek tym silniejszy gradient został użyty do jego wymycia z kolumny.

Analizy HPLC wykonywano stosując następujące rodzaje gradientów:

Gradient A: 0 min 100% buforu A, 15 min 50% buforu A i 50 %buforu B,

Gradient B: 0 min 100% buforu A, 15 min 100% buforu B,

Gradient C: 0 min 100% buforu A, 7,5 min 100% buforu B, 15 min 100% buforu B.

Rozdziały półpreparatywne RP-HPLC wykonywano na aparatach Agilent Technologies Series 1200 z kolumną Discovery® RP Amide C16 (25 cm x 21,2 mm, 5 µm) lub Dr. Maisch VisionHT C18 HighLoad (25 cm x 2 cm, 10 µm) przy przepływie 5 ml/min, z detekcją UV przy

254 nm. Stosowano elucję gradientową buforu B' (bufor A + acetonitryl 7:3_{v/v}: sporządzano mieszaninę 7:3_{v/v} acetonitrylu i buforu A) w buforze A (0,05 M octan amonu pH 5,9, jw.). Zebrane frakcje łączono ze sobą, następnie odparowywano na wyparce i kilkakrotnie liofilizowano z wody.

5.1.2.2 Chromatografia jonowymienna

Większość półproduktów oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na anionicie DEAE Sephadex A-25 w formie HCO₃⁻, stosując liniowy gradient buforu TEAB w wodzie. Otrzymany w ten sposób bufor o stężeniu 1,2M przechowywano w 4°C i doprowadzano do pożądanego stężenia poprzez rozcieńczenie wodą dejonizowaną. Proces był półautomatyczny, frakcje były zbierane w ilości po 10 – 20 ml za pomocą automatycznego kolektora, a następnie analizowane spektrofotometrycznie przy 260 nm oraz za pomocą RP HPLC. Wybrane frakcje zawierające produkt łączono ze sobą oraz odparowywano na wyparce do suchej masy, przemywając co najmniej trzykrotnie 96% etanolem, trzykrotnie 99,8% etanolem oraz acetonitrylem aż do uzyskania białego osadu (filmu na kolbie).

5.1.3 Spektrometria mas

Widma masowe rejestrowano na spektrometrach Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos (wysoka rozdzielczość) i Sciex QTRAP 3200 (niska rozdzielczość). Otrzymane wyniki zostały uznane za zgodne z teoretycznymi poprzez obliczenie dokładności pomiaru (ang. mass accuracy) za pomocą równania 5.1. Jeżeli otrzymana wartość jest równa lub niższa od 5 ppm, to wynik pomiaru masy uznano za zgodny z teoretycznie obliczonym⁵.

$$\Delta \frac{m}{z} = \left| \frac{\text{masa zmierzona} - \text{masa obliczona}}{\text{masa obliczona}} \right| * 10^6 \quad (5.1)$$

5.1.4 Obliczanie wydajności reakcji chemicznych

Do obliczenia wydajności reakcji chemicznych używano milijednostek optycznych (mOD), które są zdefiniowane jako iloczyn średniej wartości absorpcji przy 260 nm w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 6,0 lub pH 7,0 oraz całkowitej objętości badanego roztworu. Następnie milijednostki optyczne przekształcano na ilość moli korzystając z molowego współczynnika ekstynkcji (ϵ) wyrażanego w mM⁻¹ cm⁻¹. Podzielenie mOD przez ϵ daje ilość μ moli otrzymanego związku, a z kolei wydajność obliczona została jako iloraz μ moli produktu do substratu pomnożona przez 100. Współczynniki ekstynkcji oligonukleotydów wyznaczono teoretycznie (<http://www.fechem.uzh.ch/MT/links/ext.html>), natomiast wartości dla mono- oraz dinukleotydów zostały zaczerpnięte z literatury i są one następujące:

$\epsilon = 12,08 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – mononukleotydowe pochodne guanozyny(247), $\epsilon = 15,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – mononukleotydowe pochodne adenozy(247), $\epsilon = 11,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – mononukleotydowe pochodne 7-metylo-guanozyny, $\epsilon = 22,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – związki dinukleotydowe zawierające

⁵ https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527334645_c01.pdf

guanozynę i 7-metyloguanozynę(248), $\epsilon = 21,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – związki dinukleotydowe zawierające 7-metyloguanozynę i adenozyne(248), $\epsilon = 27,036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – związki dinukleotydowe zawierające adenozyne.

5.2 Syntezy chemiczne

Niniejsze podrozdziały opisują najważniejsze reakcje chemiczne przeprowadzone w celu otrzymania sond ^{19}F NMR oraz nowych analogów dinukleotydowych jako potencjalnych inhibitorów białka Fhit. Pominęto opisanie reakcji, które od wielu lat stosowane są w chemii nukleotydów oraz oligonukleotydów i uznawane są za „standardowe”, a co za tym idzie są bardzo dobrze opisane w literaturze. Ich ponowne przedstawienie nie wniosłoby niczego istotnego, a jedynie zwiększyłyby objętość niniejszej pracy. Zainteresowanych czytelników odsyłam do literatury (117,170,194,249).

5.3 Syntezy mono- i dinukleotydów

5.3.1 Synteza 5'-jodo adenozyne, **5'IA**

Adenozyne (2,28 g, 8,54 mmol, 1eq) umieszczono w 1000 mL kolbie okrągłodennej i zawieszono w 18 ml pirydyny. Po około 10 minutach dodano 3,3 g jodu (12,81 mmol, 1,5 eq) oraz 3,4 g trifenylofosfiny (12,81 mmol, 1,5 eq). Reakcję intensywnie mieszano przez 5 h w temperaturze pokojowej, a jej postęp monitorowano na RP HPLC (program gradientowy B). Po 5 h do kolby dodano 180 ml wody destylowanej oraz przeprowadzono trzykrotną ekstrakcję octanem etylu (objętości około 200-300 ml). Frakcję wodną oraz frakcję organiczną umieszczono w oddzielnych kolbach i odparowano do sucha na wyparce obrotowej przemywając toluenem w celu pozbycia się nadmiaru pirydyny. Po odparowaniu frakcji wodnej powstał intensywny pomarańczowy osad, który okazał się mieszaniną produktu, pirydyny oraz tlenu trifenylofosfiny. Po odparowaniu frakcji organicznej otrzymano biały, sypki osad, który po analizie HPLC oraz MS był pożądanym produktem. Frakcję wodną odrzucono. Z frakcji organicznej otrzymano 3,75 g produktu (3,5 mmol, 14,03 mOD/mg, 41%).

HRMS (ESI⁺) Teor. m/z dla $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{IN}_5\text{O}_3^+$ [M+H]⁺ 378,00576, zarejstr. 378,00608

5.3.2 Synteza 5'-fosforanu 5'-deoxy-5'-tioadenozyne, **ASp**

Wodny roztwór soli trietyloamoniowej tiofosforanu (2,65 mmol, 33 ml, ~3 ekwiw.) umieszczono w 250 ml kolbie okrągłodennej i odparowano do sucha, przemywając jednokrotnie acetonitrylem. Następnie do kolby dodano 10 ml bezwodnego DMF oraz wsypało 1 g 5'IA (0,93 mmol, 14030 mOD, 1 ekwiw) i intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji kontrolowano na HPLC, w trakcie której dodawano małymi porcjami (50 µl) wodny roztwór 5% NaOH w celu jej przyspieszenia. Reakcję zakończono po 24h poprzez dodanie 100 ml wody dejonizowanej oraz wykonano trzykrotną ekstrakcję octanem etylu. Zachowano warstwę wodną, a resztkowy octanu etylu odparowano na wyparce. Związek wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex w liniowym gradiencie buforu 0,8 M TEAB. Frakcje zawierające produkt połączono razem, otrzymując 3255

mOD produktu (0,22 mmol, 24%). Roztworu nie odparowano do sucha, ale podzielono na porcje. Przechowywano w -80°C .

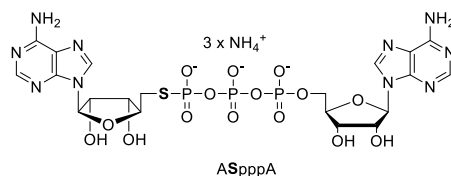
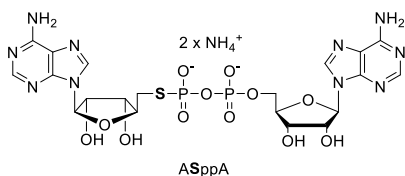
HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{PS}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 362,00329, zarejstr. 362,03322

5.3.3 Synteza imidazolidu 5'-fosforanu 5'-deoxy-5'-tioadenozyny, **ASp-Im**

Wodny roztwór ASp (1617 mOD, 0,108 mmol, 1 ekwiw.) przeniesiono do 100 ml kolby okrągłodennej i odparowano do sucha, przemywając jednokrotnie 96% etanolem i jednokrotnie acetonitrylem. Do kolby dodano 5 ml bezwodnego DMF oraz 60 μl trietyloaminy (4 ekwiw.). Po rozpuszczeniu ASp do kolby dodano imidazol (1,08 mmol, 10 ekwiw.), 2,2'-DTDP (0,324 mmol, 3 ekwiw.) oraz trifenylofosfinę (0,324 mmol, 3 ekwiw.). Reakcję intensywnie mieszano przez 3h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie produkt wytrącono zimnym roztworem LiClO_4 (0,432 mmol, 4 eq) w acetonitrylu (50 ml). Osad odwirowano i wysuszono nad P_2O_5 . Po zważeniu utrzymo 34 mg białego proszku (28,60 mOD/mg, 972 mOD, 0,065 mmol, 60%).

MS (ESI⁻) Teor. m/z dla $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_5\text{PS}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 412,1, zarejstr. 412,2

5.3.4 Synteza P1-(5'-deoksy-5'-tioadenozyno)-P2-(5'-adenozyno) difosforanu, **ASppA** oraz P1-(5'-deoksy-5'-tioadenozyno)-P3-(5'-adenozyno) trifosforanu, **ASpppA**



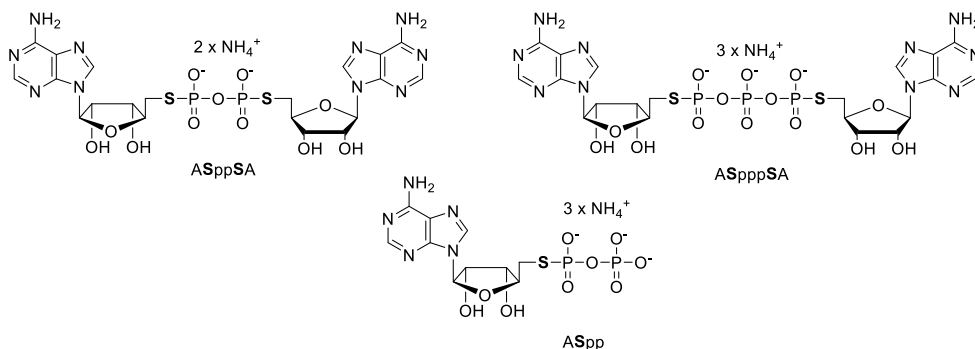
Sól litową ASp-Im (9,8 mg, 11,1 μmol , 167,1 mOD, 1 ekwiw.) zawieszono w 1 mL DMSO, a następnie dodano sól trietyloamoniową 5'-monofosforanu adenzyny (6 mg, 11,1 μmol , 1 ekwiw.) wraz z chlorkiem magnezu (8,5 mg, 88,8 μmol , 8 ekwiw.). Reakcję intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowano za pomocą HPLC (program gradientowy B) oraz pomiarów za pomocą spektrometru mas. Po 48 h reakcję rozcieńczono 10 ml wody dejonizowanej. Produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex w liniowym gradiencie buforu 1,0 M TEAB. Zebrane frakcje oczyszczono na HPLC preparatywnym. Ostatecznie otrzymano w postaci soli amonowych ASpppA (0,66 mg, 0,968 μmol 26,18 mOD, 8,7%) oraz ASppA (1,16 mg, 0,836 μmol , 22,6 mOD, 7,5%).

ASppA ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.37 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 6.02 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.70 – 4.65 (m, 1H), 4.62 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.49 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.44 – 4.38 (m, 4H), 4.36 – 4.25 (m, 2H), 3.39 – 3.21 (m, 2H). ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) δ 7.76 – 6.94 (m, 1P), -11.54 – -12.30 (m, 1P). HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{P}_2\text{S}^{1-}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 691,08548, zarejstr. 691,08592

ASpppA ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.46 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.25 (s, 2H), 6.04 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 5.97 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.78 (nałożone z HDO, 1H), 4.73 – 4.67 (m, 1H), 4.59 – 4.53 (m,

1H), 4.52 – 4.47 (m, 1H), 4.45 – 4.41 (m, 1H), 4.41 – 4.38 (m, 1H), 4.36 – 4.26 (m, 2H), 3.42 – 3.26 (m, 2H). ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) δ 9.55 – 4.60 (m, 1P), -10.29 – -12.66 (m, 1P), -22.35 – -24.89 (m, 1P). HRMS (ESI $^-$) Teor. m/z dla $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 771,05181, zarejestr. 771,05258

5.3.5 Synteza P1,P3-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno) trifosforanu, **ASpppSA** oraz 5'-difosfotiotolanu adenozy, **ASpp** i P1,P2-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno) difosforanu, **ASppSA** jako produktów ubocznych



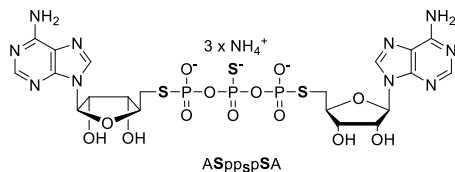
Sól litową ASp-Im (15 mg, 30 μmol , 165 mOD, 1 ekwiw.) zawieszono w 1,5 mL DMSO, a następnie dodano sól trietyloamoniową fosforanu (7,5 mg, 0,03 mmol, 1 ekwiw.) wraz z chlorkiem magnezu (34 mg, 0,36 mmol, 12 ekwiw.). Reakcję intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowano za pomocą HPLC (program gradientowy B) oraz pomiarów za pomocą spektrometru mas. Po 48 h reakcję rozcieńczono 15 ml wody dejonizowanej. Produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex w liniowym gradiencie buforu 1,0 M TEAB. Zebrane frakcje oczyszczono na HPLC preparatywnym. Ostatecznie otrzymano w postaci soli amonowych ASpp (0,68 mg, 2,4 μmol , 36 mOD, 8%), ASppSA (0,28 mg, 0,55 μmol , 15 mOD, 1,9%) oraz ASpppSA (0,82 mg, 1,22 μmol , 33 mOD, 4%).

ASpp ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.46 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 6.11 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.88 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.53 (t, $J = 5.8$, 3.5 Hz, 1H), 4.45 (dt, $J = 4.8$, 3.5 Hz, 1H), 3.30 (ddd, $J = 13.0$, 11.8, 4.8 Hz, 1H), 3.23 (ddd, $J = 13.0$, 11.8, 4.6 Hz, 1H). ^{31}P NMR (202 MHz D_2O) δ 8.58 (dt, $J = 28.3$, 13.2 Hz, 1P), -10.38 (d, $J = 28.3$ Hz, 1P). HRMS (ESI $^-$) Teor. m/z dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^{1-}$ [M-H] $^-$ 441,99290, zarejestr. 441,99970

ASppSA ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.27 – 8.24 (s, 2H), 8.18 – 8.15 (s, 2H), 5.98 (dt, $J = 5.4$, 2H), 4.71 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.48 – 4.40 (m, 4H), 3.43 – 3.29 (m, 4H). ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) δ 8.00 – 7.84 (m, 2P). HRMS (ESI $^-$) Teor. m/z dla $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{P}_2\text{S}_2^{1-}$ [M-H] $^-$ 707,06264, zarejestr. 707,06323

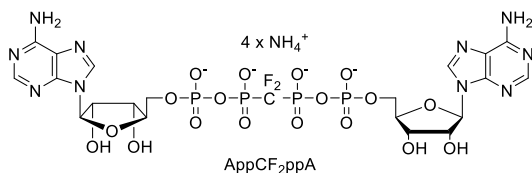
ASpppSA ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.30 (s, 2H), 8.22 (s, 2H), 5.97 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 4.76 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 4.50 (dd, $J = 5.5$, 3.3 Hz, 2H), 4.47 – 4.40 (m, 2H), 3.44 – 3.27 (m, 4H). ^{31}P NMR

ASp₅SA ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.42 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 6.03 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.55 (dd, J = 5.6, 4.6 Hz, 2H), 4.51 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 4.48 – 4.40 (m, 2H), 3.44 – 3.27 (m, 4H). ³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ 9.71 – 8.94 (m, 2P), -21.06 – -21.96 (m, 1P), -22.37 (dd, J = 25.4, 14.6 Hz, 2P). ³¹P NMR CPD (202 MHz, D₂O) δ 9.26 (d, J = 25.4 Hz, 1P), -21.49 – -21.75 (m, 1P), -22.37 (dd, J = 25.4, 14.6 Hz, 2P). MS (ESI⁺) Teor. m/z dla C₂₀H₂₈N₁₀O₂₀P₅S₂¹⁻ [M-H]⁻ 946,9, zarejestr. 946,9

5.3.7 Synteza P1,P3-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno)-P3-tiotrifosforanu, **ASppspSA**

Wodny roztwór soli trietyloamoniowej tiofosforanu (135 μ l, 0.01 mmol, 1 ekwiw.) umieszczono w 25 ml kolbie okrągłodennej i odparowano do sucha, przemywając jednokrotnie 96% etanolem i acetonitrylem. Następnie, do kolby dodano 0,5 ml bezwodnego DMF, chlorku magnezu (15,2 mg, 0,016 mmol, 8 ekwiw.) oraz soli litowej Asp-Im (253 mOD, 0,017 mmol, 2 ekwiw.). Reakcję intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowano za pomocą HPLC (program gradientowy B). Po 90 minutach do reakcji dodano porcję soli trietyloamoniowej tiofosforanu (3 μ mol) zawieszoną w 400 μ l DMF. Reakcję prowadzono do całkowitego zaniku Asp-Im i rozcieńczono 11 ml wody dejonizowanej. Produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex w liniowym gradiencie buforu 1,0 M buforu TEAB oraz oczyszczono na preparatywnym HPLC. Ostatecznie otrzymano 91,4 mOD produktu (3,4 μ mol, 20%).

ASppspSA ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.29 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.18 (2, 1H), 5.96 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.75 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 4.53 – 4.50 (m, 2H), 4.46 – 4.42 (m, 2H), 3.44 – 3.32 (m, 4H). ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) δ 29.45 (t, J = 34.4 Hz, 1P), 8.55 – 7.81 (m, 2P). HRMS (ESI $^-$) Teor. m/z dla $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}_3$ $^-$ [M-H] $^-$ 803,00613, zarejestr. 803,00679

5.3.8 Synteza P1,P4-di(5'-adenozyno)-2,3-difluorometyleno tetrafosforanu, **AppCF₂ppA**

Sól trietyloamoniową difluorometyleno(bis)fosfonianu (250) (pCF₂p, 20 mg, 0,046 mmol, 1 ekwiw.) zawieszono w 0,5 ml bezwodnego DMSO, a następnie dodano imidazolidu 5'-monofosforanu adenozy (AMP-Im, 63,3 mg, 0,126 mmol, 1899 mOD, 4 ekwiw.) oraz chlorku cynku (ZnCl_2 , 63,3 mg, 0,46, 10 ekwiw.) i intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej przez około 5h. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą HPLC (program gradientowy A). Reakcję zakończono poprzez jej 10-krotne rozcieńczenie wodnym roztworem EDTA (171 mg, 0,46 mmol) / NaHCO_3 (85 mg). Produkt wyizolowano za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex w liniowym gradiencie buforu 1,2 M buforu TEAB oraz oczyszczono na preparatywnym HPLC. Ostatecznie otrzymano 554 mOD produktu (0,020 mmol, 16%).

