

Uniwersytet Warszawski
Wydział Fizyki



Dominika Strzelecka
Nr albumu: 292212

Jakościowa i ilościowa analiza nukleotydów
o znaczeniu biologicznym lub
terapeutycznym przy użyciu spektrometrii
mas

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Jacka Jemielitego
i dr hab. Joanny Kowalskiej
w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej
Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, 2020

Badania zrealizowano w ramach projektu Iuventus Plus, finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (0222/IP3/2015/73) oraz stypendium ETIUDA 7, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (UMO-2019/32/T/ST4/00073) i projektu PRELUDIUM 12, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (UMO-2016/23/N/ST4/03186)

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Promotorom

prof. Jackowi Jemielitemu – za umożliwienie mi pracy w laboratorium, przekazaną wiedzę oraz cenne uwagi podczas wykonywania pracy

dr hab. Joannie Kowalskiej – za przekazaną wiedzę, opiekę merytoryczną, nieustanne wsparcie oraz pomoc w przygotowaniu publikacji

Współpracownikom

Mgr Sylwii Bednarek – za zaprojektowanie bazy widm MS

Dr inż. Pawłowi Sikorskiemu – za pomoc, przekazaną wiedzę oraz wykonanie eksperymentów biologicznych

Dr Mirosławowi Śmietańskiemu – za wykonanie eksperymentów biologicznych

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Chemii Bioorganicznej – za udostępnienie mi związków do badań oraz miłą atmosferę w pracy

Współautorom publikacji – za pomoc w ich przygotowaniu

Rodzinie

Rodzicom, bratu i chrzestnej – za wsparcie

Spis treści

Dorobek naukowy	11
Publikacje bezpośrednio związane z tematem pracy	11
Pozostałe publikacje	11
Prezentacje na konferencjach	12
Wykaz wybranych skrótów	14
1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM I ANGIELSKIM	15
1.1. Streszczenie	15
1.2. Abstract.....	17
2. CELE PROJEKTU i KONCEPCJA PRACY	19
3. PRZEGLĄD LITERATUROWY	21
3.1. Wstęp.....	21
3.2. Budowa oraz znaczenie biologiczne i terapeutyczne nukleotydów	21
3.2.1. Budowa oraz funkcje nukleotydów	21
3.2.2. Naturalnie występujące modyfikacje nukleotydów i ich znaczenie.....	23
3.2.3. Modyfikacje nukleotydów do celów terapeutycznych.....	25
3.3. Budowa oraz znaczenie biologiczne i terapeutyczne mRNA.....	26
3.3.1. Budowa mRNA	26
3.3.1.1. Budowa i właściwości końca 5' (kapu) i 3' (ogona poli(A)).....	27
3.3.2. Biosynteza kapu i dojrzewanie mRNA	29
3.3.3. Proces translacji.....	31
3.3.4. Ścieżki degradacji mRNA	32
3.3.5. Znaczenie biologiczne i terapeutyczne syntetycznych analogów końca 5' mRNA i mRNA.....	34
3.3.5.1. Terapeutyczne zastosowania analogów końca 5' mRNA.....	35
3.3.5.2. Znaczenie biologiczne i terapeutyczne mRNA.....	37
3.3.6. Otrzymywanie mRNA z modyfikowanym ogonem poli(A).....	38
3.4. Metody analizy nukleotydów i oligonukleotydów ze szczególnym uwzględnieniem mRNA	39
3.4.1. Metody badania właściwości fizycznych nukleotydów i kwasów nukleinowych	40
3.4.2. Metody badania oddziaływań nukleotydów i śledzenia procesów komórkowych z nimi związanych	41
4. METODYKA BADAŃ.....	42

4.1.	Podstawy fizyczne spektrometrii mas	42
4.1.1.	Etapy analizy próbki za pomocą spektrometrii mas.....	42
4.1.2.	Przegląd metod jonizacji	43
4.1.3.	Metoda jonizacji Elektrosprej (ESI).....	44
4.1.4.	Przegląd analizatorów	45
4.1.5.	Analizator potrójny kwadrupol	46
4.1.6.	Tandemowa spektrometria mas.....	47
4.2.	Połączenie spektrometrii mas z innymi technikami	50
4.2.1.	Chromatografia cieczowa.....	50
4.2.1.1.	Kluczowe elementy chromatografu i parametry chromatogramu	50
4.2.1.2.	Rozdział analitów – typy chromatografii i fazy stacjonarnej	51
4.2.1.3.	Chromatografia par jonowych i jej zastosowanie do analizy nukleotydów i oligonukleotydów.....	52
4.2.2.	Elektroforeza kapilarna	53
4.2.3.	Spektrometria mobilności jonów w połączeniu ze spektrometrią mas	54
4.3.	Zastosowanie spektrometrii mas do badań kwasów nukleinowych i ich składników	55
4.3.1.	Analiza składników kwasów nukleinowych	55
4.3.1.1.	Analiza endogennych nukleotydów w celach poznawczych	55
4.3.1.2.	Analiza składników kwasów nukleinowych w celach diagnostycznych ..	57
4.3.1.3.	Poszukiwanie nowych nukleotydów	58
4.3.1.4.	Analiza metabolizmu syntetycznych nukleotydów	60
4.3.2.	Analiza oligonukleotydów i kwasów nukleinowych	63
4.3.2.1.	Zastosowanie MALDI do analizy oligonukleotydów i kwasów nukleinowych	63
4.3.2.2.	Zastosowanie ESI do analizy oligonukleotydów i kwasów nukleinowych ..	65
4.3.3.	Analiza niekowalencyjnych oddziaływań oligonukleotydów z innymi cząsteczkami.....	67
5.	BADANIA WŁASNE	68
5.1.	Motywacja i obiekty badań.....	68
5.2.	Plan badań.....	68
5.3.	Badanie fragmentacji nukleotydów za pomocą spektrometrii mas	70
5.3.1.	Fragmentacja w trybie jonów ujemnych vs dodatnich.....	70
5.3.2.	Wpływ różnych warunków na strukturę widma fragmentacyjnego (MS/MS) ..	71

5.3.3.	Metody syntezy związków znakowanych izotopowo	72
5.3.4.	Widma fragmentacyjne niemodyfikowanych 5'-monofosforanów nukleozydów (NMP)	73
5.3.5.	Widma fragmentacyjne niemodyfikowanych difosforanów i trifosforanów nukleozydów (NDP i NTP)	75
5.3.6.	Wpływ modyfikacji fosforanu i rybozy na widma fragmentacyjne nukleotydów	77
5.3.7.	Rozróżnianie nukleotydów izobarycznych i izomerycznych na podstawie ich widm fragmentacyjnych	78
5.3.8.	Biblioteka nukleotydów i baza danych	80
5.3.9.	Podsumowanie rozdziału i zastosowanie wiedzy dotyczącej fragmentacji nukleotydów	81
5.4.	Badanie degradacji końca 5' mRNA za pomocą spektrometrii mas	84
5.4.1.	Koncepcja badań i schemat eksperymentu	84
5.4.2.	Synteza związków wzorcowych do analizy metabolizmu w ekstraktach	86
5.4.3.	Wybór warunków chromatograficznych, parametrów źródła jonów oraz par MRM	87
5.4.4.	Analiza metabolizmu $[D_3]m^7GpppG$ w ekstrakcie	87
5.4.5.	Udział enzymów DcpS i Fhit w degradacji kapu	88
5.4.6.	Wpływ inhibitorów cNIIIB na degradację $[D_3]m^7GMP$	90
5.4.7.	Badanie metabolizmu m^7GDP i m^7GTP z użyciem potencjalnych inhibitorów białek zaangażowanych w ich degradację	91
5.4.8.	Podsumowanie rozdziału i najważniejsze wnioski	92
5.5.	Analiza narzędzi molekularnych do badań komórkowych i zastosowań terapeutycznych	94
5.5.1.	Analiza pronukleotydów w ekstraktach komórkowych	94
5.5.2.	Monitorowanie postępu degradacji fluorescencyjnych sond molekularnych	98
5.6.	Analiza składu końca 3' mRNA za pomocą spektrometrii mas	100
5.6.1.	Koncepcja badań i schemat eksperymentu	100
5.6.2.	Zaprojektowanie i walidacja metody LC-MS/MS	102
5.6.2.1.	Wybór warunków chromatograficznych, ustalenie parametrów źródła jonów i par MRM	103
5.6.2.2.	Przygotowanie krzywych kalibracyjnych	104
5.6.2.3.	Optymalizacja warunków wyczerpującej degradacji enzymatycznej RNA	106
5.6.2.4.	Analiza fragmentu RNA o ściśle zdefiniowanej strukturze	107