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.50 (s, 2H), 8.23 (s, 2H), 6.00 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.47 (t, J = 4.3 Hz, 2H), 4.45 – 4.41 (m, 2H), 4.38 – 4.23 (m, 4H). ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) δ -5.21 (t, J =

81.1 Hz, 2P), -9.72 (t, $J = 14.5$ Hz, 2P). ^{19}F NMR (471 MHz, D_2O) δ -120.71 (szeroki singlet, 2F). HRMS (ESI $^-$) Teor. m/z dla $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_{10}\text{O}_{18}\text{P}_4^{1-}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 869,04288, zarejestr. 869,04394

5.4 Synteza oligonukleotydów

5.4.1 Synteza deoksurybonukleotydów (ONy) i ich 5'-fosforanów

Deoksurybonukleotydy (ON1, ON3-ON5, ON9, ON11, ON20-ON25, hTeloC oraz PON11) zostały otrzymane w skali 2-5 μmol za pomocą automatycznego syntetyzera do DNA/RNA (AKTA oligopilot 10 plus, GE Healthcare) wyposażonego w kolumnę wypełnioną podłożem stałym przeznaczonym do syntezy DNA, takim jak PrimerSupportTM 200 T 80s (82 $\mu\text{mol/g}$), dA 80s (79 $\mu\text{mol/g}$), dG 80s (78 $\mu\text{mol/g}$), dC 80s (84 $\mu\text{mol/g}$) lub PrimerSupportTM 5G dC (360 $\mu\text{mol/g}$). Na etapie sprzęgania (ang. *coupling step*) 10 ekwiwalentów 0.1 M amidofosforynu (DMT-dG(dmf), DMT-dC(N-acetyl), DMT-dA(N-bz), oraz DMT-T zakupionych z ChemGenes) rozpuszczonego w acetonitrylu, zmieszano z 0.3 M aktywatorem BTT i przepuszczano przez kolumnę przez 5 minut. Jeżeli to było wymagane, 5'-fosforylację oligonukleotydów przeprowadzano na podłożu stałym przy pomocy mieszaniny 0,1 M odczynnika fosforylującego (ang. *bis(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite* (Sigma-Aldrich)), który po zmieszaniu z 0,3 M aktywatorem BTT w acetonitrylu został przepuszczany przez kolumnę przez 5 minut. Do detrytylacji wykorzystano roztwór 3% (v/v) kwasu dichlorooctowego w toluenie, a utlenianie zachodziło pod wpływem 0,05 M roztworu jodu w pirydynie. Jako Cap A zastosowano 20% roztwór (v/v) N-metyloimidazolu w acetonitrylu, natomiast na Cap B składała się mieszanina 40% roztwór (v/v) bezwodnika octowego oraz 40% (v/v) pirydyny w acetonitrylu. Grupy 2-cyanoetylowe zostały usunięte za pomocą 20% roztworu dietyloaminy w acetonitrylu (v/v) w ostatnim cyklu syntezy na podłożu stałym. Ostatecznie podłoże stałe zostało przemyte acetonitrylem oraz wysuszone strumieniem argonu. Oligonukleotyd odcięto od złoża wraz z hydrolizą grupą ochronnych na skutek intensywnego mieszania w 40°C przez 2h w roztworze 1:1 (v/v) 30% amoniaku i 40% wodnego roztworu metyloaminy. Ostatecznie roztwór został przefiltrowany, a osad przemyty kilkukrotnie wodą destylowaną. Połączone filtry odparowano i zliofilizowano. Związki przeznaczone do badań biofizycznych, a nie dalszych syntez oczyszczano tak, jak to zostało opisane w podrozdziale 5.1.2.1.

5.4.2 Synteza 5'-fluoro(mono)fosforanów deoksurybonukleotydów (FPONy)

Synteza sond molekularnych zawierających ugrupowanie 5'-fluoro(mono)fosforanowe (FPON1, FPON3 oraz FP-hTeloC). Grupa 5'-OH oligonukleotydu (skala syntez 5-20 μmol), wciąż związanego z podłożem stałym, została przereagowana z roztworem H-fosfonianu difenylu (0,1-0,2 M) w bezwodnej pirydynie (4 mL) w czasie 2h. Następnie złoże przemywano kolejno acetonitrylem oraz 0,1 M roztworem węglanu trietyloaminy o pH 8,0 (TEAB) otrzymując tym samym oligonukleotyd ze stabilną grupą 5'-H-fosfonianową. W kolejnym kroku przemyte acetonitrylem i wysuszone podłoże stałe zostało przereagowane z roztworem BSA (ang. *N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide*) (0,4 mL, 1,64 mmol), imidazolu (136 mg, 2 mmol), CCl_4 (0,75 mL), acetonitrylu (0,75 mL) oraz trietyloaminy (0,1 mL) przez 4h, i następnie przemyte

acetonitrylem i wysuszone argonem. Otrzymana tak aktywowana imidazolem podjednostka oligonukleotydu została przereagowana z roztworem fluorku tetrabutylamonowego (1,0 M TBAF w THF) (0,2 mL, 0,2 mmol) w dimetylosulfotlenku (DMSO) (3 mL) w obecności chlorku cynku (10 mg, 0,07 mmol). Po 2 godzinach podłoże stałe zostało przemyte wodnym roztworem kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) (10 mg/mL) oraz wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) (5 mg/mL), a następnie przemyte acetonitrylem i wysuszone argonem. Ostatecznie oligonukleotyd odcięto od podłoża stałego roztworem AMA, tak jak to zostało opisane powyżej. W przypadku sondy FPON1 oraz FP-hTeloC konieczne było powtórzenie ostatniego etapu syntezy ale już w roztworze. Oligonukleotydy rozpuszczano w DMSO wraz z dodatkiem TBAF (0,2 mL, 0,2 mmol) i ZnCl_2 (10 mg, 0,07 mmol) i pozostawiano na noc do pełnego przekształcenia P-imidazolidu w fluorofosforan, a reakcję zakańczano dodatkiem wodnego roztworu EDTA/ NaHCO_3 . FPONy oczyszczano tak, jak to zostało opisane w podrozdziale 5.1.2.1.

5.4.3 Synteza 5'-fluoro(di)fosforanów deoksyrybonukleotydów (FPPONy)

Synteza sond molekularnych zawierających ugrupowanie 5'-fluoro(di)fosforanowe (wszystkie związki z oznaczeniem FPP) wyglądała następująco: zliofilizowany oligonukleotyd zawierający grupę 5'-fosforanową został zwilżony bardzo niewielką ilością wody destylowanej (5-10 μL), następnie zawieszony w DMSO (0,2-0,5 mL) oraz przereagowany z solą litową imidazolowej pochodnej fluorofosforanu (FP-Im, 20-30 ekwiwalentów) w obecności chlorku magnezu (20-30 ekwiwalentów) przez okres od 6 do 24 godzin. Reakcję kontrolowano za pomocą HPLC w odwróconej fazie oraz pomiarów za pomocą spektrometru mas w jonizacją typu elektrosprej (ESI) oraz zakończono, rozcieńczając dziesięciokrotnie wodą. FPPONy oczyszczano tak jak to zostało opisane w podrozdziale 5.1.2.1.

5.5 Przygotowanie oligonukleotydów do pomiarów NMR oraz UV/VIS

Roztwór wyjściowy danego oligonukleotydu przygotowywano poprzez rozpuszczenie go w 100-200 μL wody destylowanej do stężenia z zakresu 2-10 mM. Dokładne stężenia związków (FPON1, FPPON1, FPON3, FPPON3, FP-hTeloC, ON1, ON3-ON5, ON9, ON11, ON20-ON25, hTeloC oraz PON11) zostały wyznaczone spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji roztworu przy 260 nm. Pomiar wykonywano w buforze fosforanowym o pH 7,0, a do obliczeń wykorzystano wyznaczone teoretycznie molowe współczynniki ekstynkcji. Następnie, wybrany oligonukleotyd został rozcieńczony do wybranego stężenia w buforze pomiarowym, wybranym w zależności od typu przeprowadzanego eksperymentu: bufor do badań hybrydyzacji dupleksów DNA (20 mM fosforan sodu, 0,15 M NaCl, 0,2 mM sól disodowa EDTA, pH 7,0, 10% D_2O), bufor do badań struktur *i*-motywów (50 mM cytrynian sodu, pH 4,2, 10% D_2O lub 50 mM kakodylan sodu, 100 mM NaCl, 10% D_2O , pH 6,4) oraz bufor do badań G-kwadrupleksów (10 mM KH_2PO_4 , 70 mM KCl, 0,2 mM sól disodowa EDTA, pH 7,0, 10% D_2O).

5.6 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Wszystkie pomiary zostały wykonane na spektrometrze Bruker Avance III HD 500 MHz wyposażonym w szerokopasmową sondę wielojądrową (ang. *broad-band multinuclear*) PABBO

BB/19F-1H/D Z-GRD. Do pomiarów wykorzystano próbówki wykonane ze szkła kategorii A o średnicy 5 mm przystosowane do precyzyjnych pomiarów (Norell Select Series 500 MHz lub Wilmad precision 500 MHz). Typowa objętość badanego roztworu wynosiła 550 μL .

5.6.1 Spektroskopia NMR jąder ^1H

Widma z detekcją rezonansów jąder ^1H zostały zarejestrowane przy częstotliwości 500,24 MHz. Jeżeli to było wymagane (np. rejestracja próbek zawieszonych w 90% H_2O /10% D_2O) widma z supresją wody rejestrowano, stosując gradientową sekwencję pulsów 3-9-19 (WATERGATE) (251,252). Przesunięcia chemiczne zostały odniesione do TSP (ang. 3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionate, $\delta_{\text{H}} = 0$ ppm).

5.6.2 Spektroskopia NMR jąder ^{19}F

Widma z detekcją rezonansów jąder ^{19}F zostały zarejestrowane przy częstotliwości 470,67 MHz. Do pomiarów użyto standardową sekwencję pulsów (zgflqn), a przykładowe parametry są następujące: długość pulsu wzbudzenia 15 μs , czas akwizycji 1,19 s, liczba skanów 512-4096 i więcej w zależności od typu eksperymentu i stężenia próbki. Przesunięcia chemiczne zostały odniesione do 10 mM NaF rozpuszczonego w D_2O ($\delta_{\text{F}} = -121,5$ ppm) lub 2,2,2-trifluoroetanolu ($\delta_{\text{F}} = -76,0$ ppm). Temperatura pomiaru wynosiła 25°C, a w przypadku eksperymentów z jej zmianą, mających na celu wyznaczenie temperatur mięknienia, pomiar rozpoczynano od możliwie najniższej temperatury (22°C lub 25°C), którą zmieniano w kroku co 5°C/pomiar (lub niższym jeżeli wskazano), a inkubacja przed rejestracją widma ^{19}F NMR wynosiła co najmniej 5 minut (od momentu ustabilizowania się temperatury aparatu NMR wraz z próbką NMR wpuszczoną do środka magnesu).

5.6.2.1 Badania tworzenia się dupleksów DNA oraz identyfikacja niekomplementarności

Wodne 10 mM roztwory oligonukleotydów FPON3 oraz FPPON3 zostały rozcieńczone do stężeń 0,1-0,2 mM w buforze do badań hybrydyzacji DNA. Do tak przygotowanego roztworu sondy molekularnej dodawano małymi porcjami oligonukleotydy komplementarne lub posiadające jedną zasadę azotową niesparowaną. Przed zarejestrowaniem widma ^{19}F NMR próbka była inkubowana w 90°C przez 3 minuty, a następnie chłodzona na lodzie. Pomiar widma odbywał się w temperaturze 23°C, w której badane dupleksy były wystarczająco stabilne.

5.6.2.2 G-kwadrupleksy i oddziaływanie z trombiną

Oligonukleotyd FPON11 o stężeniu 2,5 mM rozcieńczono w buforze do badania G-kwadrupleksów do stężenia 70 μM . Przed pomiarem NMR próbówka została ogrzana do 90°C, a następnie schłodzona na lodzie. Trombina (THPH1) z osocza bydlęcego została zakupiona w SigmaAldrich® (T4648-1KU) jako zliofilizowany proszek. Przed eksperymentami THPH1 została zawieszona w wodzie do stężenia 10 mg/mL (137 μM), a tak przygotowany roztwór wykorzystano do miareczkowania w badaniach monitorowania oddziaływania pomiędzy FPPON11 a białkiem.

5.6.2.3 Struktury *i*-motyw i oddziaływania z ligandami

Oligonukleotydy FPON1, FPPON1 oraz FP-hTeloC rozpuszczono w wodzie destylowanej do stężenia 5-8 mM oraz rozcieńczono do stężeń 0,1-0,5 mM w buforze do badań struktur *i*-motyw. Jeżeli to było konieczne wartość pH ustalano w 1,5 mL probówkach Eppendorfa za pomocą szklanej mikroelektrody chlorosrebrowej (Hanna Instruments) podłączonej do wykalibrowanego pH-metru. Wartość pH zmieniano za pomocą 0,1 M roztworów NaOH/KOH lub 0,1 M HCl. W pomiarach ze zmianą pH temperatura była ustalona na 25°C. W pomiarach w stałym pH, ale ze zmianą temperatury badana próbówka była inkubowana co najmniej 10 minut w środku magnesu zanim rozpoczęto pomiar widma. Dichlorek mitoksantronu oraz kationowa porfiryra (TMPyP4) zostały zakupione w SigmaAldrich® jako liofilizaty. Oba ligandy zostały rozpuszczone w wodzie do stężenia 10 mM oraz zostały wykorzystane w badaniach oddziaływania pomiędzy oligonukleotydami a ligandami. 5'-Fluorofosforan adenozy (AMPF) został wykorzystany jako kontrola negatywna w badaniach z ligandami. AMPF został otrzymany tak jak to zostało opisane w literaturze (Baranowski et al. (117)) oraz rozpuszczony w wodzie destylowanej do stężenia 10 mM. Do wyznaczenia stałej dysocjacji wykorzystano model ang. *one-site-specific binding*, który dopasowano do danych używając programu GraphPad Prism 8.3:

$$\Delta\delta_{ppm} = \frac{\Delta\delta_{ppm}^{max} * C_M}{K_d + C_M}$$

gdzie $\Delta\delta_{ppm}$ reprezentuje obserwowaną zmianę przesunięcia chemicznego w odniesieniu do przesunięcia chemicznego na widmie bez liganda, C_M to stężenie dodanego liganda (mitoksantron lub TMPyP4 w μM), $\Delta\delta_{ppm}^{max}$ to maksymalna zmiana przesunięcia chemicznego ekstrapolowana do saturujących stężeń liganda, K_d to stała dysocjacji.

5.6.2.4 Trifluorometylowane sondy molekularne – badania enzymatyczne

Przygotowanie roztworów wyjściowych: sondy molekularne: F6, F20, F23, F25, F26, F27 i F28 zostały rozpuszczone w wodzie (200 – 300 μL), a stężenie wyznaczono spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji w 260 nm w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0 (dla związków F6 oraz F28) lub 7,0 (związki F23, F25, F26, F27). Stężenie molowe obliczono stosując następujące molowe współczynniki ekstynkcji [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]: $\epsilon = 11400$ (F6, F13, F20), $\epsilon = 15020$ (F23), $\epsilon = 27036$ (F25, F26), $\epsilon = 22600$ (F27) i $\epsilon = 21132$ (F28).

Przygotowanie próbek do badań enzymatycznych: do badań z enzymem ludzkim Fhit związki F26 oraz F27 zostały rozcieńczone w buforze reakcyjnym zawierającym 50 mM MES-KOH pH 6,5, 1 mM MgCl_2 , 10% D_2O do stężenia 100 μM . Do badań z ludzkim enzymem DcpS związek F28 został rozcieńczony w buforze 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 M KCl, 0,5 mM EDTA oraz 10% D_2O do stężenia 100 μM . Do badań z ludzkim enzymem cNIIIB związek F6 został rozcieńczony w buforze 20 mM Hepes-KOH pH 7,5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 oraz 10% D_2O do stężenia 100 μM . RG3039 został zakupiony z KareBay Biochem. Inhibitor ludzkiego enzymu Fhit (IN-A, 7,8-dihydro-7,7-dimetylo-10-(4-chlorofenylo)-5H-indeno[1,2-b]chinolino-9,11(6H,10H)-dion) został otrzymany przez dr. Mikołaja Chromińskiego zgodnie z procedurą opisaną w literaturze

(253). Inhibitory RG3039 oraz IN-A zostały rozpuszczone w DMSO, a stężenie wyznaczono z naważki. W eksperymentach bez inhibitorów stosowano dodatek DMSO (0,3-0,5%, v/v), aby zachować takie same warunki we wszystkich reakcjach enzymatycznych, które prowadzono w temperaturze 30°C.

Eksperymenty ^{19}F NMR: Do zarejestrowania widm ^{19}F NMR użyto standardowej sekwencji pulsów oraz parametrów tak jak opisano w podrozdziale 5.6.2. Wybraną sondę molekularną rozpuszczono w buforze, a następnie wypełnioną probówkę NMR umieszczano w magnesie NMR i inkubowano w temperaturze 30°C przez 5 minut. Po tym czasie przygotowywano spektrometr do wykonania pomiarów (lock, tune oraz shim) oraz rejestrowano 32 skany. Następnie ciecz z probówki NMR przeniesiono do probówki eppendorfa, dodawano enzym, delikatnie mieszano oraz przenoszono roztwór z powrotem do probówki NMR, która jak najszybciej umieszczano w magnesie. Pomiar kinetyczny wykonywano stosując komendę multi_zgvd, gdzie każdy pomiar zawierał 32 skany, a przerwa pomiędzy pomiarami trwała 120 sekund. Wykonywano co najmniej 14 eksperymentów.

5.6.3 Spektroskopia NMR jąder ^{31}P

Widma z detekcją jąder ^{31}P zostały zarejestrowane przy częstotliwości 202,51 MHz. Przesunięcia chemiczne zostały odniesione do 20% kwasu fosforowego ($\delta_{\text{P}} = 0$ ppm). Do zarejestrowania widm ^{31}P NMR stosowano standardową sekwencję pulsów (zgpg30) z następującymi przykładowymi parametrami: liczba skanów 32-256, wielkość fidu 65536 punktów, szerokość widma 402 ppm, rozdzielczość widma 2,48 Hz, szerokość pulsu 14 μsec , moc 44 W.

5.7 Pomiary UV/VIS struktur drugorzędowych oligonukleotydów

Oligonukleotydy wykorzystanie w badaniach tworzenia się dupleksów DNA (FPON3, FPPON3, ON3-ON5, ON9 oraz ON20-ON25) rozcieńczono do 2 μM w odpowiednim buforze fosforanowym (20 mM fosforan sodu, 0,15 M NaCl, 0,2 mM sól disodowa EDTA, pH 7,0, 10% D_2O) oraz zmieszano ze sobą w stosunku 1:1 (końcowe stężenie 2 μM każdego z badanych oligonukleotydów). W badaniach tworzenia się G-kwadrupleksów oligonukleotydy FPPON11, PON11 oraz ON11 zostały rozcieńczone w buforze (10 mM KH_2PO_4 , 70 mM KCl, 0,2 mM sól disodowa EDTA, pH 7,0, 10% D_2O) do stężenia 4 μM . W badaniach sekwencji *i*-motyw oligonukleotydy ON1, FPON1, FPPON1, hTeloC oraz FP-hTeloC zostały rozcieńczone w buforze (50 mM cytrynian sodu, pH 4,2 lub 5,5, 10% D_2O) do stężenia 12 μM . Pomiary temperatur mięknienia wykonano w kuwetach kwarcowych o rozmiarze 1 x 1 cm, a całkowita objętość próbki wynosiła 2 ml. W badaniach wykorzystano spektrofotometr UV-VIS Thermo Scientific Evolution 350 wyposażony w termostatowany 8-pozycyjny system Peltiera oraz sondę temperaturową. Pomiary wykonywano w zakresie temperatur od 10°C do 90°C ze skokiem 1 °C/min. Tworzenie się dupleksów monitorowano przy 260 nm, natomiast struktur *i*-motyw oraz G-kwadrupleksów przy 295 nm lub/i 260 nm. Wszystkie pomiary wykonano trzykrotnie.

5.8 Wyznaczenie temperatur mięknienia oraz pH przejścia oligonukleotydów

Analiza danych uzyskanych metodą ^{19}F NMR odbyła się poprzez integrację dwóch składowych sygnałów oraz obliczenie ich średnich wraz ze średnim odchyleniem standardowym, a następnie normalizację (wartość 100 odpowiadająca największej uzyskanej integracji oraz wartość 0 dla najmniejszej uzyskanej integracji). Absorbancja uzyskana metoda UV/VIS została znormalizowana (wartość 1 odpowiadająca największej uzyskanej absorbancji oraz wartość 0 dla najmniejszej uzyskanej integracji). Wartości temperatur mięknienia (T_m) oraz pH przejścia (pH_T) obliczono w programie GraphPad Prism 8.3 dopasowując do uzyskanych danych krzywą o następującym równaniu:

$$A \text{ lub } I = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + e^{\frac{V50-x}{\text{slope}}}}$$

gdzie znormalizowana absorbancja (A) lub integracja sygnałów ^{19}F NMR (I) przyjmuje wartości maksymalne (Top) lub minimalne (Bottom), a uzyskany z dopasowania wynik V50 to T_m lub pH_T .

5.9 Wysokoprzepustowa metoda przesiewowa (HTS) oraz badania HPLC

W eksperymentach wykorzystywano czarne 96-dołkowe płytki przeznaczone do pomiarów fluoescencyjnych oraz oznaczone jako „non-binding”. Do pipetowania używano 8-kanałowych pipet firmy Eppendorf z serii Eppendorf Reference® 2. Płytki inkubowano w termomikserze typu Biosan PST-60HL-4, który umożliwiał wytrząsanie orbitalne oraz termostatowanie. Odczyt fluoescencji wykonywano na aparacie Tecan Infinite 200PRO (wyniki opublikowane w *Organic&Biomolecular Chemistry* (192)) lub BioTek Synergy H1 (pozostałe przedstawione wyniki), ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) w temperaturze 30°C .

5.9.1 Bufory

W trakcie wykonywania badań HTS wykorzystywano następujące bufor:

Bufor hFhit oraz AtFhit (B1): 50 mM MES·KOH, pH 6,5, 5 mM CaCl_2 , 0,75 mg/mL BSA,

Bufor DcpS (B2): 50 mM Tris·HCl, pH 7,6, 200 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,75 mg/mL BSA,

Bufor FTBS (B3): 60 mM Tris·HCl, pH 7,6, 0,6 mM EDTA, 240 mM KCl.

5.9.2 Biblioteki związków BZ-1 oraz BZ-2

Związki otrzymane w postaci soli sodowych lub amonowych rozpuszczano w wodzie dejonizowanej lub DMSO (około $1 \text{ mg} / 100 \mu\text{L}$), a stężenie wyznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji w 260 nm, w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0 (dla mononukleotydów zawierających 7-metyloguaninę) lub w pH 7,0 dla pozostałych (oligo)nukleotydów. Stężenie obliczano na podstawie uzyskanych wartości absorbancji oraz molowych współczynników ekstynkcji. Biblioteki związków kompletowano i przechowywano w głębokich płytkach 96-dołkowych (w liczbie 80 związków na jednej płytce) w stężeniu 5 mM,

rozcieńczając roztwory wyjściowe w wodzie. Płytki przechowywano w temperaturze -20°C . Po każdym rozmrożeniu płytkę inkubowano z mieszaniem w 30°C przez 5-10 minut, a następnie odwirowywano w celu pozbycia się bąbelków powietrza oraz osadzenia się całości roztworu na dnie studzienki.

5.9.3 Przygotowanie sond fluorowych oraz sondy fluorogenicznej

Fluorofosforanowe analogi mononukleotydów (AMPF, $m^7\text{GMPF}$) oraz sonda fluorogeniczna, eter di-*tert*-butylodimetylosilylo fluoresceiny (TBDMS-FL) zostały przygotowane tak jak o zostało opisane w literaturze (117,192). Roztwory wyjściowe AMPF oraz $m^7\text{GMPF}$ zostały przygotowane poprzez rozpuszczenie 2-4 mg związku w wodzie destylowanej, a następnie stężenie zostało wyznaczone spektrofotometrycznie na podstawie wartości absorbancji w 260 nm oraz za pomocą współczynnika ekstynkcji (patrz rozdział 5.1.3). Roztwór FTBS był przygotowywany przed każdym pomiarem w następujący sposób: 3 mg sondy FTBS (5,68 μmol) rozpuszczano w 50 μL octanu etylu i natychmiast dodawano 5 mL roztworu DMSO oraz buforu B3 w stosunku objętościowym 9:1. Następnie 50 μL roztworu rozcieńczano poprzez dodanie 10 mL wyżej wspomnianej mieszaniny DMSO i B3. Ostateczne stężenie FTBS to 5,7 μM .

5.9.4 Wyznaczenie parametru Z'

Zakwalifikowanie opracowanej metody badawczej jako wysokoprzepustowej było możliwe dzięki wyznaczeniu parametru Z' (193). Parametr ten został wyznaczony dla każdego z badanych enzymów w trzech niezależnych powtórzeniach. Wyniki dla hDcpS oraz PDE-I zostały opisane w publikacji Baranowski i wsp. (192). Na pojedynczy eksperyment składały się dwie płytki tj. płytka reakcyjna oraz płytka do odczytu fluorescencji. Dla ludzkiego i roślinnego Fhit eksperyment wyglądał następująco: substrat (AMPF lub $m^7\text{GMPF}$) został zawieszony w buforze B1 i rozpipetowany do 80 dołków na płytce reakcyjnej o objętości 190 μL każdy. Do kolumn 1-5 dodano zdenaturowanego białka (enzym ogrzewano przez 5 minut w 95°C , a następnie ochłodzono na lodzie) – kontrola negatywna, a do kolumn 6-10 dodano aktywnego enzymu Fhit – kontrola pozytywna. Reakcję enzymatyczną prowadzono w 30°C z mieszaniem orbitalnym (300 rpm) i po określonym czasie, który dobrano tak aby stopień konwersji fluorowanego substratu wynosił 25-30% (zobacz szczegółowe dane poniżej), reakcję zastopowano dodając 120 μL acetonitrylu. Pozostałe 16 dołków pozostawiono na krzywą kalibracyjną składającą się jonów F^- (z NaF) w liniowym zakresie stężeń 0-40 μM w buforze reakcyjnym B1. W kolejnym kroku, porcje po 25 μL z płytki reakcyjnej przeniesiono na płytkę do odczytu. Do każdego z dołków dodano 90 μL roztworu sondy fluorogenicznej, która została przygotowana tak jak to zostało opisane w podrozdziale 5.9.3. Płytkę inkubowano przez 1h w 30°C z mieszaniem orbitalnym (300 rpm), następnie do każdego z dołków dodano po 100 μL 200 mM Hepes, a po 5 minutach dodatkowej inkubacji dokonywano odczytu na czytniku mikropłytek (patrz rozdział 5.9).

Warunki wyznaczenia Z' dla hFhit: 60 μM AMPF, bufor B1, czas reakcji 60 minut, stężenie hFhit 25 nM.

Warunki wyznaczenia Z' dla AtFhit: 60 μM $m^7\text{GMPF}$, bufor B1, czas reakcji 40 minut, stężenie AtFhit 14 nM.

5.9.5 Wysokoprzepustowe badanie przesiewowe

Procedura wysoko przepustowego badania przesiewowego (HTS) była następująca. Na płytce reakcyjnej do każdego z 74 dołków wpipetowano inhibitor oraz wcześniej przygotowaną mieszaninę buforu z substratem, a łączna objętość na tym etapie wynosiła 190 μL . 3 dołki zarezerwowano na reakcje kontrolne bez inhibitora oraz 3 dołki na reakcje kontrolne z dezaktywowanym termicznie enzymem. Płytkę inkubowano z wytrząsaniem orbitalnym 300 rpm w 30 °C przez 5 minut, a następnie za pomocą pipety 8-kanalowej dodano po 10 μL enzymu w odstępach 20 sekundowych pomiędzy kolumnami. Po określonym czasie (szczegóły poniżej) reakcje zastopowano, dodając acetonitrylu oraz zachowując 20 sekundowe odstępy. W kolejnym kroku, porcje po 25 μL z płytki reakcyjnej przeniesiono na płytkę do odczytu. Do każdego z dołków dodano 90 μL roztworu sondy fluorogenicznej, która została przygotowana tak jak to zostało opisane w podrozdziale 5.9.3. Płytkę inkubowano przez 1h w 30° z mieszaniem orbitalnym (300 rpm), następnie do każdego z dołków dodano po 100 μL 200 mM Hepes, a po 5 minutach dodatkowej inkubacji dokonywano odczytu na czytniku mikroplatek (patrz rozdział 5.9).

Warunki eksperymentu wysokoprzepustowego z enzymem hDcpS: 60 μM $m^7\text{GMPF}$, 20 μM inhibitor, bufor B2, czas reakcji 50 minut, stężenie hDcpS 25 nM. Reagent stopujący reakcję: 100 μL acetonitrylu.

Warunki eksperymentu wysokoprzepustowego z enzymem hFhit: 60 μM AMPF, 20 μM inhibitor, bufor B1, czas reakcji 60 minut, stężenie hFhit 25 nM. Reagent stopujący reakcję: 120 μL acetonitrylu.

Warunki eksperymentu wysokoprzepustowego z enzymem AtFhit: 60 μM $m^7\text{GMPF}$, 20 μM inhibitor, bufor B1, czas reakcji 40 minut, stężenie AtFhit 14 nM. Reagent stopujący reakcję: 120 μL acetonitrylu.

Analizę ilościową umożliwiło wyznaczenie procentu inhibicji ($\%_{\text{inhibicji}}$) za pomocą poniższego równania:

$$\%_{\text{inhib}} = \frac{F_{\text{kont}} - F_{\text{inhib}}}{F_{\text{kont}} - F_{\text{tło}}} \times 100\%$$

Gdzie F_{kont} to średnia wartość fluorescencji reakcji kontrolnych (bez inhibitora), F_{inhib} to wartość fluorescencji reakcji z danym inhibitorem, $F_{\text{tło}}$ to wartość fluorescencji tła (próbki z krzywej kalibracyjnej zawierające 0 μM jonów fluorkowych).

5.9.6 Wyznaczenie parametrów IC₅₀

Eksperymenty, na podstawie których wyznaczono parametry IC₅₀ zostały przeprowadzone w identyczny sposób jak opisano w podrozdziale 5.9.5, z taką różnicą, że pojedyncze stężenie badanego inhibitora zastąpiono 10-cio punktową logarytmiczną serią rozcieńczeń tego związku (startując od 1000 μM, 800 μM lub 250 μM w zależności od %_{inhibicji} badanego związku). Dla każdego inhibitora wykonywano trzy niezależne eksperymenty. Aby wyznaczyć IC₅₀ dane dopasowywano w programie GraphPad Prism 8.3 lub nowszy do funkcji dose-response (równanie trzyparametrowe), które jest opisane równaniem:

$$Y = B + \frac{T - B}{1 + \frac{X}{IC_{50}}}$$

gdzie X to stężenie inhibitora w μM, Y odczytana intensywność fluorescencji, B oraz T to dolne i górne plateau (w jednostkach takich jak Y).

5.9.7 Badania HPLC

Badania opisane w podrozdziale 2.2.6 zostały wykonane na aparacie Agilent Technologies 1200 Infinity Series, który był wyposażony w kolumnę w odwróconych fazach Supelcosil LC-18-T (25 cm x 4,6 mm, 5 μm) przy przepływie 1,3 ml/min. Próbkę analizowano z wykorzystaniem buforów fosforanowych, tj. bufor B1: 0,1 M fosforan potasu pH 6,0, bufor B2: mieszanina buforu B1 oraz metanolu 1:1 w ich liniowym gradiencie. W trakcie pomiaru na HPLC obserwowano zmianę absorbancji przy 254 nm lub sygnał fluorescencji przy 370 nm (wzbudzenie 260 nm). Badane próbki rozcieńczono do stężenia 10 lub 200 μM w buforze 50 mM Tris-HCl pH 7,6 zawierającym 200 mM KCl oraz 5 mM MgCl₂, a stężenie enzymów wynosiło 1 nM lub 10 nM dla hFhit oraz 10 nM, dla hDcpS tak jak zaznaczono w głównym manuskrypcie. Reakcje enzymatyczne prowadzono w 37 °C przez 1h z wytrząsaniem 300 rpm. Reakcje stopowano w dobranych punktach czasowych (5, 15, 30, 45 i 60 minut) poprzez ogrzanie w 95°C przez 5 minut, a następnie ochłodzenie na lodzie.

5.10 Plazmidy oraz transformacja bakterii

5.10.1 Plazmidy wykorzystane do otrzymania białek hFhit oraz AtFhit

Plazmidy ekspresyjne kodujące ludzkie białko Fhit (pSGA02_hFhit) oraz roślinny Fhit, *Arabidopsis Thaliana* Fhit (pSGA02_AtFhit) uzyskano dzięki uprzejmości dr. Pawła Bieganowskiego z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN.

Ponieważ białko AtFhit otrzymane z plazmidu pSGA02_AtFhit nie było wystarczająco czyste, to za pomocą standardowych technik biologii molekularnej gen kodujący białko AtFhit z plazmidu pSGA sklonowano do plazmidu pET, który dodatkowo zawierał etykietę sześciu

histydyn oraz białko SUMO od N-końca sekwencji (pET_His_Sumo_AtFhit). W ten sam sposób otrzymano plazmid pET_His_Sumo_hFhit.

5.10.2 Sekwencjonowanie plazmidów

Plazmid pET_His_Sumo_AtFhit oraz pET_His_Sumo_hFhit zostały poddane sekwencjonowaniu z wykorzystaniem primerów T7. Sekwencjonowanie wykonała firma Genomed. Na podstawie uzyskanych wyników sekwencja ludzkiego Fhit w 100% odpowiadała sekwencji aminokwasowej, która w banku danych PDB ma oznaczenie 1FIT oraz 1FHI, a nazwa genu to FHIT lub FRA3B. W przypadku białka roślinnego, posiadało ono od N-końca dodatkową serynę (pozostałość po białku SUMO), a liczba aminokwasów wynosiła 161. Jest to izoforma II białka AtFhit skrócona o 20 aminokwasów od N-końca. W [bazie](#) sekwencja była w 100% zgodna z id sekwencji „At5g58240” oraz w 99.4% zgodna z genem FHIT oraz id sekwencji „NP_200632.2”. Otrzymane białko AtFhit posiadało mutację alaniny 39 na glicynę, co jest często spotykane w literaturze.

Sekwencja wstawki His_Sumo_AtFhit w plazmidzie pET:

```
MSHHHHHSGEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQ GKEMDS
LRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGSMSTC SSYAFGPYKIDPREVFYATPL
SYAMVNLRLPLPGHVLVCPRLVPRFTDLTADETS DLWLTAQKVGSKLET FHNASSLT LAIQD
GPQAGQTPVPHVHIHLPRKGGDFEKNDEIYDALDEKEKELKQKLDL DKDRVDRSIQEMADEAS
QYRSLFDC *
```

Sekwencja wstawki His_Sumo_hFhit w plazmidzie pET:

```
MSHHHHHSGEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQ GKEMDS
LRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGSM SFRFGQHLIKPSVVFLKTELSFALV
NRKPVVPGHVLVCPRLPVERFHDLPDEVADLFQT TQRVGTVVEKHFGTSLTFSMQDGPEAG
QTVKHVHVHVLPRKAGDFHRNDSIYEELQKHKEDFPASWRSEEEMAAEAAAALRVYFQ *
```

5.10.3 Transformacja plazmidów do bakterii RIL BL21(DE3)

Pobrano 1 µl wybranego plazmidu i dodano go do 100 µl chemicznie kompetentnych bakterii szczepu BL21 (DE3) RIL. Bakterie inkubowano 20 minut na lodzie, 45 sekund w 42°C (heat shock), 2 minuty na lodzie. Do zawiesiny bakteryjnej dodano 500 µl medium SOB i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (60 minut, 650 rpm). Uzyskaną hodowlę wysiano na szalki z podłożem LB-agar z dodatkiem ampicyliny lub kanamycyny. Przygotowaną płytkę pozostawiono w 37°C na 16 godzin (o/n).

5.11 Ekspresja i oczyszczanie białek

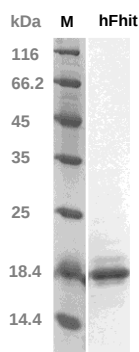
Oczyszczanie białek wykonano na aparacie FPLC Äkta™ Pure.

5.11.1 Ludzki Fhit - hFhit

Do 100 mL pożywki LB dodano ampicylinę, do stężenia 100 µg/ml oraz wrzucono tip, którym uprzednio pobrano jedną kolonię bakterii BL21(DE3) RIL transformowanych plazmidem

kodującym ludzki Fhit. Hodowlę nocną prowadzono przez około 16-17 godzin w 37°C. Do świeżego LB (2 x 0,5l) zawierającego ampicylinę (100 µg/ml) dodano po 5 mL (1:100) hodowli nocnej i wytrząsano w 37°C (230 rpm) do wartości OD_{600nm} około 0,4. Następnie do każdej z kolb dodano świeżo przygotowanego IPTG (izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd) do stężenia końcowego 0,4 mM oraz prowadzono dalszą inkubację przez 4h w 37°C (230 rpm) do osiągnięcia OD_{600nm} ~ 0,8. Hodowlę zwirowano (15 min/7000 rpm/4 °C), supernatant usunięto, a pelet przełożono do 50 ml probówek falkona i przechowywano w -80°C.

Pelet rozmrożono na lodzie i zawieszono w buforze do lizy (20 mM Tris·HCl, pH=7,5; 100 mM NaCl, 10 ml/1g peletu), zawierającym inhibitory proteaz (1:100 każdy: leupeptyna, aprotenina, pepstatyna oraz fluorek fenylometanosulfonylu) oraz dodano świeżo przygotowany lizozym (ostatecznie 0,1 mg/ml) i inkubowano na lodzie przez 20 minut. Roztwór sonikowano przez 3 minuty i lizat zwirowano (30 000 x g/4°C/30 minut) zachowując supernatant z białkiem. W kolejnym kroku wytrącono kwasy nukleinowe dodając 0,1% PEI (v/v) i delikatnie mieszając przez 5 minut w 4°C oraz ponownie zwirowano zachowując supernatant (10 min/5000 rpm/4°C). Następnie wytrącono białka przy 20% stężeniu siarczanu amonu (6,36 g/60 ml), który dodawano stopniowo, a całość mieszano delikatnie przez 30 minut w 4°C. Roztwór zwirowano zachowując supernatant (20min/12 000 rpm/4°C) oraz wytrącono białko hFhit przy 70% stężeniu siarczanu amonu (18,72 g/60 ml) mieszając delikatnie przez 30 minut w 4°C. Ostatecznie roztwór zwirowano (20 min/7000 rpm/4°C), zachowując pelet, który następnie zawieszono w buforze (20 mM Tris·HCl, pH=7,5; 100 mM NaCl, 20 ml) i przeprowadzono ponowne wytrącanie ludzkiego Fhit 70% siarczanem amonu, jak opisano powyżej (wytrącanie powtórzone trzykrotnie). Pelet zawieszono w buforze (20 mM Tris·HCl, pH=7,5; 100 mM NaCl, 16 ml) oraz naniesiono na przygotowaną kolumnę przeznaczoną do odsalania próbki HiTrap 26/10. Zebrano frakcje zawierające białko, połączono ze sobą i wykonano dodatkowe oczyszczanie na kolumnie do filtracji żelowej HiLoad 26/600 Superdex 76 pg wypełnionej buforem 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT. Ta wielostopniowa procedura pozwoliła na uzyskanie ludzkiego enzymu Fhit o czystości co najmniej 90% (na podstawie elektroforezy żelowej SDS-PAGE, Żel 1.). Stosunek absorbancji A₂₆₀/A₂₈₀ wyniósł 0,73. Białko zostało zatężone na filtrach Amicon Ultra-15 10K do stężenia 8,4 mg/ml oraz 16,8 mg/ml, podzielone na porcje po 50 lub 100 µl oraz zamrożone w ciekłym azocie z dodatkiem 10% glicerolu. Białko hFhit było przechowywane w -80°C. Masa molowa białka wynosi 16 800 Da, a stężenie zostało wyznaczone spektrofotometrycznie przy użyciu molowego współczynnika ekstynkcji, który został obliczony teoretycznie na podstawie sekwencji aminokwasowej, ε₂₈₀ = 8480 M⁻¹ cm⁻¹ (Expasy Server).

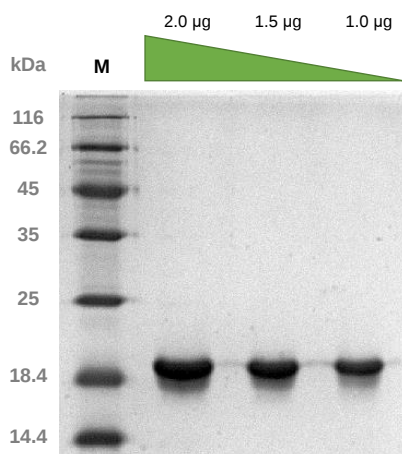


Żel 1. Czystość białka hFhit.

5.11.2 Roślinny Fhit – AtFhit

Do 100 mL pożywki LB dodano kanamycynę do stężenia 30 $\mu\text{g/ml}$ oraz wrzucono tip, którym uprzednio pobrano jedną kolonię bakterii BL21(DE3) RIL transformowanych plazmidem kodującym roślinny Fhit. Hodowlę nocną prowadzono przez około 16-17 godzin w 37°C. Do świeżego LB (2 x 0,5l) zawierającego kanamycynę (30 $\mu\text{g/ml}$) dodano po 10 mL (1:50) hodowli nocnej i wytrząsano w 37°C (230 rpm) do wartości $\text{OD}_{600\text{nm}}$ około 0,4. Następnie do każdej z kolb dodano świeżo przygotowanego IPTG (izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd) do stężenia końcowego 0,4 mM oraz prowadzono dalszą inkubację przez 4h w 37°C (230 rpm) do osiągnięcia $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,8$. Hodowlę zwirowano (15 min/7000 rpm/4 °C), supernatant usunięto, a pelet przełożono do 50 ml probówek falkona i przechowywano w -80°C.

Pelet rozmrożono na lodzie i zawieszono w buforze do lizy (20 mM Tris-HCl, pH=7,5; 100 mM NaCl, 20 mM imidazol - 10 ml/1g peletu), zawierającym inhibitory proteaz (1:100 każdy: aprotienina, pepstatyna oraz fluorek fenylometanosulfonylu) oraz dodano świeżo przygotowany lizozym (ostatecznie 0,1 mg/ml) i inkubowano na lodzie przez 20 minut. Roztwór sonikowano przez 2 minuty (4x30 sek on/2 min off) i lizat zwirowano (35 000 x g/4°C/40 minut), a supernatant naniesiono na kolumnę powinowactwa HisTrap™ FF (GE Healthcare). Kolumnę przepłukano ok. 50 ml buforu W' (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 50 mM imidazol). Białko eluowano buforem E' (50 mM TRIS-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 300 mM imidazol). Frakcje posiadające pożądane białko naniesiono na kolumnę HiPrep 26/10 Desalting (w celu pozbycia się imidazolu) i eluowano buforem S' (50 mM TRIS-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,2% Igepal, 1 mM DTT). Do zebranych frakcji dodano proteazy ULP1 (0,5 μl /2 ml) i pozostawiono o/n w 4°C. Kolejnego dnia roztwór rozpipetowano do eppendorfów i zwirowano 5 min/15 000 rpm/4°C oraz połączono w jedną frakcję dodając 1 mL buforu W' oraz wykonano rozdział na kolumnie HisTrap™ FF w analogiczny sposób jak opisano powyżej. Frakcje zawierające białko AtFhit połączono ze sobą i naniesiono na kolumnę żelową HiLoad 26/600 Superdex 76 pg (GE Healthcare) i eluowano buforem F' (20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT). Frakcje zawierające czyste białko zateżono (Amicon Ultra-15 10K) do stężenia 60 μM (względem monomeru; stężenie białka wyznaczono spektrofotometrycznie za pomocą urządzenia NanoDrop (Thermo Scientific), przyjmując współczynnik ekstynkcji $\epsilon_{280\text{ nm}} = 14\,440\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, 18,2 kDa, Expasy Server), podzielono na porcje po 50 μl , zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C. Czystość otrzymanego AtFhit przedstawiono za pomocą elektroforezy żelowej w warunkach denaturujących (Żel 2).