5.6.2.5.	Analiza krótkich fragmentów RNA zawierających modyfikacje tiofosforanową.....	108
5.6.2.6.	Analiza fragmentów RNA zawierających ogon poli(A) z modyfikacją tiofosforanową.....	109
5.6.3.	Analiza pełnej długości niemodyfikowanego mRNA.....	111
5.6.4.	Analiza pełnej długości mRNA zawierających modyfikacje tiofosforanową .	113
5.6.5.	RNA zawierające boranofosforan uwalniają AMPH jako produkt degradacji	113
5.6.6.	Związek między składem mRNA, a jego właściwościami biologicznymi	115
5.6.7.	Podsumowanie rozdziału.....	116
6.	PODSUMOWANIE	118
7.	CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	121
7.1.	Informacje ogólne.....	121
7.1.1.	Reagenty i odczynniki	121
7.1.2.	Chromatografia kolumnowa na złożu jonowymiennym	121
7.2.	Syntezy chemiczne	121
7.2.1.	Nukleotydy.....	121
7.2.1.1.	5'- monofosforany nukleozydów: AMP (16), [¹⁸ O, ¹⁸ O]AMP (11), GMP (17), [¹⁸ O, ¹⁸ O]GMP (15) i inne.	121
7.2.1.2.	5'- monotiofosforan adenozyne: AMPS (18), [¹⁸ O, ¹⁸ O]AMPS (13)	122
7.2.1.3.	5'-O-H-fosfonian adenozyne: AMPH (19), [¹⁸ O, ¹⁸ O] AMPH (12).....	123
7.2.1.4.	5'-O-monoboranofosforany adenozyne: AMPBH ₃ (20), [¹⁸ O, ¹⁸ O] AMPBH ₃ (14)	123
7.2.1.5.	5'-O-trifosforan- 8-deuteroadenozyne: [D]ATP (21).....	124
7.2.1.6.	5-monofosforan-7-metyloguanozyne: [D ₃]m ⁷ GMP (2), m ⁷ GMP (22).....	124
7.2.1.7.	5-difosforan-7-metyloguanozyne: [D ₃]m ⁷ GDP (3), m ⁷ GDP (23)	124
7.2.1.8.	5-trifosforan-7-metyloguanozyne:[D ₃]m ⁷ GTP (4), m ⁷ GTP (24).....	125
7.2.1.9.	P1-(N7-metyloguanozyn-5'-yno)-P3-guanozyn-5'-yno trifosforan:[D ₃]m ⁷ GpppG (5), m ⁷ GpppG (6)	125
7.2.1.10.	5'amidofosforan guanozyne: GMP(NH ₂) ₂ , GMPNH ₂	125
7.2.1.11.	5'-bisfosforany nukleozydów: ApCH ₂ p, 2'-F2'-dApCH ₂ p.....	126
7.2.1.12.	Hydroliza P-imidazolidów.....	126
7.2.1.13.	Sprzęganie P-imidazolidu w obecności jonów metalu dwuwartościowego: 2'F, 2'dADP; 2'F,2'dATP; dGDPS; m ⁷ GppH.....	126
7.2.1.14.	Substraty do otrzymywania dinukleotydów	127

7.2.1.14.1. P-imidazolid 5' monofosforanu guanozyny, adenozyiny i 2'O-metyloadenozyiny: GMP-Im, AMP-Im, mAMP-Im	127
.....	127
7.2.1.14.2. Pozostałe substraty: mAMP, AMP, GMP, m ⁷ GDP, GDP	127
7.2.1.15. m ⁷ GpppA (7), GpppA (9)	127
7.2.1.16. m ⁷ GpppA _m (8), GpppA _m (10)	128
7.2.2. Synteza oligonukleotydu na podłożu stałym (RNA C)	128
7.3. Badania biologiczne	128
7.3.1. Przygotowanie ekstraktów komórkowych HEK 293	128
7.3.2. Reakcje w ekstraktach komórkowych HEK 293	128
7.3.3. Synteza i oczyszczanie RNA	129
7.3.3.1. Krótkie RNA (RNA A, RNA B)	130
7.3.3.2. Krótkie RNA bez A w sekwencji (RNA D)	130
7.3.3.3. Krótkie RNA z ogonem poli(A) (RNA A1, RNA D1)	131
7.3.3.4. mRNA (RNA G, RNA G1, RNA H, RNA H1, RNA I)	131
7.3.4. Warunki degradacji enzymatycznej RNA	131
7.3.5. Warunki degradacji enzymatycznej sond fluorescencyjnych	132
7.4. Chromatografia i spektrometria mas	132
7.4.1. Spektrometr i chromatograf	132
7.4.2. Badanie widm fragmentacyjnych nukleotydów	132
7.4.3. Warunki chromatograficzne	133
7.4.4. Parametry MS podczas analizy LC-MS/MS	133
7.4.5. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych do analizy produktów degradacji RNA	134
7.4.6. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych do analizy względnej ilości pronukleotydów (25-32) i ich metabolitów	134
8. LITERATURA	135