Żel 2. Czystość białka AtFhit. Różne ilości naniesionego AtFhit na żel.

5.11.3 Ludzki DcpS - hDcpS

Preparaty enzymu ludzkiego DcpS zostały przygotowane w Laboratorium Chemii Bioorganicznej, Centrum Nowych Technologii UW. Ekspresja i oczyszczanie ludzkiego DcpS zostały wykonane tak jak jest to opisane w literaturze (250). Stężenie białka zostało wyznaczone spektrofotometrycznie korzystając z wartości molowego współczynnika ekstynkcji: $\epsilon_{280} = 30400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Enzym przechowywano w -80°C (50 mM Tris·HCl pH 7,60, 0,2 M NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol).

5.11.4 Ludzki cNIIIB - hcNIIIB

Preparaty enzymu cNIIIB przygotowała dr Dorota Kubacka. Białko cNIIIB zostało przygotowane tak jak opisano w literaturze (254).

6. Literatura

1. Iwao, O. (2009) Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology, Blackwell, Wiley.
2. Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E. and Scheiner, J. (1957) Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, **179**, 663-666.
3. Park, B.K., Kitteringham, N.R. and O'Neill, P.M. (2001) Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 443-470.
4. Bondi, A. (1964) Van der Waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.*, **68**, 441-451.
5. Smart, B.E. (2001) Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluorine Chem.*, **109**, 3-11.
6. Olsen, J.A., Banner, D.W., Seiler, P., Wagner, B., Tschoop, T., Obst-Sander, U., Kansy, M., Muller, K. and Diederich, F. (2004) Fluorine interactions at the thrombin active site: Protein backbone fragments H-C- α -C=O comprise a favorable C-F environment and interactions of C-F with electrophiles. *ChemBioChem*, **5**, 666-675.
7. Isanbor, C. and O'Hagan, D. (2006) Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. *J. Fluorine Chem.*, **127**, 303-319.
8. Westwell, A.D. (2015) *Fluorinated Pharmaceuticals: Advances in Medicinal Chemistry*. Future Sci. Ltd. London, UK.
9. Hagmann, W.K. (2008) The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.*, **51**, 4359-4369.
10. Zhou, Y., Wang, J., Gu, Z.N., Wang, S.N., Zhu, W., Acena, J.L., Soloshonok, V.A., Izawa, K. and Liu, H. (2016) Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. *Chem. Rev.*, **116**, 422-518.
11. Dugar, S., Yumibe, N., Clader, J.W., Vizziano, M., Huie, K., VanHeek, M., Compton, D.S. and Davis, H.R. (1996) Metabolism and structure activity data based drug design: Discovery of SCH 53079 an analog of the potent cholesterol absorption inhibitor SCH 48461. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 1271-1274.
12. Penning, T.D., Talley, J.J., Bertenshaw, S.R., Carter, J.S., Collins, P.W., Docter, S., Graneto, M.J., Lee, L.F., Malecha, J.W., Miyashiro, J.M. et al. (1997) Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: Identification of 4-5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). *J. Med. Chem.*, **40**, 1347-1365.
13. Wong, D.T., Bymaster, F.P. and Engleman, E.A. (1995) Prozac (fluoxetine, lilly-110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug - 20 years since its first publication. *Life Sci.*, **57**, 411-441.
14. Roman, D.L., Walline, C.C., Rodriguez, G.J. and Barker, E.L. (2003) Interactions of antidepressants with the serotonin transporter: a contemporary molecular analysis. *Eur. J. Pharmacol.*, **479**, 53-63.
15. Chen, H., Viel, S., Ziarelli, F. and Peng, L. (2013) ^{19}F NMR: a valuable tool for studying biological events. *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 7971-7982.
16. Cobb, S.L. and Murphy, C.D. (2009) ^{19}F NMR applications in chemical biology. *J. Fluorine Chem.*, **130**, 132-143.
17. Danielson, M.A. and Falke, J.J. (1996) Use of ^{19}F NMR to probe protein structure and conformational changes. *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, **25**, 163-195.
18. Guo, F.M., Li, Q. and Zhou, C.Z. (2017) Synthesis and biological applications of fluoro-modified nucleic acids. *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 9552-9565.
19. Gerig, J.T. (1994) Fluorine NMR of proteins. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **26**, 293-370.
20. Cron, G.O., Beghein, N., Ansiaux, R., Martinive, P., Feron, O. and Gallez, B. (2008) ^{19}F NMR in vivo spectroscopy reflects the effectiveness of perfusion-enhancing vascular modifiers for improving gemcitabine chemotherapy. *Magn. Reson. Med.*, **59**, 19-27.
21. Evich, M., Spring-Connell, A.M. and Germann, M.W. (2017) Impact of modified ribose sugars on nucleic acid conformation and function. *Heterocycl. Commun.*, **23**, 155-165.
22. Schweizer, M.P., Broom, A.D., Tso, P.O.P. and Hollis, D.P. (1968) Studies of inter- and intramolecular interaction in mononucleotides by proton magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1042-1055.
23. Belmont, P., Constant, J.F. and Demeunynck, M. (2001) Nucleic acid conformation diversity: from structure to function and regulation. *Chem. Soc. Rev.*, **30**, 70-81.
24. Altona, C. and Sundaralingam, M. (1972) Conformational-analysis of sugar ring in nucleosides and nucleotides - new description using concept of pseudorotation. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8205-8212.
25. Del-Corso, A., Cappiello, M., Moschini, R., Balestri, F., Mura, U. and Ipetta, P.L. (2019) The furanosidic scaffold of D-ribose: a milestone for cell life. *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 1931-1940.
26. Barchi, J.J., Jeong, L.S., Siddiqui, M.A. and Marquez, V.E. (1997) Conformational analysis

- of the complete series of 2' and 3' monofluorinated dideoxyuridines. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **34**, 11-29.
27. Guschlbauer, W. and Jankowski, K. (1980) Nucleoside conformation is determined by the electronegativity of the sugar substituent. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1421-1433.
 28. Olah, G.A., Welch, J.T., Vankar, Y.D., Nojima, M., Kerekes, I. and Olah, J.A. (1979) Synthetic methods and reactions .63. pyridinium poly-(hydrogen fluoride) (30-percent pyridine 70-percent hydrogen-fluoride) - convenient reagent for organic fluorination reactions. *J. Org. Chem.*, **44**, 3872-3881.
 29. Olah, G.A., Shih, J.G. and Prakash, G.K.S. (1986) Fluorine-containing reagents in organic-synthesis. *J. Fluorine Chem.*, **33**, 377-396.
 30. Shi, J.X., Du, J.F., Ma, T.W., Pankiewicz, K.W., Patterson, S.E., Tharnish, P.M., McBrayer, T.R., Stuyver, L.J., Otto, M.J., Chu, C.K. *et al.* (2005) Synthesis and anti-viral activity of a series of D- and L-2'-deoxy-2'-fluororibonucleosides in the subgenomic HCV replicon system. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 1641-1652.
 31. L'Heureux, A., Beaulieu, F., Bennett, C., Bill, D.R., Clayton, S., LaFlamme, F., Mirmehrabi, M., Tadayon, S., Tovell, D. and Couturier, M. (2010) Aminodifluorosulfonium Salts: Selective Fluorination Reagents with Enhanced Thermal Stability and Ease of Handling. *J. Org. Chem.*, **75**, 3401-3411.
 32. Taylor, S.D., Kotoris, C.C. and Hum, G. (1999) Recent advances in electrophilic fluorination. *Tetrahedron*, **55**, 12431-12477.
 33. Lal, G.S., Pez, G.P. and Syvret, R.G. (1996) Electrophilic NF fluorinating agents. *Chem. Rev.*, **96**, 1737-1755.
 34. Wang, X.J., Seth, P.P., Ranken, R., Swayze, E.E. and Migawa, M.T. (2004) Synthesis and biological activity of 5-fluorotubercidin. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **23**, 161-170.
 35. Lal, G.S., Pastore, W. and Pesaresi, R. (1995) A convenient synthesis of 5-fluoropyrimidines using 1-(chloromethyl)-4-fluoro-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane bis(tetrafluoroborate)-selectfluor reagent. *J. Org. Chem.*, **60**, 7340-7342.
 36. Bauta, W.E., Schulmeier, B.E., Burke, B., Puente, J.F., Cantrell, W.R., Lovett, D., Goebel, J., Anderson, B., Ionescu, D. and Guo, R.C. (2004) A new process for antineoplastic agent clofarabine. *Org. Process Res. Dev.*, **8**, 889-896.
 37. Hatse, S., De Clercq, E. and Balzarini, J. (1999) Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 539-555.
 38. Cavaliere, A., Probst, K.C., Westwell, A.D. and Slusarczyk, M. (2017) Fluorinated nucleosides as an important class of anticancer and antiviral agents. *Future Med. Chem.*, **9**, 1809-1833.
 39. Peters, G.J., Vanderwilt, C.L., Vantriest, B., Codaccipisanelli, G., Johnston, P.G., Vangroeningen, C.J. and Pinedo, H.M. (1995) Thymidylate synthase and drug-resistance. *Eur. J. Cancer*, **31A**, 1299-1305.
 40. Peters, G.J., Backus, H.H.J., Freemantle, S., van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., van der Wilt, C.L., Smid, K., Lunec, J., Calvert, A.H., Marsh, S. *et al.* (2002) Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *BBA - Molecular Basis of Disease*, **1587**, 194-205.
 41. Meropol, N.J. (1998) Oral fluoropyrimidines in the treatment of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, **34**, 1509-1513.
 42. Petty, R.D. and Cassidy, J. (2004) Novel fluoropyrimidines: Improving the efficacy and tolerability of cytotoxic therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **4**, 191-204.
 43. Malet-Martino, M., Jolimaite, P., Martino, R. (2002) The prodrugs of 5-fluorouracil. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2**, 267-310.
 44. Toschi, L., Finocchiaro, G., Bartolini, S., Gioia, V., Cappuzzo, F. (2005) Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncol.*, **1**, 7-17.
 45. Pradere, U., Garnier-Amblard, E.C., Coats, S.J., Amblard, F. and Schinazi, R.F. (2014) Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem. Rev.*, **114**, 9154-9218.
 46. Slusarczyk, M., Lopez, M.H., Balzarini, J., Mason, M., Jiang, W.G., Blagden, S., Thompson, E., Ghazaly, E. and McGuigan, C. (2014) Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development. *J. Med. Chem.*, **57**, 1531-1542.
 47. Blagden, S.P., Rizzuto, I., Suppiah, P., O'Shea, D., Patel, M., Spiers, L., Sukumaran, A., Bharwani, N., Rockall, A., Gabra, H. *et al.* (2018) Anti-tumour activity of a first-in-class agent NUC-1031 in patients with advanced cancer: results of a phase I study. *Br. J. Cancer*, **119**, 815-822.
 48. Kapacee, Z.A., Knox, J.J., Palmer, D., Blagden, S.P., Lamarca, A., Valle, J.W. and McNamara, M.G. (2020) NUC-1031, use of ProTide technology to circumvent gemcitabine resistance: current status in clinical trials. *Medical Oncology*, **37**.
 49. Rinaldi, C. and Wood, M.J.A. (2018) Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, **14**, 9-21.
 50. Relizani, K. and Goyenvall, A. (2018) The Use of Antisense Oligonucleotides for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy.

- Duchenne Muscular Dystrophy: Methods and Protocols*, **1687**, 171-183.
51. Kim, J., Hu, C., El Achkar, C.M., Black, L.E., Douville, J., Larson, A., Pendergast, M.K., Goldkind, S.F., Lee, E.A., Kuniholm, A. *et al.* (2019) Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *N. Engl. J. Med.*, **381**, 1644-1652.
 52. Wood, M.J.A., Talbot, K. and Bowerman, M. (2017) Spinal muscular atrophy: antisense oligonucleotide therapy opens the door to an integrated therapeutic landscape. *Hum. Mol. Genet.*, **26**, R151-R159.
 53. Dias, N. and Stein, C.A. (2002) Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 347-355.
 54. Eckstein, F. (2014) Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.*, **24**, 374-387.
 55. Manoharan, M. (1999) 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *BBA - Gene Structure and Expression*, **1489**, 117-130.
 56. Kawasaki, A.M., Casper, M.D., Freier, S.M., Lesnik, E.A., Zounes, M.C., Cummins, L.L., Gonzalez, C. and Cook, P.D. (1993) Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high-affinity and specificity for rna targets. *J. Med. Chem.*, **36**, 831-841.
 57. Pallan, P.S., Prakash, T.P., de Leon, A.R. and Egli, M. (2016) Limits of RNA 2'-OH Mimicry by Fluorine: Crystal Structure of Bacillus halodurans RNase H Bound to a 2'-FRNA:DNA Hybrid. *Biochemistry*, **55**, 5321-5325.
 58. Rupaimoole, R. and Slack, F.J. (2017) MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **16**, 203-221.
 59. Damha, M.J., Wilds, C.J., Noronha, A., Brukner, I., Borkow, G., Arion, D. and Parniak, M.A. (1998) Hybrids of RNA and arabinonucleic acids (ANA and 2'-F-ANA) are substrates of ribonuclease H. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 13545-13545.
 60. Trempe, J.F., Wilds, C.J., Denisov, A.Y., Pon, R.T., Damha, M.J. and Gehring, K. (2001) NMR solution structure of an oligonucleotide hairpin with a 2'-F-ANA/RNA stem: Implications for RNase H specificity toward DNA/RNA hybrid duplexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4896-4903.
 61. Takahashi, M., Li, H.T., Zhou, J.H., Chomchan, P., Aishwarya, V., Damha, M.J. and Rossi, J.J. (2019) Dual Mechanisms of Action of Self-Delivering, Anti-HIV-1 FANA Oligonucleotides as a Potential New Approach to HIV Therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **17**, 615-625.
 62. Patra, A., Paolillo, M., Charisse, K., Manoharan, M., Rozners, E. and Egli, M. (2012) 2'-Fluoro RNA Shows Increased Watson-Crick H-Bonding Strength and Stacking Relative to RNA: Evidence from NMR and Thermodynamic Data. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 11863-11866.
 63. Martin-Pintado, N., Deleavey, G.F., Portella, G., Campos-Olivas, R., Orozco, M., Damha, M.J. and Gonzalez, C. (2013) Backbone FC-H...O Hydrogen Bonds in 2'-F-Substituted Nucleic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 12065-12068.
 64. Anzahaee, M.Y., Watts, J.K., Alla, N.R., Nicholson, A.W. and Damha, M.J. (2011) Energetically Important C-H...F-C Pseudohydrogen Bonding in Water: Evidence and Application to Rational Design of Oligonucleotides with High Binding Affinity. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 728-731.
 65. Hennig, M., Scott, L.G., Sperling, E., Bermel, W. and Williamson, J.R. (2007) Synthesis of 5-fluoropyrimidine Nucleotides as sensitive NMR probes of RNA structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14911-14921.
 66. Hammann, C., Norman, D.G. and Lilley, D.M.J. (2001) Dissection of the ion-induced folding of the hammerhead ribozyme using ¹⁹F NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 5503-5508.
 67. Olejniczak, M., Gdaniec, Z., Fischer, A., Grabarkiewicz, T., Bielecki, L. and Adamiak, R.W. (2002) The bulge region of HIV-1 TAR RNA binds metal ions in solution. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4241-4249.
 68. Hennig, M., Munzarova, M.L., Bermel, W., Scott, L.G., Sklenar, V. and Williamson, J.R. (2006) Measurement of long-range ¹H-¹⁹F scalar coupling constants and their glycosidic torsion dependence in 5-fluoropyrimidine-substituted RNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5851-5858.
 69. Puffer, B., Kreutz, C., Rieder, U., Ebert, M.O., Konrat, R. and Micura, R. (2009) 5-Fluoro pyrimidines: labels to probe DNA and RNA secondary structures by 1D ¹⁹F NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7728-7740.
 70. Tanabe, K., Sugiura, M. and Nishimoto, S.-i. (2010) Monitoring of duplex and triplex formation by ¹⁹F NMR using oligodeoxynucleotides possessing 5-fluorodeoxyuridine unit as ¹⁹F signal transmitter. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 6690-6694.
 71. Kieger, A., Wiester, M.J., Procissi, D., Parrish, T.B., Mirkin, C.A. and Thaxton, C.S. (2011) Hybridization-Induced "Off-On" ¹⁹F NMR Signal Probe Release from DNA-Functionalized Gold Nanoparticles. *Small*, **7**, 1977-1981.

72. Markley, J.C., Chirakul, P., Sologub, D. and Sigurdsson, S.T. (2001) Incorporation of 2'-deoxy-5-(trifluoromethyl)uridine and 5-cyano-2'-deoxyuridine into DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2453-2455.
73. Nakamura, S. and Fujimoto, K. (2015) Photo-cross-linking using trifluorothymidine and 3-cyanovinylcarbazole induced a large shifted ^{19}F NMR signal. *Chem. Commun.*, **51**, 11765-11768.
74. Nakamura, S., Yang, H., Hirata, C., Kersaudy, F. and Fujimoto, K. (2017) Development of ^{19}F NMR chemical shift detection of DNA B-Z equilibrium using ^{19}F NMR. *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 5109-5111.
75. Nakamura, S., Takashima, Y. and Fujimoto, K. (2018) Multiplexed detection of nucleic acids using ^{19}F NMR chemical shift changes based on DNA photo-cross-linking of 3-vinylcarbazole derivatives. *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 891-894.
76. Barhate, N.B., Barhate, R.N., Cekan, P., Drobny, G. and Sigurdsson, S.T. (2008) A nonafluoro nucleoside as a sensitive ^{19}F NMR probe of nucleic acid conformation. *Org. Lett.*, **10**, 2745-2747.
77. Kiviniemi, A. and Virta, P. (2010) Characterization of RNA Invasion by ^{19}F NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 8560-8562.
78. Kiviniemi, A. and Virta, P. (2011) Synthesis of Aminoglycoside-3'-Conjugates of 2'-O-Methyl Oligoribonucleotides and Their Invasion to a ^{19}F labeled HIV-1 TAR Model. *Bioconjugate Chem.*, **22**, 1559-1566.
79. Tanabe, K., Tsuda, T., Ito, T. and Nishimoto, S.-I. (2013) Probing DNA Mismatched and Bulged Structures by Using (19) F NMR Spectroscopy and Oligodeoxynucleotides with an (19) F-Labeled Nucleobase. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **19**, 15133-15140.
80. Ishizuka, T., Yamashita, A., Asada, Y. and Xu, Y. (2017) Studying DNA G-Quadruplex Aptamer by ^{19}F NMR. *Acs Omega*, **2**, 8843-8848.
81. Bhuma, N., Tahtinen, V. and Virta, P. (2018) Synthesis and Applicability of Base-Discriminating DNA-Triplex-Forming ^{19}F NMR Probes. *European J. Org. Chem.*, 605-613.
82. Scott, L.G., Geierstanger, B.H., Williamson, J.R. and Hennig, M. (2004) Enzymatic synthesis and ^{19}F NMR studies of 2-fluoro-adenine-substituted RNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11776-11777.
83. Sochor, F., Silvers, R., Mueller, D., Richter, C., Fuertig, B. and Schwalbe, H. (2016) F-19-labeling of the adenine H-2-site to study large RNAs by NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, **64**, 63-74.
84. Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L. and Breaker, R.R. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.*, **9**, 1043-1049.
85. Schwalbe, H., Buck, J., Furtig, B., Noeske, J. and Wohnert, J. (2007) Structures of RNA switches: Insight into molecular recognition and tertiary structure. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1212-1219.
86. Olszewska, A., Pohl, R. and Hockek, M. (2017) Trifluoroacetophenone-Linked Nucleotides and DNA for Studying of DNA-Protein Interactions by ^{19}F NMR Spectroscopy. *J. Org. Chem.*, **82**, 11431-11439.
87. Seela, F. and Xu, K. (2008) DNA with stable fluorinated dA and dG substitutes: syntheses, base pairing and F-19-NMR spectra of 7-fluoro-7-deaza-2'-deoxyadenosine and 7-fluoro-7-deaza-2'-deoxyguanosine. *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 3552-3560.
88. Bao, H.-L., Masuzawa, T., Oyoshi, T. and Xu, Y. (2020) Oligonucleotides DNA containing 8-trifluoromethyl-2'-deoxyguanosine for observing Z-DNA structure. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 7041-7051.
89. Wen Ann Wee, Ji Hye Yum, Shingo Hirashima, Hiroshi Sugiyama and Park, S. (2021). Royal Society of Chemistry, RSC Chemical Biology.
90. Gehring, K., Leroy, J.L. and Gueron, M. (1993) A tetrameric dna-structure with protonated cytosine.cytosine base-pairs. *Nature*, **363**, 561-565.
91. Zeraati, M., Langley, D.B., Schofield, P., Moye, A.L., Rouet, R., Hughes, W.E., Bryan, T.M., Dinger, M.E. and Christ, D. (2018) I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nature Chemistry*, **10**, 631-637.
92. Ishizuka, T., Zhao, P.Y., Bao, H.L. and Xu, Y. (2017) A multi-functional guanine derivative for studying the DNA G-quadruplex structure. *Analyst*, **142**, 4083-4088.
93. Riedl, J., Pohl, R., Rulisek, L. and Hockek, M. (2012) Synthesis and Photophysical Properties of Biaryl-Substituted Nucleos(t)ides. Polymerase Synthesis of DNA Probes Bearing Solvatochromic and pH-Sensitive Dual Fluorescent and F-19 NMR Labels. *J. Org. Chem.*, **77**, 1026-1044.
94. Manna, S., Sarkar, D. and Srivatsan, S.G. (2018) A Dual-App Nucleoside Probe Provides Structural Insights into the Human Telomeric Overhang in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 12622-12633.
95. Li, Q., Chen, J.L., Trajkovski, M., Zhou, Y.F., Fan, C.C., Lu, K., Tang, P.P., Su, X.C., Plavec, J., Xi, Z. et al. (2020) 4'-Fluorinated RNA: Synthesis, Structure, and Applications as a Sensitive ^{19}F NMR Probe of RNA Structure and Function. *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 4739-4748.
96. Kreutz, C., Kahlig, H., Konrat, R. and Micura, R. (2005) Ribose 2'-F labeling: A simple tool for the characterization of RNA secondary

- structure equilibria by ^{19}F NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11558-11559.
97. Kreutz, C., Kahlig, H., Konrat, R. and Micura, R. (2006) A general approach for the identification of site-specific RNA binders by ^{19}F NMR spectroscopy: Proof of concept. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 3450-3453.
 98. Kieltisch, I., Eisenberger, P. and Togni, A. (2007) Mild electrophilic trifluoromethylation of carbon- and sulfur-centered nucleophiles by a hypervalent iodine(III)-CF₃ reagent. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 754-757.
 99. Kosutic, M., Jud, L., Da Veiga, C., Frener, M., Fauster, K., Kreutz, C., Ennifar, E. and Micura, R. (2014) Surprising Base Pairing and Structural Properties of 2'-Trifluoromethylthio-Modified Ribonucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 6656-6663.
 100. Li, L. and Szostak, J.W. (2014) The Free Energy Landscape of Pseudorotation in 3'-5' and 2'-5' Linked Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 2858-2865.
 101. Himmelstoss, M., Erharter, K., Renard, E., Ennifar, E., Kreutz, C. and Micura, R. (2020) 2'-O-Trifluoromethylated RNA - a powerful modification for RNA chemistry and NMR spectroscopy. *Chem. Sci.*, **11**, 11322-11330.
 102. Jud, L., Kosutic, M., Schwarz, V., Hartl, M., Kreutz, C., Bister, K. and Micura, R. (2015) Expanding the Scope of 2-SCF₃ Modified RNA. *Chem. Eur. J.*, **21**, 10400-10407.
 103. Luy, B. and Marino, J.P. (2001) Measurement and application of ^1H - ^{19}F dipolar couplings in the structure determination of 2'-fluorolabeled RNA. *J. Biomol. NMR*, **20**, 39-47.
 104. Sicilia, G., Davis, A.L., Spain, S.G., Magnusson, J.P., Boase, N.R.B., Thurecht, K.J. and Alexander, C. (2016) Synthesis of ^{19}F nucleic acid-polymer conjugates as real-time MRI probes of biorecognition. *Polymer Chemistry*, **7**, 2180-2191.
 105. Fauster, K., Kreutz, C. and Micura, R. (2012) 2'-SCF₃ Uridine—A Powerful Label for Probing Structure and Function of RNA by ^{19}F NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 13080-13084.
 106. Granqvist, L. and Virta, P. (2015) 2'-O-(4-CF₃-triazol-1-yl)methyl Uridine - A Sensitive ^{19}F NMR Sensor for the Detection of RNA Secondary Structures. *J. Org. Chem.*, **80**, 7961-7970.
 107. Granqvist, L. and Virta, P. (2016) Characterization of G-Quadruplex/Hairpin Transitions of RNAs by ^{19}F NMR Spectroscopy. *Chem. Eur. J.*, **22**, 15360-15372.
 108. Granqvist, L. and Virta, P. (2014) 4'-C-[(4-Trifluoromethyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]thymidine as a Sensitive ^{19}F NMR Sensor for the Detection of Oligonucleotide Secondary Structures. *J. Org. Chem.*, **79**, 3529-3536.
 109. Francis, M.B. and Carrico, I.S. (2010) New frontiers in protein bioconjugation Editorial overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, **14**, 771-773.
 110. Dempsey, M.E., Marble, H.D., Shen, T.L., Fawzi, N.L. and Darling, E.M. (2018) Synthesis and Characterization of a Magnetically Active F-19 Molecular Beacon. *Bioconjugate Chem.*, **29**, 335-342.
 111. Tyagi, S. and Kramer, F.R. (1996) Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303-308.
 112. Clore, G.M. and Iwahara, J. (2009) Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States of Biological Macromolecules and Their Complexes. *Chem. Rev.*, **109**, 4108-4139.
 113. Sakamoto, T., Shimizu, Y., Sasaki, J., Hayakawa, H. and Fujimoto, K. (2011) Signal turn-on probe for nucleic acid detection based on ^{19}F nuclear magnetic resonance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 303-306.
 114. Bao, H.L., Ishizuka, T., Iwanami, A., Oyoshi, T. and Xu, Y. (2017) A Simple and Sensitive ^{19}F NMR Approach for Studying the Interaction of RNA G-Quadruplex with Ligand Molecule and Protein. *ChemistrySelect*, **2**, 4170-4175.
 115. Bao, H.L., Ishizuka, T., Sakamoto, T., Fujimoto, K., Uechi, T., Kenmochi, N. and Xu, Y. (2017) Characterization of human telomere RNA G-quadruplex structures in vitro and in living cells using ^{19}F NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 5501-5511.
 116. Bao, H.L. and Xu, Y. (2020) Telomeric DNA-RNA-hybrid G-quadruplex exists in environmental conditions of HeLa cells. *Chem. Commun.*, **56**, 6547-6550.
 117. Baranowski, M.R., Nowicka, A., Rydzik, A.M., Warminski, M., Kasprzyk, R., Wojtczak, B.A., Wojcik, J., Claridge, T.D.W., Kowalska, J. and Jemielity, J. (2015) Synthesis of Fluorophosphate Nucleotide Analogues and Their Characterization as Tools for ^{19}F NMR Studies. *J. Org. Chem.*, **80**, 3982-3997.
 118. Baranowski, M.R., Warminski, M., Jemielity, J. and Kowalska, J. (2020) 5'-fluoro(d)iphosphate-labeled oligonucleotides are versatile molecular probes for studying nucleic acid secondary structure and interactions by ^{19}F NMR. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 8209-8224.
 119. Harper, D.B. and Ohagan, D. (1994) The fluorinated natural-products. *Nat. Prod. Rep.*, **11**, 123-133.
 120. O'Hagan, D., Schaffrath, C., Cobb, S.L., Hamilton, J.T.G. and Murphy, C.D. (2002) Biosynthesis of an organofluorine molecule - A

- fluorinase enzyme has been discovered that catalyses carbon-fluorine bond formation. *Nature*, **416**, 279-279.
121. Yue, Y., Fan, J.Q., Xin, G.Q., Huang, Q., Wang, J.B., Li, Y.W., Zhang, Q.Z. and Wang, W.X. (2021) Comprehensive Understanding of Fluoroacetate Dehalogenase-Catalyzed Degradation of Fluorocarboxylic Acids: A QM/MM Approach. *Environ. Sci. Technol.*, **55**, 9817-9825.
 122. Oltmanns, R.H., Muller, R., Otto, M.K. and Lingens, F. (1989) Evidence for a new pathway in the bacterial-degradation of 4-fluorobenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2499-2504.
 123. Tong, W., Huang, Q., Li, M. and Wang, J.B. (2019) Enzyme-catalyzed C-F bond formation and cleavage. *Bioresour. Bioprocess.*, **6**.
 124. De Marco, R., Clarke, G. and Pejic, B. (2007) Ion-selective electrode potentiometry in environmental analysis. *Electroanalysis*, **19**, 1987-2001.
 125. vandenHoop, M., Cleven, R., vanStaden, J.J. and Neele, J. (1996) Analysis of fluoride in rain water - Comparison of capillary electrophoresis with ion chromatography and ion-selective electrode potentiometry. *J. Chromatogr. A*, **739**, 241-248.
 126. Zhou, Y., Zhang, J.F. and Yoon, J. (2014) Fluorescence and Colorimetric Chemosensors for Fluoride-Ion Detection. *Chem. Rev.*, **114**, 5511-5571.
 127. Kim, S.Y., Park, J., Koh, M., Park, S.B. and Hong, J.-I. (2009) Fluorescent probe for detection of fluoride in water and bioimaging in A549 human lung carcinoma cells. *Chem. Commun.*, 4735-4737.
 128. Kim, D., Singha, S., Wang, T., Seo, E., Lee, J.H., Lee, S.J., Kim, K.H. and Ahn, K.H. (2012) In vivo two-photon fluorescent imaging of fluoride with a desilylation-based reactive probe. *Chem. Commun.*, **48**, 10243-10245.
 129. Ke, B.W., Chen, W.X., Ni, N.T., Cheng, Y.F., Dai, C.F., Dinh, H. and Wang, B.H. (2013) A fluorescent probe for rapid aqueous fluoride detection and cell imaging. *Chem. Commun.*, **49**, 2494-2496.
 130. Zhou, X.Q., Lai, R., Li, H. and Stains, C.I. (2015) The 8-Silyloxyquinoline Scaffold as a Versatile Platform for the Sensitive Detection of Aqueous Fluoride. *Anal. Chem.*, **87**, 4081-4086.
 131. Wei, G.H., Yin, J.X., Ma, X., Yu, S.Y., Wei, D.B. and Du, Y.G. (2011) A carbohydrate modified fluoride ion sensor and its applications. *Anal. Chim. Acta*, **703**, 219-225.
 132. Rydzik, A.M., Leung, I.K.H., Kochan, G.T., Thalhammer, A., Oppermann, U., Claridge, T.D.W. and Schofield, C.J. (2012) Development and Application of a Fluoride-Detection-Based Fluorescence Assay for gamma-Butyrobetaine Hydroxylase. *ChemBioChem*, **13**, 1559-1563.
 133. Dambrova, M., Liepinsh, E. and Kalvinsh, I. (2002) Mildronate: Cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 275-279.
 134. Liepinsh, E., Vilskersts, R., Loca, D., Kirjanova, O., Pugovichs, O., Kalvinsh, I. and Dambrova, M. (2006) Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **48**, 314-319.
 135. Liu, B., Li, S. and Hu, J. (2004) Technological advances in high-throughput screening. *Am. J. Pharmacogenomics*, **4**, 263-276.
 136. Dalvit, C., Fagerness, P.E., Hadden, D.T.A., Sarver, R.W. and Stockman, B.J. (2003) Fluorine-NMR experiments for high-throughput screening: Theoretical aspects, practical considerations, and range of applicability. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7696-7703.
 137. Dalvit, C., Ardini, E., Flocco, M., Fogliatto, G.P., Mongelli, N. and Veronesi, M. (2003) A general NMR method for rapid, efficient, and reliable biochemical screening. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14620-14625.
 138. Dalvit, C. (2007) Ligand- and substrate-based F-19 NMR screening: Principles and applications to drug discovery. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **51**, 243-1.
 139. Lambruschini, C., Veronesi, M., Romeo, E., Garau, G., Bandiera, T., Piomelli, D., Scarpelli, R. and Dalvit, C. (2013) Development of Fragment-Based n-FABS NMR Screening Applied to the Membrane Enzyme FAAH. *ChemBioChem*, **14**, 1611-1619.
 140. Dalvit, C., Veronesi, M. and Vulpetti, A. (2020) Fluorine NMR functional screening: from purified enzymes to human intact living cells. *J. Biomol. NMR*, **74**, 613-631.
 141. Stockman, B.J., Lodovice, I.J., Fisher, D.A., McColl, A.S. and Xie, Z. (2007) A nuclear magnetic resonance-based functional assay for nicotinamide adenine dinucleotide synthetase. *J. Biomol. Screening*, **12**, 457-463.
 142. Stockman, B.J. (2008) 2-Fluoro-ATP as a Versatile Tool for ¹⁹F NMR-Based Activity Screening. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 5870-5871.
 143. Kaczmarek, A., Gorb, L., Sadlej, A.J. and Leszczynski, J. (2004) Sarin and soman: Structure and properties. *Struct. Chem.*, **15**, 517-525.
 144. Gozdzalik, J.T., Adamczyk-Wozniak, A. and Sporzynski, A. (2018) Influence of fluorine substituents on the properties of phenylboronic compounds. *Pure Appl. Chem.*, **90**, 677-702.

145. Bissey, J.E. (1967) Some aspects of d-orbital participation in phosphorous and silicon chemistry. *J. Chem. Educ.*, **44**, 95-8.
146. Batsanov, S.S. (2001) Van der Waals radii of elements. *Inorg. Mater.*, **37**, 871-885.
147. Dalvit, C. and Vulpetti, A. (2016) Weak Intermolecular Hydrogen Bonds with Fluorine: Detection and Implications for Enzymatic/Chemical Reactions, Chemical Properties, and Ligand/Protein Fluorine NMR Screening. *Chem. Eur. J.*, **22**, 7592-7601.
148. Wittmann, R. (1963) Die reaktion der phosphorsäuren mit 2,4-dinitro-fluorbenzol. Eine neue synthese von monofluorophosphorsäuremonoestern. *Chem. Ber. Recl.*, **96**, 771-8.
149. Nichol, A.W., Nomura, A. and Hampton, A. (1967) Studies on phosphate binding sites of inosinic acid dehydrogenase and adenylosuccinate synthetase. *Biochemistry*, **6**, 1008-8.
150. Matulicadamic, J., Rosenberg, I., Arzumanov, A.A., Dyatkina, N.B., Shirokova, E.A., Krayevsky, A.A. and Watanabe, K.A. (1993) A simple multi-gram synthesis of 5'-hydrogenphosphonates and 5'-phosphorofluoridates of sugar modified nucleosides. *Nucleosides & Nucleotides*, **12**, 1085-1092.
151. Bollmark, M. and Stawinski, J. (1998) Nucleotide analogues containing the P-F bond. An overview of the synthetic methods. *Nucleosides & Nucleotides*, **17**, 663-680.
152. Bollmark, M. and Stawinski, J. (1996) A facile access to nucleoside phosphorofluoridate, nucleoside phosphorofluoridothioate, and nucleoside phosphorofluoridodithioate monoesters. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5739-5742.
153. Bollmark, M., Zain, R. and Stawinski, J. (1996) A new entry to nucleoside phosphorofluoridate and nucleoside phosphorofluoridothioate diesters. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 3537-3540.
154. Bollmark, M. and Stawinski, J. (1997) A new method for the formation of the P-F bond. *Chem. Commun.*, 991-992.
155. Bollmark, M. and Stawinski, J. (1999) A mild method for the preparation of nucleoside phosphorofluoridate and phosphorofluoridothioate diesters. *Nucleosides & Nucleotides*, **18**, 1243-1244.
156. Haley, B. and Yount, R.G. (1972) γ -Fluoroadenosine triphosphate. Synthesis, properties, and interaction with myosin and heavy meromyosin. *Biochemistry*, **11**, 2863-2871.
157. Stumber, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Kalbitzer, H.R., Jahn, W. and Geyer, M. (2002) Synthesis, characterization and application of two nucleoside triphosphate analogues, GTP γ NH₂ and GTP γ F. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3270-3278.
158. Armstrong, V.W. and Eckstein, F. (1976) Interaction of Substrate Analogues with *Escherichia coli* DNA-Dependent RNA Polymerase. *Eur. J. Biochem.*, **70**, 33-38.
159. Guranowski, A., Wojdyla, A.M., Pietrowska-Borek, M., Bieganski, P., Khurs, E.N., Cliff, M.J., Blackburn, G.M., Blaziak, D. and Stec, W.J. (2008) Fhit proteins can also recognize substrates other than dinucleoside polyphosphates. *Febs Lett.*, **582**, 3152-3158.
160. Guranowski, A., Wojdyla, A.M., Zimny, J., Wypijewska, A., Kowalska, J., Lukaszewicz, M., Jemielity, J., Darzynkiewicz, E., Jagiello, A. and Bieganski, P. (2010) Recognition of different nucleotidyl-derivatives as substrates of reactions catalyzed by various HIT-proteins. *New. J. Chem.*, **34**, 888-893.
161. Kučerová, Z. and Škoda, J. (1971) Resistance of uridine 5'-fluorophosphate to alkaline phosphatase and its sensitivity to 5'-nucleotidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **247**, 194-196.
162. Satishchandran, C., Myers, C.B. and Markham, G.D. (1992) Adenosine-5'-O-(2-fluorodiphosphate) (ADP β F), an analog of adenosine-5'-phosphosulfate. *Bioorg. Chem.*, **20**, 107-114.
163. Egion, D., Arzumanov, A.A., Dyatkina, N.B., Aubertin, A.M., Imbach, J.L., Gosselin, G., Krayevsky, A. and Périaud, C. (2001) Synthesis, Anti-HIV Activity, and Stability Studies of 5'-Phosphorofluoridate Derivatives of AZT. *Bioorg. Chem.*, **29**, 333-344.
164. Al-Saleh, S.S.M. and Khan, S. (2011) Purification and characterization of phosphodiesterase I from *Walterinnesia aegyptia* venom. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **41**, 262-277.
165. Brenner, C. (2002) Hint, Fhit, and GalT: Function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry*, **41**, 9003-9014.
166. Brenner, C. (2014) Histidine Triad (HIT) Superfamily. John Wiley & Sons, Ltd, John Wiley & Sons, Ltd.
167. Martin, J., St-Pierre, M.V. and Dufour, J.-F. (2011) Hit proteins, mitochondria and cancer. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*, **1807**, 626-632.
168. Seraphin, B. (1992), DNA Sequence, Vol. 3, pp. 177-179.
169. Bail, S. and Kiledjian, M. (2008) DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *RNA Biol.*, **5**, 216-219.
170. Warminski, M., Sikorski, P.J., Kowalska, J. and Jemielity, J. (2017) Applications of Phosphate

- Modification and Labeling to Study (m) RNA Caps. *Top. Curr. Chem.*, **375**.
171. Singh, J., Salcius, M., Liu, S.W., Staker, B.L., Mishra, R., Thurmond, J., Michaud, G., Mattoon, D.R., Printen, J., Christensen, J. *et al.* (2008) DcpS as a Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy. *ACS Chem. Biol.*, **3**, 711-722.
 172. Van Meerbeke, J.P., Gibbs, R.M., Plasterer, H.L., Miao, W., Feng, Z., Lin, M.-Y., Rucki, A.A., Wee, C.D., Xia, B., Sharma, S. *et al.* (2013) The DcpS inhibitor RG3039 improves motor function in SMA mice. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 4074-4083.
 173. Krakowiak, A. and Fryc, I. (2012) Histidine triad protein superfamily--biological function and enzymatic activity. *Postepy Biochemii*, **58**, 302-313.
 174. Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M.G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T. *et al.* (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site acid renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, **84**, 587-597.
 175. Lima, C.D., Damico, K.L., Naday, I., Rosenbaum, G., Westbrook, E.M. and Hendrickson, W.A. (1997) MAD analysis of FHIT, a putative human tumor suppressor from the HIT protein family. *Structure*, **5**, 763-774.
 176. Abend, A., Garrison, P.N., Barnes, L.D. and Frey, P.A. (1999) Stereochemical retention of the configuration in the action of Fhit on phosphorus-chiral substrates. *Biochemistry*, **38**, 3668-3676.
 177. Guranowski, A., Wojdyla, A.M., Pietrowska-Borek, M., Bieganski, P., Khurs, E.N., Cliff, M.J., Blackburn, G.M., Blaziak, D. and Stec, W.J. (2008) Fhit proteins can also recognize substrates other than dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett.*, **582**, 3152-3158.
 178. Campiglio, M., Bianchi, F., Andriani, F., Sozzi, G., Tagliabue, E., Menard, S. and Roz, L. (2006) Diadenosines as FHIT-ness instructors. *J. Cell. Physiol.*, **208**, 274-281.
 179. Saldiyar, J.C., Shibata, H. and Huebner, K. (2010) Pathology and Biology Associated With the Fragile FHIT Gene and Gene Product. *J. Cell. Biochem.*, **109**, 858-865.
 180. Pace, H.C., Garrison, P.N., Robinson, A.K., Barnes, L.D., Draganescu, A., Rosler, A., Blackburn, G.M., Siprashvili, Z., Croce, C.M., Huebner, K. *et al.* (1998) Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of Fhit-substrate complexes as the active signaling form of Fhit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 5484-5489.
 181. Seignani, C., Calin, G.A., Cesari, R., Sarti, M., Ishii, H., Yendamuri, S., Vecchione, A., Trapasso, F. and Croce, C.M. (2003) Restoration of fragile Histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, **63**, 1183-1187.
 182. Ji, L., Fang, B.L., Yen, N., Fong, K., Minna, J.D. and Roth, J.A. (1999) Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res.*, **59**, 3333-3339.
 183. Fong, L.Y.Y., Fidanza, V., Zanesi, N., Lock, L., Siracusa, L., Mancini, R., Siprashvili, Z., Ottey, M., Martin, S.E., Dolsky, R. *et al.* (2000) Induction of a Muir-Torre-like syndrome in Fhit deficient mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 68-68.
 184. Hacker, S.M., Mortensen, F., Scheffner, M. and Marx, A. (2014) Selective Monitoring of the Enzymatic Activity of the Tumor Suppressor Fhit. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 10247-10250.
 185. Lange, S., Hacker, S.M., Schmid, P., Scheffner, M. and Marx, A. (2017) Small-Molecule Inhibitors of the Tumor Suppressor Fhit. *ChemBioChem*, **18**, 1707-1711.
 186. Draganescu, A., Hodawadekar, S.C., Gee, K.R. and Brenner, C. (2000) Fhit-nucleotide specificity probed with novel fluorescent and fluorogenic substrates. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4555-4560.
 187. Varum, J.M., Baraniak, J., Kaczmarek, R., Stec, W.J. and Brenner, C. (2001) Di-, tri- and tetra-5'-O-phosphorothioadenosyl substituted polyols as inhibitors of Fhit: Importance of the alpha-beta bridging oxygen and beta phosphorus replacement. *BMC Chemical Biology*, **1**, 3-3.
 188. Taverniti, V. and Seraphin, B. (2015) Elimination of cap structures generated by mRNA decay involves the new scavenger mRNA decapping enzyme Aph1/FHIT together with DcpS. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 482-492.
 189. Mukaiyama, T. and Hashimoto, M. (1971) Phosphorylation by oxidation-reduction condensation - preparation of active phosphorylating reagents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **44**, 2284-2284.
 190. Baranowski, M.R., Nowicka, A., Rydzik, A.M., Warminski, M., Kasprzyk, R., Wojtczak, B.A., Wojcik, J., Claridge, T.D., Kowalska, J. and Jemielity, J. (2015) Synthesis of fluorophosphate nucleotide analogues and their characterization as tools for ¹⁹F NMR studies. *J. Org. Chem.*, **80**, 3982-3997.
 191. Yang, X.-F., Ye, S.-J., Bai, Q. and Wang, X.-Q. (2007) A fluorescein-based fluorogenic probe for fluoride ion based on the fluoride-induced cleavage of tert-butyl dimethylsilyl ether. *J. Fluoresc.*, **17**, 81-87.
 192. Baranowski, M.R., Nowicka, A., Jemielity, J. and Kowalska, J. (2016) A fluorescent HTS assay for phosphohydrolases based on nucleoside 5'-