Dorobek naukowy

Publikacje bezpośrednio związane z tematem pracy

- **Strzelecka D.**, Chmielinski S., Bednarek S., Jemielity J., Kowalska J., Analysis of mononucleotides by tandem mass spectrometry: investigation of fragmentation pathways for phosphate- and ribose-modified nucleotide analogues, 2017, Scientific Reports, 7, 8931
- Wanat P., Kasprzyk R., Kopciał M., Sikorski P.J., **Strzelecka D.**, Jemielity J., Kowalska J., ExciTides: NTPderived probes for monitoring pyrophosphatase activity based on excimer-tomonomer transitions, 2018, Chemical Communications, 54, 9773-9776
- Gołojuch S., Kopciał M., **Strzelecka D.**, Kasprzyk R., Baran N., Sikorski P.J., Kowalska J., Jemielity J., Exploring tryptamine conjugates as pronucleotides of phosphate-modified 7-methylguanine nucleotides targeting cap-dependent translation, 2020, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 28, 115523
- **Strzelecka D.**, Śmietański M., Sikorski P.J., Warmiński M., Kowalska J., Jemielity J., Phosphodiester modifications in mRNA polyA tail prevent deadenylation without compromising protein expression, 2020, RNA, 26, 1815-1837
- **Strzelecka D.**, Baranowski M., Bednarczyk M., Gołojuch S., Kaczmarska K., Kozarski M., Kubacka D., Jemielity J., Kowalska J., Revisiting 7-methylguanosine cap degradation pathways using novel chemical and analytical tools sheds new light on concerted action of DcpS, Fhit, and cNIIIB in 'cap-tabolism' – w przygotowaniu

Pozostałe publikacje

- **Strzelecka D.**, Holman S., Eyers C., Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a mobile phase additive during top 3 label-free quantitative proteomics, 2015, International Journal of Mass Spectrometry, 391, 157-160
- Marchand A., **Strzelecka D.**, Gabelica V., Selective and Cooperative Ligand Binding to Antiparallel Human Telomeric DNA G-Quadruplexes, 2016, Chemistry - A European Journal, 22, 28, 9551-9555

Prezentacje na konferencjach

Wyniki były prezentowane na 17 konferencjach, 11 razy w formie plakatu i 6 razy w formie prezentacji ustnej

- **Strzelecka D.**, Smietanski M., Warminski M., Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., Analysis and characterization modified in vitro transcribed RNA using LC-MS/MS method, poster, lighting talk, Mass Spectrometry Application to the Clinical Lab, Salzburg, Austria (22-26.09.2019)
- **Strzelecka D.**, Smietanski M., Warminski M., Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., Determination of length and composition of polyA tails in phosphate-modified in vitro transcribed mRNAs using LC-MS/MS, poster, ASMS 2019, Atlanta, USA (2-6.06.2019)
- **Strzelecka D.**, Bednarczyk M., Kaczmarska K., Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., LC-MS/MS based analysis of mRNA 5' cap metabolism and its analogs in cytoplasmic extracts of mammalian cells, oral presentation, 12th Young Scientific Symposium, Pessac, Francja (23-24.05.2019)
- **Strzelecka D.**, Smietanski M., Warminski M., Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., Development of an LC-MS/MS method to determine incorporation efficiency of selected modified adenine nucleotides into in vitro transcribed RNA, poster, Mass Spectrometry Application to the Clinical Lab, Salzburg, Austria (9-13.09.2018)
- **Strzelecka D.**, Smietanski M., Warminski M., Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., Development of the LC-MS method for the analysis and characterization chemically modified RNA, poster, IMSC 2018, Florence, Włochy (26-31.08.2018)
- **Strzelecka D.**, Smietanski M., Warminski M., Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., Development of the LC-MS method for the analysis and characterization chemically modified RNA with therapeutic potential, oral presentation, 11th Young Scientific Symposium, Pessac, Francja (24-25.05.2018)
- **Strzelecka D.**, Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., Development of LC-MS/MS-based method for the analysis of mRNA 5' cap metabolism, poster, Mass Spectrometry Application to the Clinical Lab, Salzburg, Austria (10-14.09.2017)
- **Strzelecka D.**, Sikorski P., Jemielity J., Kowalska J., Development of LC-MS/MS based method for the analysis of mRNA 5' cap metabolites and analogs in biological samples, oral presentation, 10th Young Scientific Symposium, Pessac, Francja (18-19.05.2017)

- **Strzelecka D.**, Chmieliński S., Bednarek S., Jemielity J., Kowalska J., Exploring fragmentation pathways of mononucleotides by ESI MS/MS: towards improved identification and quantification of therapeutically relevant nucleotide analogues, poster, Mass Spectrometry Application to the Clinical Lab, Salzburg, Austria (12-15.09.2016)
- **Strzelecka D.**, Chmieliński S., Jemielity J., Kowalska J., Investigation on fragmentation pathways of nucleotides and their derivatives using tandem mass spectrometry, poster, Euroanalysis 2015 The European Conference on Analytical Chemistry, Bordeaux, Francja (6-10.09.2015)

Wykaz wybranych skrótów

A/A_m – adenozyzna / 2'-O -metyloadenozyzna

AcONH₄ – octan amonu

AMP – 5'-monofosforan adenozyzny

AMPS – 5'-tiofosforan adenozyzny

ATP – 5'-trifosforan adenozyzny

cAMP – cykliczny 5',3'-monofosforan adenozyzny

CDP - 5'-difosforan cytozyzny

CID – ang. *collision-induced dissociation* – dysocjacja indukowana kolizyjnie

CTP – 5'-trifosforan cytozyzny

DcpS – ang. *Decapping Scavenger Enzyme* – enzym zaangażowany w degradację kapu

DMF – dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – ang. *deoxyribonucleic acid* – kwas deoksyrybonukleinowy