- fluorophosphates: its application in screening for inhibitors of mRNA decapping scavenger and PDE-I. *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 4595-4604.
193. Zhang, J.H., Chung, T.D.Y. and Oldenburg, K.R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screening*, **4**, 67-73.
 194. Wojtczak, B.A., Sikorski, P.J., Fac-Dabrowska, K., Nowicka, A., Warminski, M., Kubacka, D., Nowak, E., Nowotny, M., Kowalska, J. and Jemielity, J. (2018) 5'-Phosphorothiolate Dinucleotide Cap Analogues: Reagents for Messenger RNA Modification and Potent Small-Molecular Inhibitors of Decapping Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 5987-5999.
 195. van Hoof, A. and Parker, R. (2002) Messenger RNA degradation: Beginning at the end. *Curr. Biol.*, **12**, R285-R287.
 196. Chang, J.H., Jiao, X., Chiba, K., Oh, C., Martin, C.E., Kiledjian, M. and Tong, L. (2012) Dxo1 is a new type of eukaryotic enzyme with both decapping and 5'-3' exoribonuclease activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1011-U1062.
 197. Jiao, X.F., Chang, J.H., Kilic, T., Tong, L. and Kiledjian, M. (2013) A Mammalian Pre-mRNA 5' End Capping Quality Control Mechanism and an Unexpected Link of Capping to Pre-mRNA Processing. *Mol. Cell*, **50**, 104-115.
 198. Picard-Jean, F., Brand, C., Tremblay-Letourneau, M., Allaire, A., Beaudoin, M.C., Boudreault, S., Duval, C., Rainville-Sirois, J., Robert, F., Pelletier, J. et al. (2018) 2'-O-methylation of the mRNA cap protects RNAs from decapping and degradation by DXO. *PLoS One*, **13**.
 199. Rydzik, A.M., Warminski, M., Sikorski, P.J., Baranowski, M.R., Walczak, S., Kowalska, J., Zuberek, J., Lukaszewicz, M., Nowak, E., Claridge, T.D.W. et al. (2017) mRNA cap analogues substituted in the tetraphosphate chain with CX₂: identification of O-to-CCl₂ as the first bridging modification that confers resistance to decapping without impairing translation. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 8661-8675.
 200. Strenkowska, M., Grzela, R., Majewski, M., Wnek, K., Kowalska, J., Lukaszewicz, M., Zuberek, J., Darzynkiewicz, E., Kuhn, A.N., Sahin, U. et al. (2016) Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 9578-9590.
 201. Blake, R.D. and Lefoley, S.G. (1978) Spectral analysis of high-resolution direct-derivative melting curves of dna for instantaneous and total base composition. *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 233-246.
 202. Blake, R.D. and Delcourt, S.G. (1998) Thermal stability of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3323-3332.
 203. SantaLucia, J. and Hicks, D. (2004) The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu. Rev. Biophys. Biom.*, **33**, 415-440.
 204. Rossetti, G., Dans, P.D., Gomez-Pinto, I., Ivani, I., Gonzalez, C. and Orozco, M. (2015) The structural impact of DNA mismatches. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 4309-4321.
 205. Modrich, P. (1987) DNA Mismatch Correction. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, pp. 435-466.
 206. Peyret, N., Seneviratne, P.A., Allawi, H.T. and SantaLucia, J. (1999) Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A-A, C-C, G-G, and T-T mismatches. *Biochemistry*, **38**, 3468-3477.
 207. Fareed Aboul-ela, D.K., Ignacio Tinoco. (1985) Base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA₃XA₃G + dCT₃YT₃G (X,Y=A,C,G,T) *Nucleic Acids Res.*, **13**, pp. 4811-4824.
 208. Urakawa, H., El Fantroussi, S., Smidt, H., Smoot, J.C., Tribou, E.H., Kelly, J.J., Noble, P.A. and Stahl, D.A. (2003) Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2848-2856.
 209. Oliveira, L.M., Long, A.S., Brown, T., Fox, K.R. and Weber, G. (2020) Melting temperature measurement and mesoscopic evaluation of single, double and triple DNA mismatches. *Chem. Sci.*, **11**, 8273-8287.
 210. Mergny, J.L., Phan, A.T. and Lacroix, L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.*, **435**, 74-78.
 211. Mathad, R.I. and Yang, D.Z. (2011) G-Quadruplex Structures and G-Quadruplex-Interactive Compounds. *Telomeres and Telomerase: Methods and Protocols*, **735**, 77-96.
 212. Paeschke, K., Bochman, M.L., Garcia, P.D., Cejka, P., Friedman, K.L., Kowalczykowski, S.C. and Zakian, V.A. (2013) Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature*, **497**, 458-462.
 213. Lopes, J., Piazza, A., Bermejo, R., Kriegsman, B., Colosio, A., Teulade-Fichou, M.P., Foiani, M. and Nicolas, A. (2011) G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. *EMBO J.*, **30**, 4033-4046.
 214. Siddiqui-Jain, A., Grand, C.L., Bearss, D.J. and Hurley, L.H. (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11593-11598.
 215. Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Kazuo, S., Wierzba, K. and Hurley, L.H. (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor

- that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2098-2099.
216. Wang, K.Y., Krawczyk, S.H., Bischofberger, N., Swaminathan, S. and Bolton, P.H. (1993) The tertiary structure of a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity. *Biochemistry*, **32**, 11285-11292.
 217. Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. and Toole, J.J. (1992) Selection of single-stranded-dna molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, **355**, 564-566.
 218. Avino, A., Fabrega, C., Tintore, M. and Eritja, R. (2012) Thrombin Binding Aptamer, More than a Simple Aptamer: Chemically Modified Derivatives and Biomedical Applications. *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 2036-2047.
 219. Macaya, R.F., Schultze, P., Smith, F.W., Roe, J.A. and Feigon, J. (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3745-3749.
 220. Foster, M.P., McElroy, C.A. and Amero, C.D. (2007) Solution NMR of large molecules and assemblies. *Biochemistry*, **46**, 331-340.
 221. Wright, E.P., Huppert, J.L. and Waller, Z.A.E. (2017) Identification of multiple genomic DNA sequences which form i-motif structures at neutral pH. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2951-2959.
 222. Fleming, A.M., Ding, Y., Rogers, R.A., Zhu, J., Burton, A.D., Carlisle, C.B. and Burrows, C.J. (2017) 4n-1 Is a "Sweet Spot" in DNA i-Motif Folding of 2'-Deoxycytidine Homopolymers. *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 4682-4689.
 223. Rajendran, A., Nakano, S. and Sugimoto, N. (2010) Molecular crowding of the cosolutes induces an intramolecular i-motif structure of triplet repeat DNA oligomers at neutral pH. *Chem. Commun.*, **46**, 1299-1301.
 224. Pagano, A., Iaccarino, N., Abdelhamid, M.A.S., Brancaccio, D., Garzarella, E.U., Di Porzio, A., Novellino, E., Waller, Z.A.E., Pagano, B., Amato, J. et al. (2018) Common G-Quadruplex Binding Agents Found to Interact With i-Motif-Forming DNA: Unexpected Multi-Target-Directed Compounds. *Front. Chem.*, **6**.
 225. Sheng, Q., Neaverson, J.C., Mahmoud, T., Stevenson, C.E.M., Matthews, S.E. and Waller, Z.A.E. (2017) Identification of new DNA i-motif binding ligands through a fluorescent intercalator displacement assay. *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 5669-5673.
 226. Sabale, P.M., Tanpure, A.A. and Srivatsan, S.G. (2018) Probing the competition between duplex and G-quadruplex/i-motif structures using a conformation-sensitive fluorescent nucleoside probe. *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 4141-4150.
 227. Fenna, C.P., Wilkinson, V.J., Arnold, J.R.P., Cosstick, R. and Fisher, J. (2008) The effect of 2'-fluorine substitutions on DNA i-motif conformation and stability. *Chem. Commun.*, 3567-3569.
 228. Tsvetkov, V.B., Zatsepin, T.S., Belyaev, E.S., Kostyukevich, Y.I., Shpakovski, G.V., Podgorsky, V.V., Pozmogova, G.E., Varizhuk, A.M. and Aralov, A.V. (2018) i-Clamp phenoxazine for the fine tuning of DNA i-motif stability. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2751-2764.
 229. Abou Assi, H., Harkness, R.W., Martin-Pintado, N., Wilds, C.J., Campos-Olivas, R., Mittermaier, A.K., Gonzalez, C. and Damha, M.J. (2016) Stabilization of i-motif structures by 2'-beta-fluorination of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4998-5009.
 230. Kanaori, K., Maeda, A., Kanehara, H., Tajima, K. and Makino, K. (1998) ¹H nuclear magnetic resonance study on equilibrium between two four-stranded solution conformations of short d(CnT). *Biochemistry*, **37**, 12979-12986.
 231. Lieblein, A.L., Buck, J., Schlepckow, K., Furtig, B. and Schwalbe, H. (2012) Time-Resolved NMR Spectroscopic Studies of DNA i-Motif Folding Reveal Kinetic Partitioning. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 250-253.
 232. Fiel, R.J., Howard, J.C., Mark, E.H. and Dattagupta, N. (1979) Interaction of DNA with a porphyrin ligand - evidence for intercalation. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3093-3118.
 233. Izbicka, E., Wheelhouse, R.T., Raymond, E., Davidson, K.K., Lawrence, R.A., Sun, D.Y., Windle, B.E., Hurley, L.H. and Von Hoff, D.D. (1999) Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res.*, **59**, 639-644.
 234. Rapozzi, V., Zorzet, S., Zacchigna, M., Della Pietra, E., Cogoi, S. and Xodo, L.E. (2014) Anticancer activity of cationic porphyrins in melanoma tumour-bearing mice and mechanistic in vitro studies. *Molecular Cancer*, **13**.
 235. Rha, S.Y., Izbicka, E., Lawrence, R., Davidson, K., Sun, D.K., Moyer, M.P., Roodman, G.D., Hurley, L. and Von Hoff, D. (2000) Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines. *Clinical Cancer Res.*, **6**, 987-993.
 236. Fedoroff, O.Y., Rangan, A., Chemeris, V.V. and Hurley, L.H. (2000) Cationic porphyrins promote the formation of i-motif DNA and bind peripherally by a nonintercalative mechanism. *Biochemistry*, **39**, 15083-15090.
 237. Debnath, M., Fatma, K. and Dash, J. (2019) Chemical Regulation of DNA i-Motifs for Nanobiotechnology and Therapeutics. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 2942-2957.
 238. Wright, E.P., Day, H.A., Ibrahim, A.M., Kumar, J., Boswell, L.J.E., Huguin, C., Stevenson, C.E.M., Pors, K. and Waller, Z.A.E. (2016) Mitoxantrone and Analogues Bind and

- Stabilize i-Motif Forming DNA Sequences. *Sci. Rep.*, **6**.
239. Rogers, R.A., Fleming, A.M. and Burrows, C.J. (2018) Unusual Isothermal Hysteresis in DNA i-Motif pH Transitions: A Study of the RAD17 Promoter Sequence. *Biophys. J.*, **114**, 1804-1815.
 240. Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H.L. and Marchand, C. (2010) DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.*, **17**, 421-433.
 241. Hortobagyi, G.N. (1997) Anthracyclines in the treatment of cancer - An overview. *Drugs*, **54**, 1-7.
 242. Goodin, D.S., Frohman, E.M., Garmany, G.P., Halper, J., Likosky, W.H., Lublin, F.D., Silberberg, D.H., Stuart, W.H. and van den Noort, S. (2002) Disease modifying therapies in multiple sclerosis - Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology*, **58**, 169-178.
 243. Chrominski, M., Baranowski, M.R., Chmielinski, S., Kowalska, J. and Jemielity, J. (2020) Synthesis of Trifluoromethylated Purine Ribonucleotides and Their Evaluation as ^{19}F NMR Probes. *The J. Org. Chem.*, **85**, 3440-3453.
 244. Liu, S.W., Jiao, X.F., Liu, H.D., Gu, M.G., Lima, C.D. and Kiledjian, M. (2004) Functional analysis of mRNA scavenger decapping enzymes. *RNA*, **10**, 1412-1422.
 245. Gogliotti, R.G., Cardona, H., Singh, J., Bail, S., Emery, C., Kuntz, N., Jorgensen, M., Durens, M., Xia, B., Barlow, C. *et al.* (2013) The DcpS inhibitor RG3039 improves survival, function and motor unit pathologies in two SMA mouse models. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 4084-4101.
 246. Yamauchi, T., Masuda, T., Canver, M.C., Seiler, M., Semba, Y., Shboul, M., Al-Raqad, M., Maeda, M., Schoonenberg, V.A.C., Cole, M.A. *et al.* (2018) Genome-wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies Leukemia-Specific Dependence on a Pre-mRNA Metabolic Pathway Regulated by DCPs. *Cancer Cell*, **33**, 386-400.
 247. Cavaluzzi, M.J. and Borer, P.N. (2004) Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.*, **32**.
 248. Wypijewska, A., Bojarska, E., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Jemielity, J., Davis, R.E. and Darzynkiewicz, E. (2010) Structural requirements for *Caenorhabditis elegans* DcpS substrates based on fluorescence and HPLC enzyme kinetic studies. *FEBS J.*, **277**, 3003-3013.
 249. Kowalska, J., Wypijewska del Nogal, A., Darzynkiewicz, Z.M., Buck, J., Nicola, C., Kuhn, A.N., Lukaszewicz, M., Zuberek, J., Strenkowska, M., Ziemniak, M. *et al.* (2014) Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 10245-10264.
 250. Rydzik, A.M., Lukaszewicz, M., Zuberek, J., Kowalska, J., Darzynkiewicz, Z.M., Darzynkiewicz, E. and Jemielity, J. (2009) Synthetic dinucleotide mRNA cap analogs with tetraphosphate 5'-'5' bridge containing methylenebis(phosphonate) modification. *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 4763-4776.
 251. Piotto, M., Saudek, V. and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum nmr-spectroscopy of aqueous-solutions. *J. Biomol. NMR*, **2**, 661-665.
 252. Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. and Saudek, V. (1993) Gradient-tailored water suppression for ^1H - ^{15}N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **102**, 241-245.
 253. Shirini, F., Beigbaghlou, S.S., Atghia, S.V. and Mousazadeh, S.A.R. (2013) Multi-component one-pot synthesis of unsymmetrical dihydro-5H-indeno 1,2-b quinolines as new pH indicators. *Dyes and Pigm.*, **97**, 19-25.
 254. Kozarski, M., Kubacka, D., Wojtczak, B.A., Kasprzyk, R., Baranowski, M.R. and Kowalska, J. (2018) 7-Methylguanosine monophosphate analogues with 5'-(1,2,3-triazoyl) moiety: Synthesis and evaluation as the inhibitors of cNIIIB nucleotidase. *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 191-199.

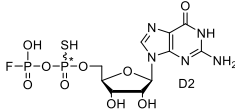
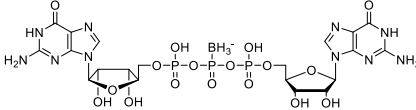
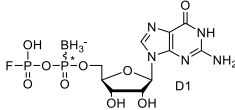
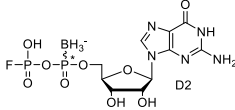
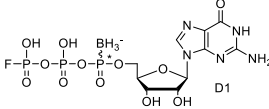
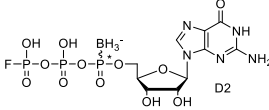
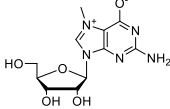
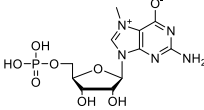
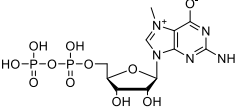
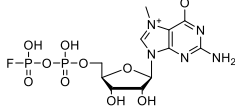
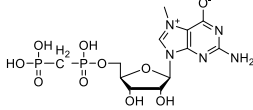
7. Załączniki – tabele

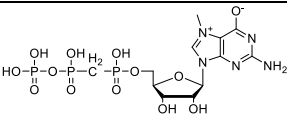
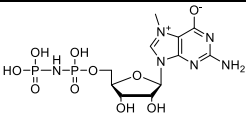
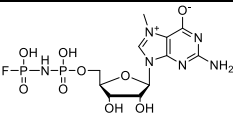
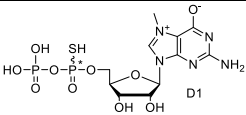
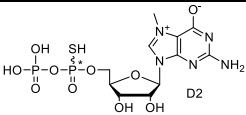
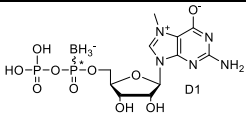
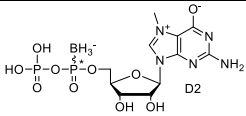
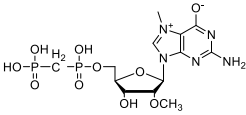
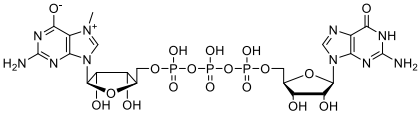
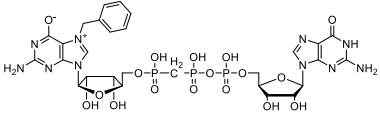
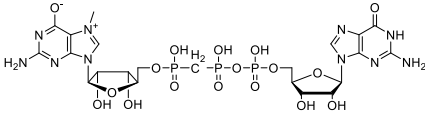
Załącznik 1 - Tabela Z1. Biblioteka związków BZ-1 wykorzystana w wysokoprzepustowym badaniu przesiewowym do poszukiwania inhibitorów enzymu PDE-I. Wszystkie związki były w postaci soli sodowych (Na^+) lub amonowych (NH_4^+). Przedstawiono struktury związków oraz procent inhibicji (im wyższa wartość, tym lepszy inhibitor).