Fhit – ang. *fragile histidine triad protein* – enzym zaangażowany w degradację dinukleotydów

GMP – 5'-monofosforan guanozyzny

LC – ang. *Liquid chromatography* – chromatografia cieczowa

LC-MS/MS - ang. *Liquid chromatography tandem mass spectrometry* – chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas

m⁷GMP – 5'-monofosforan 7-metyloguanozyzny

mRNA – ang. *messenger RNA* – informacyjny RNA

PNP – ang. *purine nucleoside phosphorylase* – fosforylaza nukleozydów purynowych

RNA – ang. *ribonucleic acid* – kwas rybonukleinowy

SVPDE – ang. *snake venom phosphodiesterase* – fosfodiesteraza z jadu węża

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM I ANGIELSKIM

1.1. Streszczenie

Nukleotydy są cząsteczkami o wielu funkcjach biologicznych. Mnogość funkcji powoduje, że syntetyczne analogi nukleotydów są obiecującą klasą związków terapeutycznych o właściwościach przeciwwirusowych lub przeciwnowotworowych oraz narzędzi biologicznych, takich jak sondy nukleotydowe. Nukleotydy stanowią substraty do syntezy kwasów nukleinowych, które uczestniczą w procesie ekspresji genu m.in. mRNA. Funkcją mRNA jest przenoszenie informacji genetycznej z DNA na sekwencję peptydów. Na końcu 5' eukariotycznych mRNA znajduje się unikalna struktura kapu, która oddziałuje ze specyficznymi białkami, związanymi z metabolizmem mRNA, umożliwiając kontrolę ekspresji genu i degradacji mRNA. Z racji tego, że mRNA pełni tak ważne funkcje jego modyfikowane chemicznie analogi są testowane w badaniach klinicznych nad różnymi rodzajami terapii genowej. W związku z tym wykrywanie, identyfikacja, a także analiza składu zarówno naturalnie występujących nukleotydów i kwasów nukleinowych jak i ich syntetycznych analogów, pozwala na lepsze poznanie ich ścieżek metabolicznych, funkcji biologicznych i potencjalnych właściwości terapeutycznych.

Pierwszą część niniejszego projektu doktorskiego stanowiła dogłębna analiza ścieżek fragmentacji nukleotydów za pomocą tandemowej spektrometrii mas. Przeprowadziłam ponad 150 różnych nukleotydów i ich analogów, zawierających modyfikacje w obrębie zasady azotowej, rybozy lub reszty fosforanowej. Wiele z tych związków zostało scharakteryzowanych po raz pierwszy. Analiza widm fragmentacyjnych różnych nukleotydów pokazała, że możliwe jest stwierdzanie, czy dana modyfikacja występuje w obrębie zasady azotowej, rybozy czy fosforanu oraz określenie rodzaju modyfikacji. Co więcej, możliwe jest rozróżnienie związków izobarycznych, czyli takich, które mają tę samą masę nominalną, ale inny skład atomowy, oraz określenie, czy badany związek jest mono-, di- czy trifosforanem nukleozydu. Na podstawie zgromadzonych widm zaproponowałam ogólne reguły rządzące procesem fragmentacji, a wyniki zebrałam w postaci bazy danych dostępnej online (<http://www.mstide-db.com/>). Taka baza może być przydatnym narzędziem w procesie poszukiwania metabolitów leków pochodzenia nukleotydowego, znajdowania biomarkerów chorób związanych z dysfunkcją metabolizmu nukleotydów, szybkiej identyfikacji produktów syntezy chemicznej oraz opracowaniu metod ilościowych. Wyniki otrzymane podczas badań fragmentacji były kluczowe w projektowaniu metod LC-MS/MS do analizy fluorescencyjnych sond nukleotydowych oraz metabolizmu końca 5' mRNA i składu mRNA. Proces degradacji mRNA jest szeroko badany, ale wciąż pozostają pytania, na które należy znaleźć odpowiedź. Za degradację kapu odpowiedzialne są enzymy dekapujące w tym DcpS i Fhit jednak względny udział tych enzymów w proces degradacji w komórkach nie jest znany. Co więcej, pojawia się pytanie, jakie są metabolity tego procesu i jaki jest ich dalszy los. W celu odpowiedzi na pytania dotyczące degradacji kapu opracowałam metodę LC-MS/MS służącą do analizy końca 5' (kapu) mRNA w ekstraktach cytoplazmatycznych z komórek HEK 293. Jako efekt projektu zaproponowałam dokładną ścieżkę degradacji kapu wraz z uwzględnieniem najważniejszych enzymów i powstających metabolitów. Kolejnym zadaniem w projekcie było opracowanie

metody, która pozwoliłaby na określenie wydajności wbudowywania modyfikowanych nukleotydów w obręb struktury RNA, w szczególności do ogona poli(A), jak również poznanie preferencji substratowych polimeraz używanych do transkrypcji *in vitro*. Metoda LC-MS/MS polegała na oznaczaniu ilościowym 5'-monofosforanów nukleozydów otrzymanych po trawieniu enzymatycznym niemodyfikowanego lub modyfikowanego mRNA. Po dokonaniu operacji matematycznych możliwe było wyznaczenia zawartości modyfikacji oraz wyznaczenie długości ogona poli(A). Dzięki tej metodzie pokazano, że analogi ATP są substratami dla polimeraz RNA, co umożliwia wprowadzanie modyfikacji do wiązań fosfodiesterowych RNA. Proces wbudowywania analogów ATP zachodzi stereospecyficznie, dzięki czemu konfiguracja absolutna modyfikowanych wiązań fosfodiesterowych jest ściśle zdefiniowana w produktach RNA. Może to być wykorzystane do tworzenia cennych narzędzi molekularnych. Otrzymane i scharakteryzowane mRNA zostały poddane badaniom biologicznym, które wykazały, że mRNA zawierające modyfikację tiofosforanową w obrębie ogona poli(A) są odporne na degradację enzymatyczną, a jednocześnie obecność tych modyfikacji nie wpływa na wydajność translacji.

Opracowane metody do analizy nukleotydów i RNA pozwolą na lepsze poznanie właściwości, potencjału biologicznego oraz terapeutycznego tych cząsteczek, jak również przyczynią się do projektowania nowych związków, które mają szansę w przyszłości stać się skutecznymi lekami.

1.2. Abstract

Nucleotides play many important roles in living organisms. Synthetic nucleotide analogues exert often anticancer or antiviral properties. Also they can act as biological tool to monitor processes in cell. They serve as monomeric units of the nucleic acid including messenger RNA (mRNA), which is crucial in gene expression process. mRNA carries codes from the DNA in the nucleus to the sites of protein synthesis in the cytoplasm. On the 5' end of eukaryotic mRNA cap structure is presented. Cap regulates crucial processes such as mRNA maturation, nuclear export, initiation of translation and degradation. 5' cap analogues influence mRNA stability but also modification within 3' end (poly(A) tail) may improve mRNA properties. Modified mRNA is widely studied and may be used in gene therapy. Therefore detection, identification, and quantitation of natural nucleotides, nucleic acids and their analogues combined with deciphering their metabolic pathways are instrumental in understanding natural metabolic processes as well as disease diagnostic and discover their therapeutic properties.

First part of this project focused on the qualitative analysis of nucleotides by tandem mass spectrometry (or MS/MS) – a technique that enables controlled fragmentation of molecules. The goal was to apply mass spectrometry to understand fragmentation pathways of nucleotides, to elaborate general rules of fragmentation, and propose possible fragmentation pathways. To this end, over 150 nucleotides including natural nucleotides and their base-, ribose-, and phosphate-modified analogues, among them several compounds of therapeutic interest, were investigated. The careful analysis of the fragmentation spectra enabled distinguishing between structurally related isomers and isobars and determine both the type and the position of the modification. The results of MS/MS were collected in a database available in public domain (<http://mstide-db.com>) – arguably the first MS database for this class of compounds. The database might be used in studying drug and prodrug metabolism, try to discover new natural nucleotide modifications and biomarkers, as well as perform chemical synthesis of nucleotide analogues and to develop quantitative LC-MS/MS methods. The results obtained during first stage of the project were used to develop LC-MS/MS method to analyse nucleotides fluorescence probes, dinucleotides and mRNA.

The methods enabled analysis of mRNA cap and cap analogues degradation in cell extracts provided insights into cap metabolism, and thereby, mRNA turnover. Moreover selective inhibitors of particular cap degradation steps were used. The inhibitors were developed in our group to investigate the interdependence of various cap degradation pathways and identify metabolites with key biological importance. In the next stage of this project an LC-MS/MS method for quantitative assessment of incorporation of ATP analogues modified at the α -phosphate into transcripts by RNA polymerases was developed and improved. The results showed that polymerases evince similar incorporation efficiency towards ATP and its analogues however they recognise only one stereoisomer. Furthermore incorporation of ATP analogues is stereospecific so absolute configuration of the product is strictly defined what can be used to create new biological tools. Also, mRNA with modified poly(A) tail was obtained. Experiments showed that phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression.

The methods for analysis nucleotides, dinucleotides and mRNA contribute to discovery of properties of new compounds, their biological and therapeutic potential, and may help in the future to design more stable mRNA-based therapeutics.