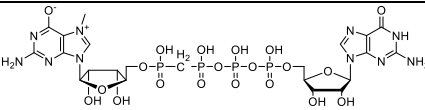
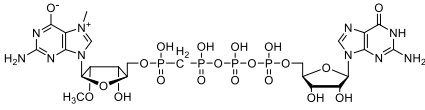
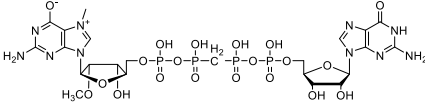
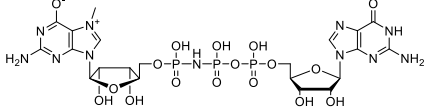
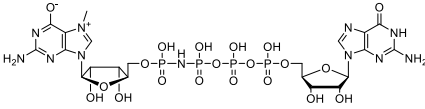
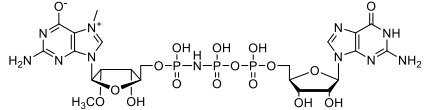
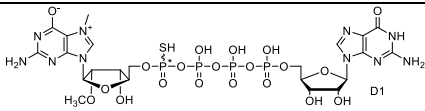
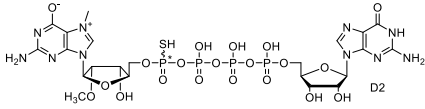
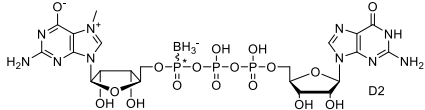
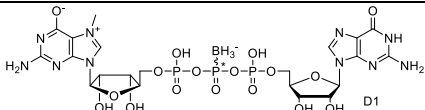
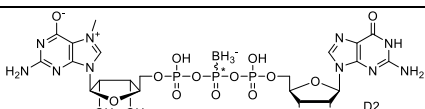
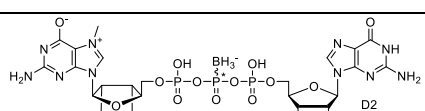
	Struktura	PDE-I
		%inhibicji
Analogi zawierające adeninę		
1		32,4 ± 4,5
2		67,8 ± 2,6
3		91,9 ± 4,5
4		61,4 ± 5,6
5		55,4 ± 3,0
6		65,4 ± 2,9
7		43,3 ± 3,8
8		53,5 ± 3,1
9		48,8 ± 3,6

10		$1,0 \pm 6,4$
11		$47,7 \pm 3,9$
12		$33,8 \pm 4,3$
13		$37,7 \pm 4,1$
14		$100,3 \pm 1,7$
15		$18,0 \pm 5,3$
16		$37,0 \pm 4,6$
17		$-7,7 \pm 6,9$
18		$-2,8 \pm 7,3$
19		$5,0 \pm 6,2$
20		$19,7 \pm 5,3$

21		21,6 ± 5,0
22		19,7 ± 5,2
Analogi zawierające guaninę		
23		46,4 ± 3,6
24		2,2 ± 6,3
25		16,8 ± 5,4
26		93,7 ± 1,1
27		18,0 ± 5,3
28		-0,3 ± 6,4
29		3,6 ± 6,2
30		-0,6 ± 6,4
31		85,4 ± 1,8

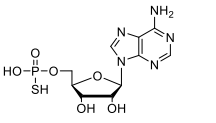
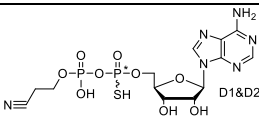
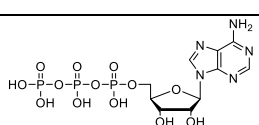
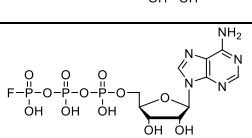
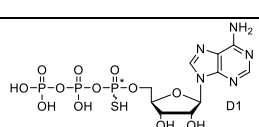
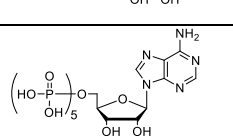
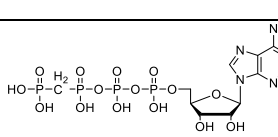
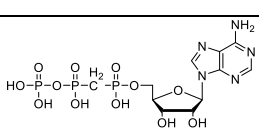
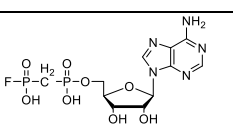
32		17,2 ± 5,4
33		59,7 ± 3,2
34		10,5 ± 5,8
35		20,5 ± 5,1
36		18,0 ± 5,3
37		19,0 ± 6,6
Analogi zawierające 7-metyloguaninę		
38		-2,7 ± 6,7
39		-2,4 ± 6,6
40		-4,2 ± 6,7
41		15,7 ± 5,5
42		-4,4 ± 9,1

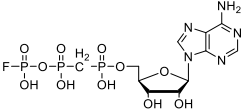
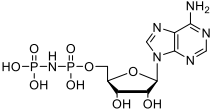
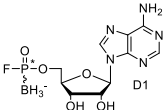
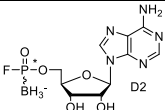
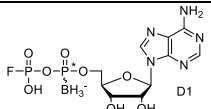
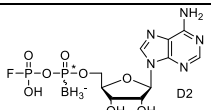
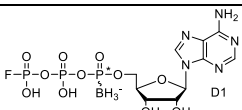
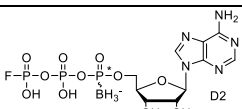
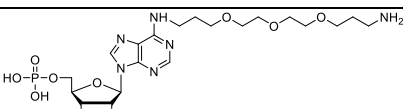
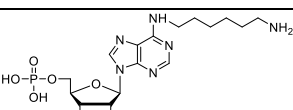
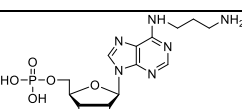
43		$-1,7 \pm 6,6$
44		$-3,7 \pm 6,7$
45		$-7,0 \pm 6,9$
46		$-2,0 \pm 6,6$
47		$6,4 \pm 6,0$
48		$7,8 \pm 6,4$
49		$-1,6 \pm 6,6$
50		$0,6 \pm 6,5$
51		$34,5 \pm 4,4$
52		$25,5 \pm 4,9$
53		$26,7 \pm 5,9$

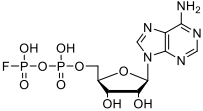
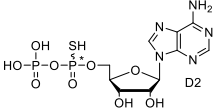
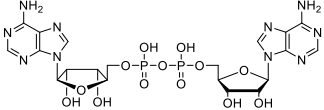
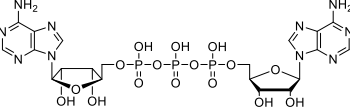
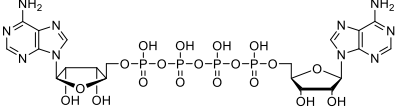
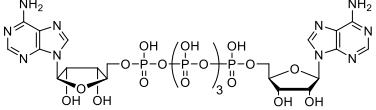
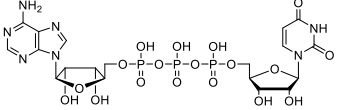
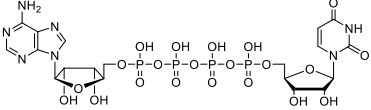
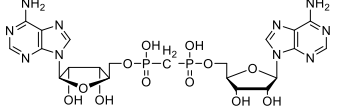
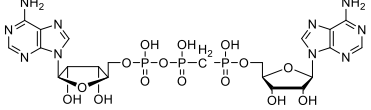
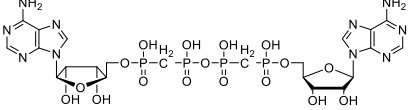
54		$13,6 \pm 5,6$
55		$20,5 \pm 7,9$
56		$14,6 \pm 5,6$
57		$12,2 \pm 5,7$
58		$15,2 \pm 5,6$
59		$11,6 \pm 5,8$
60		$37,8 \pm 5,2$
61		$36,7 \pm 4,2$
62		$38,8 \pm 4,1$
63		$39,1 \pm 4,0$
64		$43,8 \pm 3,8$
65		$43,0 \pm 3,8$

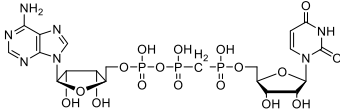
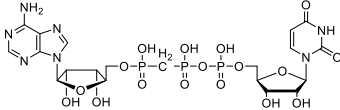
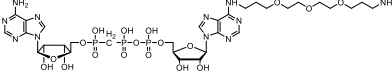
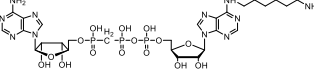
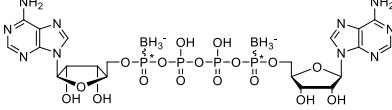
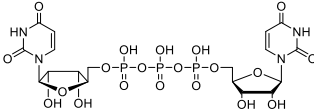
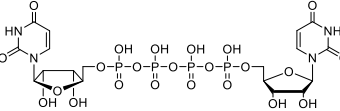
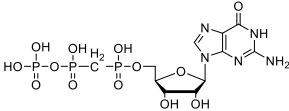
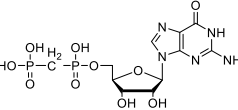
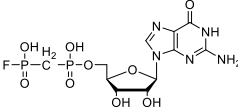
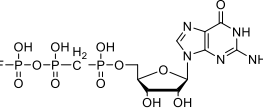
66		$13,7 \pm 5,6$
67		$-3,7 \pm 6,7$
Inne		
68		$-5,1 \pm 6,8$
69		$9,0 \pm 7,7$
70		$74,4 \pm 6,1$
71		$19,4 \pm 5,3$
72		$44,6 \pm 3,7$
73		$46,2 \pm 5,8$
74		$45,4 \pm 3,7$
75		$37,3 \pm 4,1$
76		$35,2 \pm 4,3$

Załącznik 2 - Tabela Z2. Biblioteka związków BZ-2 wykorzystana w wysokoprzepustowym badaniu przesiewowym do poszukiwania inhibitorów enzymów hDcpS, hFhit oraz AtFhit. Wszystkie związki były w postaci soli sodowych (Na^+) lub amonowych (NH_4^+). Przedstawiono struktury związków oraz procent inhibicji dla każdego z enzymów (im wyższa wartość, tym lepszy inhibitor).

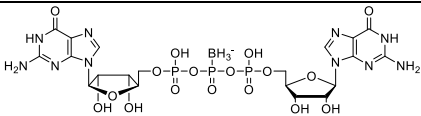
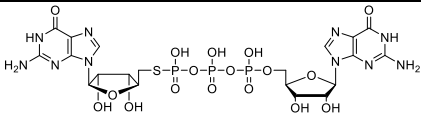
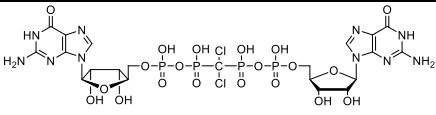
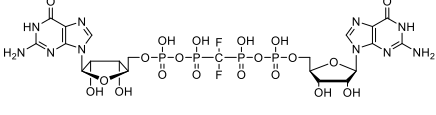
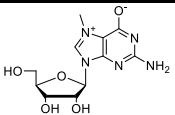
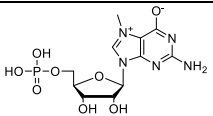
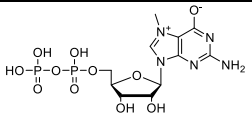
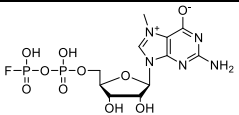
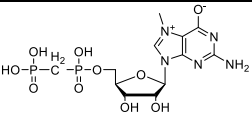
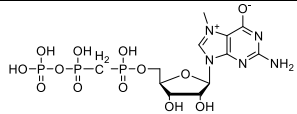
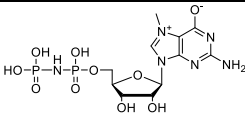
Struktura	hDcpS	hFhit	AtFhit
	% _{inhibicji}	% _{inhibicji}	% _{inhibicji}
Analogi zawierające adeninę			
1 	11,3 ± 7,4	3,0 ± 7,0	-8,3 ± 19,1
2 	8,0 ± 8,9	15,0 ± 4,0	18,3 ± 12,9
3 	4,0 ± 3,0	1,0 ± 21,0	4,0 ± 1,7
4 	0 ± 3,0	-2,0 ± 16,0	-6,3 ± 6,7
5 	-2,0 ± 8,0	1,0 ± 19,0	-27,0 ± 3,5
6 	14,3 ± 0,6	1,0 ± 6,0	6,0 ± 5,6
7 	15,7 ± 10,1	-7,0 ± 4,0	3,3 ± 11,7
8 	-7,0 ± 7,0	6,0 ± 16,0	18,0 ± 4,4
9 	6,0 ± 5,0	-12,0 ± 5,0	-2,7 ± 6,4

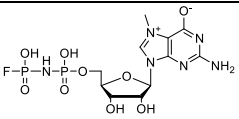
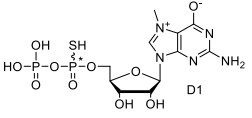
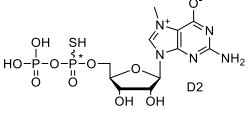
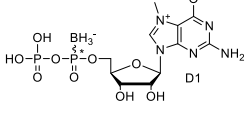
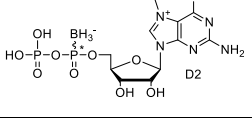
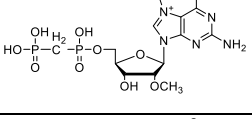
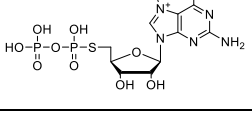
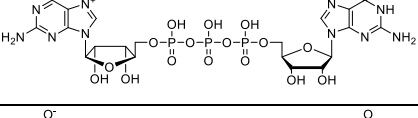
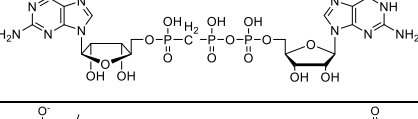
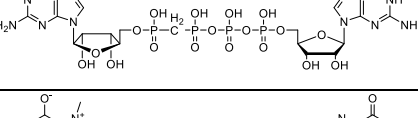
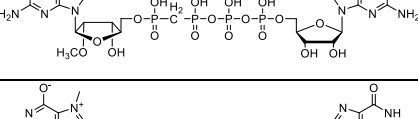
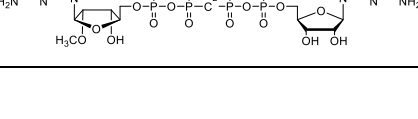
10		$-8,0 \pm 10,0$	$5,0 \pm 9,0$	$0,0 \pm 2,0$
11		$8,0 \pm 7,0$	$11,0 \pm 5,0$	$9,3 \pm 3,2$
12		$-11,0 \pm 5,0$	$-4,0 \pm 2,0$	$10,3 \pm 11,9$
13		$7,0 \pm 3,0$	$-2,0 \pm 12,0$	$13,0 \pm 4,6$
14		$-9,0 \pm 4,0$	$3,0 \pm 7,0$	$19,3 \pm 4,9$
15		$1,0 \pm 8,0$	$7,0 \pm 6,0$	$15,3 \pm 4,9$
16		$7,0 \pm 9,0$	$-1,0 \pm 17,0$	$-21,7 \pm 4,0$
17		$-2,0 \pm 6,0$	$-2 \pm 15,0$	$-10,3 \pm 16$
18		$20,0 \pm 4,0$	$-14,0 \pm 11$	$15,7 \pm 10,0$
19		$9,3 \pm 5,7$	$4,0 \pm 2,0$	$36,3 \pm 9,0$
20		$10,3 \pm 4,0$	$10,0 \pm 6,0$	$32,7 \pm 12,0$

21		$7,0 \pm 1,0$	$-8,0 \pm 2,0$	$13,7 \pm 5,5$
22		$4,0 \pm 2,6$	$19,0 \pm 2,0$	$6,7 \pm 2,0$
23		$3,7 \pm 5,8$	$11,0 \pm 2,0$	$19,7 \pm 12,7$
24		$10,0 \pm 3,0$	$47,0 \pm 2,0$	$30,3 \pm 3,1$
25		$-9,0 \pm 11,0$	$65,0 \pm 7,0$	$64,7 \pm 1,5$
26		$15,0 \pm 9,0$	$51,0 \pm 6,0$	$35,0 \pm 2,6$
27		$-4,0 \pm 4,0$	$15,0 \pm 7,0$	$18,7 \pm 4,5$
28		$-6,0 \pm 8,0$	$20,0 \pm 9,0$	$44,0 \pm 1,0$
29		$10,3 \pm 2,1$	$19,0 \pm 2,0$	$11,0 \pm 7,8$
30		$0,0 \pm 12,0$	$24,0 \pm 4,0$	$24,0 \pm 9,0$
31		$10,7 \pm 6,4$	$51,0 \pm 5,0$	$68,0 \pm 4,4$

32		$3,0 \pm 10,0$	$22,0 \pm 2,0$	$-7,7 \pm 1,5$
33		$12,0 \pm 3,0$	$24,0 \pm 15$	$5,7 \pm 5,0$
34		$17,0 \pm 2,6$	$33,0 \pm 7,0$	$29,3 \pm 6,4$
35		$17,0 \pm 2,0$	$34,0 \pm 3,0$	$43,3 \pm 4,5$
36		$-4,7 \pm 11,8$	$48,0 \pm 2,0$	$7,7 \pm 4,5$
Analogi zawierające urydynę				
37		$-10,0 \pm 4,0$	$13,0 \pm 9,0$	$22,7 \pm 1,2$
38		$14,3 \pm 4,5$	$-15,0 \pm 11$	$-2,0 \pm 8,7$
Analogi zawierające guaninę				
39		$-3,0 \pm 6,0$	$-6,0 \pm 7,0$	$-10,7 \pm 13$
40		$-9,0 \pm 10,0$	$-1,0 \pm 13,0$	$11,3 \pm 4,5$
41		$8,0 \pm 9,0$	$-2,0 \pm 3,0$	$14,0 \pm 7,8$
42		$-5,0 \pm 5,0$	$-5,0 \pm 1,0$	$11,7 \pm 4,0$

43		$2,0 \pm 4,0$	$7,0 \pm 13,0$	$33,0 \pm 1,7$
44		$-3,0 \pm 4,0$	$10,0 \pm 9,0$	$24,7 \pm 10,1$
45		$9,0 \pm 4,0$	$8,0 \pm 6,0$	$18,0 \pm 7,2$
46		$12,0 \pm 11,0$	$-7,0 \pm 22,0$	$-25,0 \pm 1,7$
47		$8,0 \pm 6,0$	$-13,0 \pm 10$	$-8,7 \pm 10,1$
48		$-2,0 \pm 9,0$	$-4,0 \pm 9,0$	$-15,3 \pm 7,1$
49		$-10,0 \pm 6,0$	$-1,0 \pm 16,0$	$-9,3 \pm 11,5$
50		$2,0 \pm 9,0$	$-1,0 \pm 5,0$	$-1,7 \pm 7,4$
51		$11,0 \pm 5,0$	$-3,0 \pm 6,0$	$18,7 \pm 5,9$
52		$-5,0 \pm 3,0$	$-1,0 \pm 24,0$	$32,7 \pm 5,5$
53		$7,0 \pm 3,0$	$33,0 \pm 5,0$	$84,7 \pm 2,1$

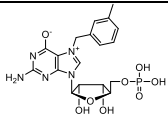
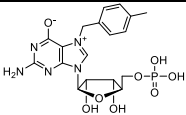
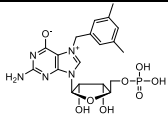
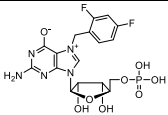
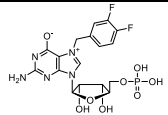
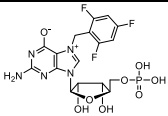
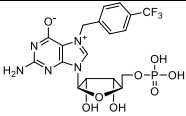
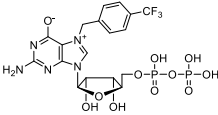
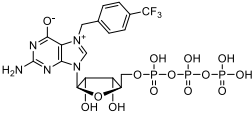
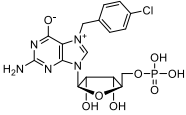
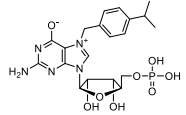
54		$0 \pm 4,0$	$13,0 \pm 9,0$	$63,7 \pm 4,9$
55		$10,7 \pm 10,2$	$12,0 \pm 2,0$	$32,3 \pm 5,1$
56		$6,7 \pm 6,5$	$20,0 \pm 5,0$	$34,0 \pm 7,0$
57		$-9,0 \pm 21,6$	$34,0 \pm 3,0$	$81,3 \pm 4,9$
Analogi zawierające 7-metyloguaninę				
58		$3,0 \pm 3,0$	$-1,0 \pm 11,0$	$12,0 \pm 12,1$
59		$21,0 \pm 3,0$	$-1,0 \pm 3,0$	$22,7 \pm 2,1$
60		$70,0 \pm 1,0$	$2,0 \pm 4,0$	$13,7 \pm 10,8$
61		$28,0 \pm 10,0$	$-11,0 \pm 23$	$-12,3 \pm 4,7$
62		$20,0 \pm 5,0$	$-4,0 \pm 13,0$	$-12,3 \pm 15$
63		$28,0 \pm 3,0$	$-6,0 \pm 11,0$	$-14,7 \pm 13$
64		$32,0 \pm 6,0$	$-5,0 \pm 10,0$	$-7,0 \pm 5,2$

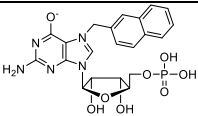
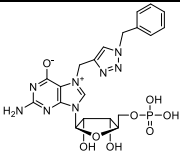
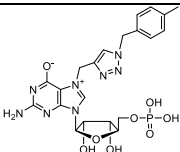
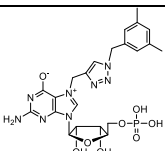
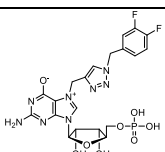
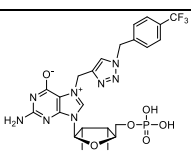
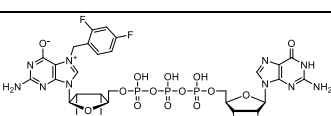
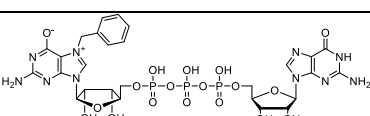
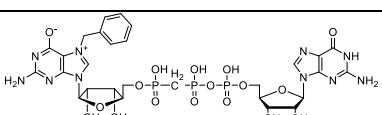
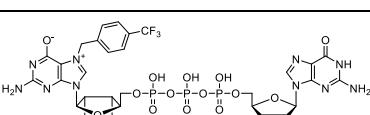
65		$3,0 \pm 4,0$	$-7,0 \pm 10,0$	$-8,7 \pm 9,9$
66		$54,0 \pm 3,0$	$-18,0 \pm 16$	$-39,3 \pm 9,2$
67		$36,0 \pm 3,0$	$1,0 \pm 2,0$	$-15,7 \pm 5,8$
68		$43,0 \pm 6,0$	$1,0 \pm 9,0$	$4,0 \pm 3,5$
69		$68,0 \pm 2,0$	$0,0 \pm 10,0$	$16,3 \pm 1,2$
70		$7,0 \pm 3,0$	$6,0 \pm 9,0$	$6,3 \pm 9,3$
71		$95,3 \pm 2,1$	$8,0 \pm 7,0$	$5,7 \pm 7,0$
72		$30,0 \pm 12,0$	$-14,0 \pm 23$	$29,7 \pm 4,0$
73		$82,0 \pm 6,0$	$-1,0 \pm 9,0$	$36,3 \pm 1,2$
74		$71,0 \pm 6,0$	$2,0 \pm 8,0$	$79,0 \pm 3,0$
75		$-2,0 \pm 6,0$	$2,0 \pm 6,0$	$79,0 \pm 2,0$
76		$9,0 \pm 6,0$	$-3,0 \pm 6,0$	$63,0 \pm 3,5$