2. CELE PROJEKTU i KONCEPCJA PRACY

Ogólnym celem badań będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie uniwersalnych metod opartych na tandemowej spektrometrii mas, pozwalających na analizę jakościową i ilościową nukleotydów, oligonukleotydów, ich syntetycznych analogów oraz kwasów nukleinowych o potencjale biologicznym lub terapeutycznym. Projekt składał się z dwóch głównych części. Pierwsza część dotyczyła jakościowej analizy nukleotydów, natomiast druga badania nukleotydów w próbkach biologicznych takich jak ekstrakty komórkowe czy mieszaniny po reakcjach enzymatycznych.

Celem badań jakościowych nukleotydów było:

- otrzymanie widm fragmentacyjnych (MS/MS) szerokiego zestawu nukleotydów i ich syntetycznych analogów,
- poznanie ścieżek fragmentacji nukleotydów i ich syntetycznych analogów,
- sformułowanie ogólnych reguł rządzących procesem fragmentacji,
- przygotowanie bazy danych dostępnej online dla szerokiego grona odbiorców.

Ta część projektu oraz przygotowana baza danych ma znaczenie w identyfikacji metabolitów leków będących pochodnymi nukleotydów, poszukiwaniu nowych naturalnych modyfikacji nukleotydów, szybkiej identyfikacji produktów syntezy chemicznej oraz w projektowaniu metod LC-MS/MS, co było celem drugiej części.

Celem drugiej części było:

- zaprojektowanie metod LC-MS/MS do analizy metabolizmu pronukleotydów, nukleotydów, analogów nukleotydów, w tym analogów końca 5'mRNA w ekstraktach komórkowych, badanie ich stabilności oraz identyfikacja metabolitów;
- zweryfikowanie wpływu, na metabolizm mRNA, znanych oraz nowych inhibitorów białek zaangażowanych w proces degradacji kapu, przy użyciu zaprojektowanej metody;
- weryfikacja znanych z literatury ścieżek degradacji mRNA;
- zaprojektowanie metody LC-MS/MS służącej do analizy efektywności wbudowywania analogów ATP przez polimerazy RNA w obrębie RNA, w szczególności ogona poli(A);
- zweryfikowanie specyficzności substratowej polimeraz RNA;
- analiza składu modyfikowanych mRNA otrzymywanych w reakcji transkrypcji *in vitro* w zależności od składu mieszaniny reakcyjnej;
- powiązanie struktury analogów mRNA z ich funkcją i potencjałem terapeutycznym.

Podsumowując, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie zestawu metod opartych na spektrometrii mas do analizy nukleotydów oraz analizy końca 3' i 5' mRNA. Zastosowanie tych metod przyczyni się do kompleksowego poznania kluczowych elementów struktury mRNA. Co więcej, została przygotowana danych, która może być użyta w szerokim kontekście poszukiwania modyfikowanych nukleotydów w próbkach biologicznych.