77		$81,0 \pm 1,0$	$-1,0 \pm 2,0$	$31,2 \pm 4,5$
78		$72,0 \pm 3,0$	$-1,0 \pm 11,0$	$67,0 \pm 2,0$
79		$15,0 \pm 3,0$	$7,0 \pm 1,0$	$39,3 \pm 4,7$
80		$18,0 \pm 3,0$	$10,0 \pm 10,0$	$91,7 \pm 2,3$
81		$20,0 \pm 6,0$	$-1,0 \pm 16,0$	$81,0 \pm 3,0$
82		$66,0 \pm 10,0$	$-7,0 \pm 9,0$	$70,7 \pm 1,2$
83		$95,0 \pm 1,0$	$-2,0 \pm 12,0$	$33,0 \pm 8,0$
84		$86,0 \pm 2,0$	$-7,0 \pm 12,0$	$67,0 \pm 1,0$
85		$69,0 \pm 2,0$	$-6,0 \pm 1,0$	$73,7 \pm 4,0$
86		$40,0 \pm 2,0$	$-8,0 \pm 15,0$	$26,0 \pm 9,1$
87		$9,0 \pm 3,0$	$4,0 \pm 11,0$	$69,0 \pm 6,1$
88		$99,0 \pm 1,0$	$-3,0 \pm 3,0$	$48,0 \pm 2,6$

89		95,0 ± 1,0	6,0 ± 5,0	13,0 ± 4,6
90		50,3 ± 5,9	18,0 ± 5,0	27,7 ± 11,0
91		60,3 ± 0,6	20,0 ± 6,0	24,0 ± 8,7
92		86,3 ± 0,6	7,0 ± 4,0	51,7 ± 4,0
93		75,3 ± 1,2	20,0 ± 5,0	50,3 ± 6,0
94		47,0 ± 2,6	-20,0 ± 2,0	57,7 ± 2,5
95		95,7 ± 4,9	16,0 ± 8,0	53,7 ± 3,5
96		92,3 ± 3,1	19,0 ± 4,0	73,3 ± 4,6
97		93,7 ± 2,3	2,0 ± 9,0	65,0 ± 1,7
98		97,3 ± 3,8	3,0 ± 9,0	44,7 ± 6,5
99		97,3 ± 4,7	19,0 ± 6,0	49,7 ± 4,5

100		50,3 ± 5,5	19,0 ± 11,0	24,7 ± 2,9
101		59,3 ± 1,5	18,0 ± 4,0	68,3 ± 2,3
102		97,3 ± 4,6	15,0 ± 2,0	73,3 ± 6,7
103		97,3 ± 6,4	17,0 ± 2,0	63,3 ± 4,9
104		80,0 ± 7,0	11,0 ± 7,0	48,3 ± 6,7
105		88,7 ± 8,1	17,0 ± 1,0	60,0 ± 3,5
Analogi zawierające 7-benzyloguaninę				
106		1,3 ± 9,5	18,0 ± 7,0	11,3 ± 3,5
107		27,3 ± 3,1	13,0 ± 6,0	1,7 ± 6,5
108		13,0 ± 8,0	12,0 ± 5,0	3,3 ± 2,5
109		2,7 ± 15,9	9,0 ± 5,0	-25,3 ± 8,7
110		1,7 ± 18,0	22,0 ± 7,0	15,3 ± 1,2

111		$-3,0 \pm 12,5$	$25,0 \pm 4,0$	$27,3 \pm 2,9$
112		$4,3 \pm 6,8$	$31,0 \pm 5,0$	$35,0 \pm 7,9$
113		$10,3 \pm 10,6$	$25,0 \pm 3,0$	$36,7 \pm 11,7$
114		$0,0 \pm 8,7$	$15,0 \pm 9,0$	$20,7 \pm 4,5$
115		$-3,3 \pm 14,0$	$7,0 \pm 1,0$	$7,7 \pm 12,4$
116		$1,7 \pm 16,0$	$12,0 \pm 6,0$	$4,0 \pm 4,4$
117		$6,0 \pm 2,6$	$10,0 \pm 4,0$	$6,0 \pm 8,7$
118		$1,7 \pm 4,7$	$12,0 \pm 4,0$	$25,3 \pm 6,5$
119		$-1,0 \pm 8,9$	$10,0 \pm 3,0$	$7,7 \pm 12,2$
120		$7,3 \pm 11,6$	$25,0 \pm 1,0$	$19,7 \pm 6,4$
121		$-0,7 \pm 19,6$	$23,0 \pm 7,0$	$28,3 \pm 10,3$

122		$10,7 \pm 11,2$	$25,0 \pm 6,0$	$30,0 \pm 7,2$
123		$15,3 \pm 15,3$	$23,0 \pm 5,0$	$54,3 \pm 8,3$
124		$0,7 \pm 5,7$	$6,0 \pm 6,0$	$47,3 \pm 6,7$
125		$-0,3 \pm 10,8$	$6,0 \pm 5,0$	$48,0 \pm 8,5$
126		$5,3 \pm 3,2$	$16,0 \pm 8,0$	$39,3 \pm 6,8$
127		$6,3 \pm 11,2$	$17,0 \pm 6,0$	$44,7 \pm 1,5$
128		$45,7 \pm 3,1$	$9,0 \pm 4,0$	$50,0 \pm 4,4$
129		$23,3 \pm 6,0$	$6,0 \pm 2,0$	$29,3 \pm 3,2$
130		$9,0 \pm 3,0$	$-3,0 \pm 16,0$	$55,0 \pm 2,0$
131		$12,7 \pm 11,2$	$24,0 \pm 12,0$	$52,0 \pm 7,8$

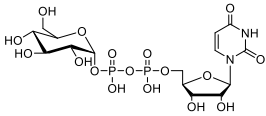
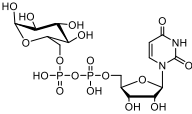
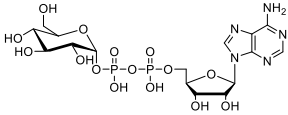
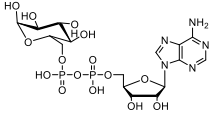
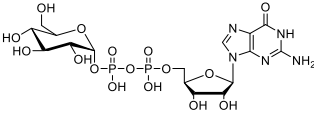
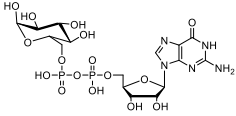
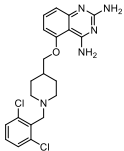
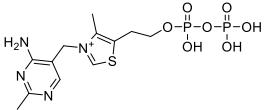
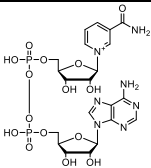
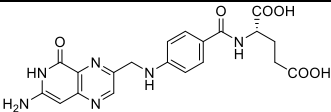
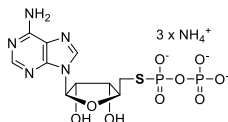
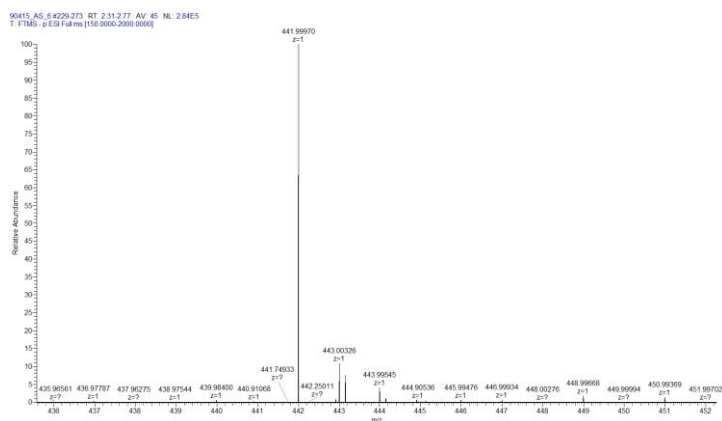
Nukleotydo-cukry				
132		$-1,0 \pm 10,0$	$-8,0 \pm 13,0$	$-41,0 \pm 9,9$
133		$2,0 \pm 6,0$	$-8,0 \pm 8,0$	$-31,3 \pm 7,6$
134		$10,0 \pm 4,0$	$-9,0 \pm 7,0$	$-20,0 \pm 3,6$
135		$-2,0 \pm 3,0$	$0,0 \pm 8,0$	$-22,0 \pm 10$
136		$6,0 \pm 13,0$	$-7,0 \pm 9,0$	$-1,3 \pm 6,1$
137		$-13,0 \pm 8,0$	$-3,0 \pm 2,0$	$-5,3 \pm 8,5$
Inne				
138		$96,7 \pm 1,2$	$-18,0 \pm 13$	$4,7 \pm 6,5$
139		$-4,0 \pm 5,0$	$-5,0 \pm 13,0$	$-11,3 \pm 12$
140		$-7,0 \pm 3,0$	$3,0 \pm 4,0$	$9,3 \pm 7,0$
141		$1,0 \pm 9,0$	$9,0 \pm 3,0$	$4,0 \pm 4,4$

Tabela Z3. Profile HRMS nieopublikowanych dotąd nowych analogów adeninowych. Wszystkie związki oczyszczono za pomocą HPLC preparatywnego.

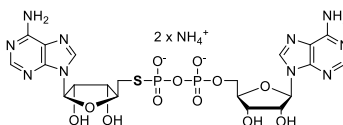
5'-difosforotiolan adenozyiny, (ASpp)



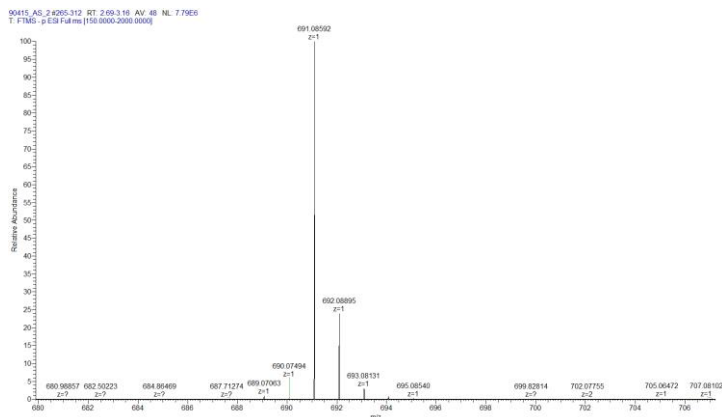
HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₁₀H₁₄N₅O₉P₂S¹⁻ [M-H]⁻ 441,9929, zarejestrowana 441,99970



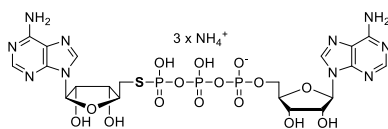
P1-(5'-deoksy-5'-tioadenozyno)-P2-(5'-adenozyno) difosforan, (ASppA)



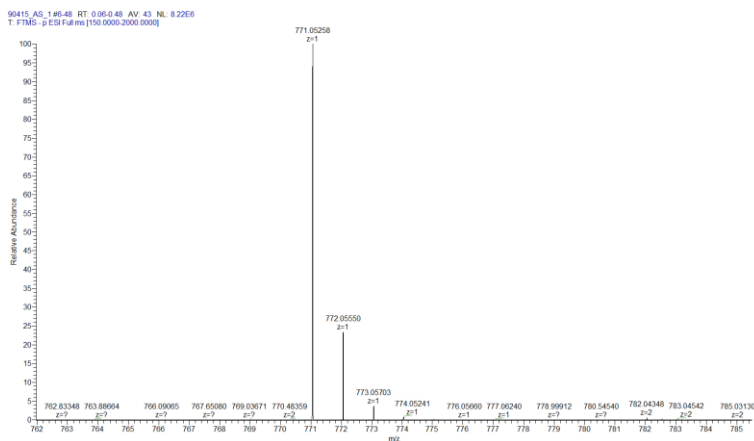
HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₀H₂₅N₁₀O₁₂P₂S¹⁻ [M-H]⁻ 691,08548, zarejestrowana 691,08592



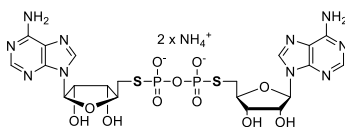
P1-(5'-deoksy-5'-tioadenozyno)-P3-(5'-adenozyno) trifosforan, (ASpppA)



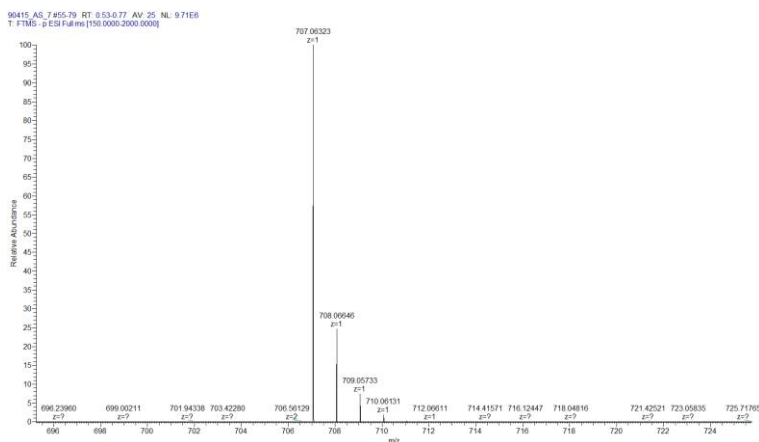
HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₀H₂₆N₁₀O₁₅P₃S⁻ [M-H]⁻ 771,05181, zarejestrowana 771,05258



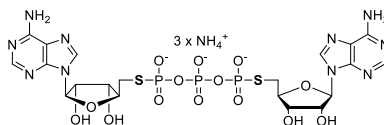
P1,P2-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno) difosforan, (ASppSA)



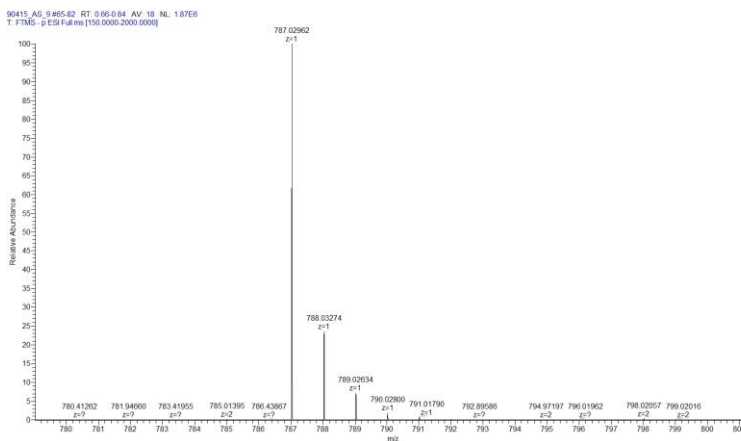
HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₀H₂₅N₁₀O₁₁P₂S₂¹⁻ [M-H]⁻ 707,06264, zarejestrowana 707,06323



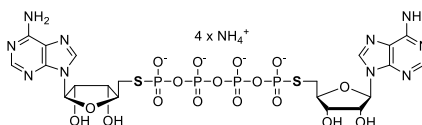
P1,P3-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno) trifosforan, (ASpppSA)



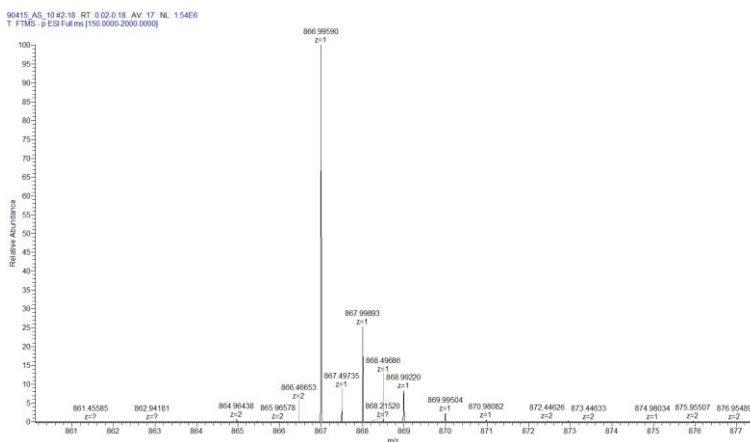
HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₀H₂₆N₁₀O₁₄P₃S₂¹⁻ [M-H]⁻ 787,02897 zarejestrowana 787,02962



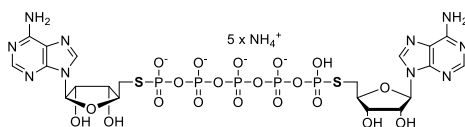
P1,P4-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno) tetrafosforan, (ASp₄SA)



HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₀H₂₇N₁₀O₁₇P₄S₂¹⁻ [M-H]⁻ 866,99530, zarejestrowano 866,99590



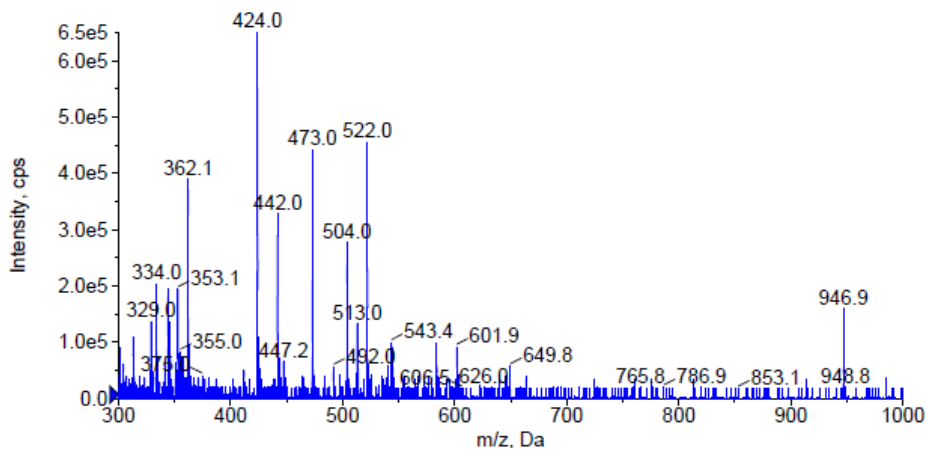
P1,P5-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno) pentaosforan, (**ASp₅SA**)



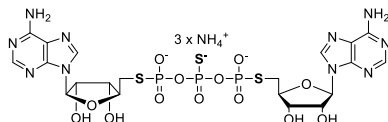
MS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₀H₂₈N₁₀O₂₀P₅S₂¹⁻ [M-H]⁻ 946,9, zarejestrowano 946,9

■ -EMS: 21 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of M...

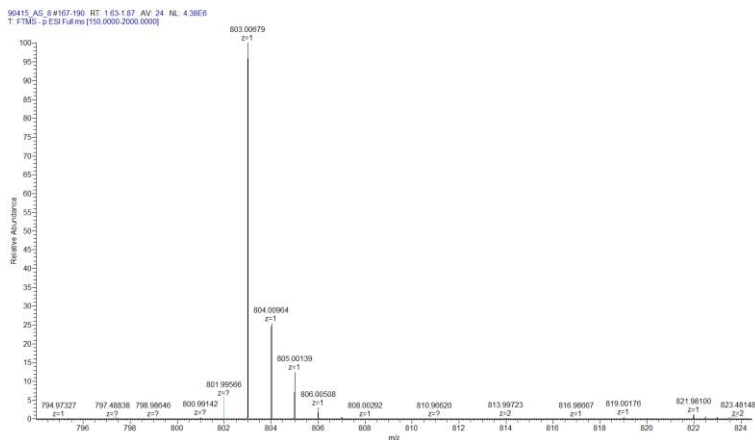
Max. 6.5e5 cps.



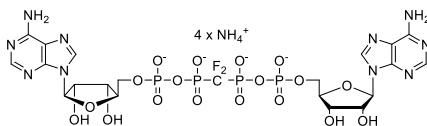
P1,P3-di(5'-deoksy-5'-tioadenozyno)-P3-tiotrifosforan, (**ASpp₃SA**)



HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₀H₂₆N₁₀O₁₃P₃S₃¹⁻ [M-H]⁻ 803,00613, zarejestr. 803,00679



P1-P4-di(5'-adenozyno)-2,3-difluorometyleno tetrafosforan, (**AppCF₂ppA**)



HRMS (ESI⁻) Teor. m/z dla C₂₁H₂₇F₂N₁₀O₁₈P₄⁴⁻ [M-H]⁻ 869,04288, zarejestrowano 869,04394