3. PRZEGLĄD LITERATUROWY

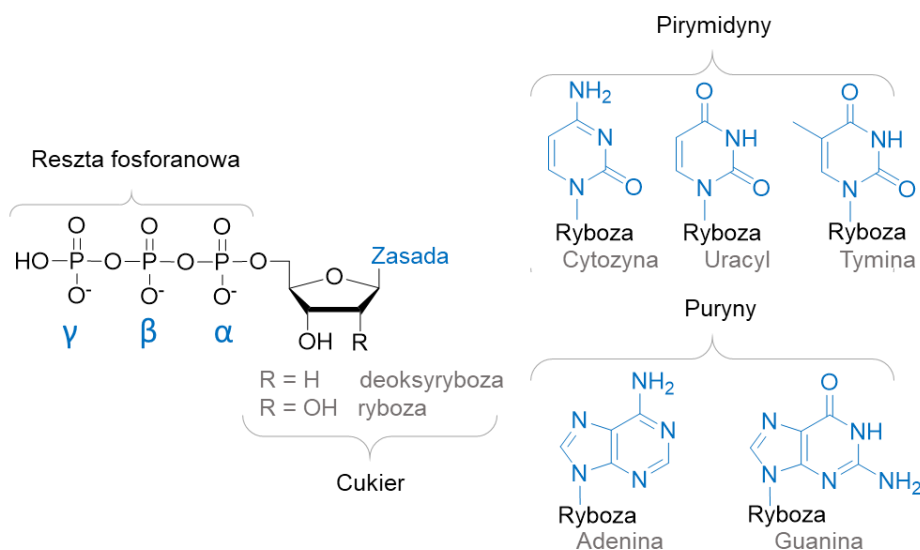
3.1. Wstęp

Nukleotydy pełnią wiele ważnych zadań w organizmach żywych. Jedną z podstawowych funkcji jest budowa kwasów nukleinowych, co jest niezbędne do przebiegu kluczowych procesów w organizmie. Pojawienie się modyfikacji w strukturze nukleotydów może powodować nieodwracalne zmiany i zaburzenia podstawowych procesów życiowych. Mnogość funkcji nukleotydów powoduje mnogość ich zastosowań, dlatego syntetyczne analogi nukleotydów i kwasów nukleinowych stały się cennymi narzędziami biologicznymi i diagnostycznymi oraz skutecznymi lekami. W związku z powyższym początek niniejszej rozprawy stanowi wstęp literaturowy, który opisuje budowę, funkcje i znaczenie nukleotydów oraz kwasów nukleinowych jak również ma za zadanie zwrócić uwagę na aspekty związane z właściwościami terapeutycznymi chemicznie modyfikowanych analogów tych cząsteczek. Następnie szeroko przedstawiona została technika spektrometrii mas, która była kluczową metodą stosowaną w tym projekcie doktorskim. W części tej zostały również pokazane wybrane przykłady przybliżające możliwości i kierunki rozwoju spektrometrii mas.

3.2. Budowa oraz znaczenie biologiczne i terapeutyczne nukleotydów

3.2.1. Budowa oraz funkcje nukleotydów

Właściwości nukleotydów i pełnione przez nie funkcje wynikają z ich charakterystycznej budowy. Nukleotydy są to estry fosforanowe nukleozydów. Nukleozydy składają się z zasady azotowej, połączonej wiązaniem β -N-glikozydowym z cukrem-pentozą: rybozą lub deoksyrybozą. Zasady azotowe występujące w naturalnych nukleozydach możemy podzielić na puryny: adeninę i guaninę oraz pirymidyny: cytozynę, uracyl, tyminę ([Rysunek 1](#)).



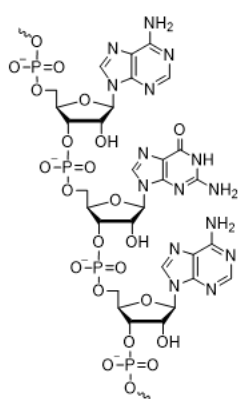
Rysunek 1. Budowa nukleotydów wchodzących w skład RNA i DNA oraz struktury cukrów i zasad azotowych.

Najbardziej rozpowszechnione są nukleotydy powstałe w wyniku fosforylacji grupy 5'OH rybozy lub deoksyrybozy. Znane są również nukleotydy, które posiadają grupę fosforanową w pozycji 3'OH oraz cykliczne, posiadające grupę fosforanową przyłączoną równocześnie w pozycji 5' i 3' lub 2' i 3'. W nomenklaturze nukleotydów kolejne fosforany oznaczają się greckimi literami alfabetu α , β , γ zaczynając od miejsca przyłączenia do cukru. Takie oznaczenia są przydatne w celu wskazania pozycji modyfikacji np. ATP α S, związek, który będzie w pracy szeroko dyskutowany, jest 5'-trifosforanem adenozy. Zawiera on atom siarki w obrębie pierwszego fosforanu licząc od rybozy.

5'-trifosforany nukleotydów są składnikami do biosyntezy kwasów nukleinowych, które są polimerami złożonymi z podjednostek nukleotydowych (Rysunek 2). Kolejne nukleotydy w niciach RNA i DNA są połączone między sobą wiązaniem fosfodiesterowym. Grupa 3'OH jednego nukleotydu łączy się z resztą fosforanową w pozycji 5' kolejnego nukleotydu.

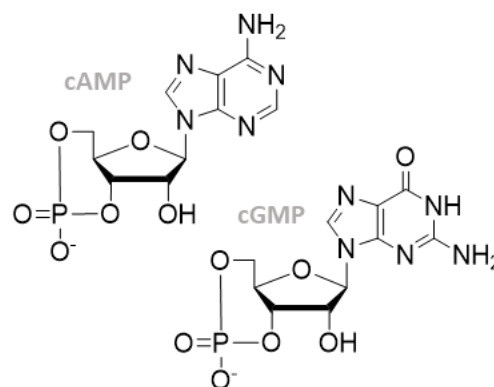
Nukleotydy są również nośnikiem energii. Najpowszechniejszą cząsteczką dostarczającą energię w trakcie procesów biochemicznych przebiegających w komórkach jest ATP. Cząsteczka ta została po raz pierwszy odkryta przez Lohmann'a w 1929 roku w komórkach mięśniowych.¹ Hydroliza ATP dostarcza około 8,9 kcal/mol energii. Energia ta jest wykorzystywana do przeprowadzenia innych procesów komórkowych. W komórkach eukariotycznych synteza ATP odbywa się w mitochondriach w wyniku fosforylacji oksydacyjnej lub w trakcie fotofosforylacji w chloroplastach w przypadku roślin.²

Budowa biopolimerów: DNA, RNA

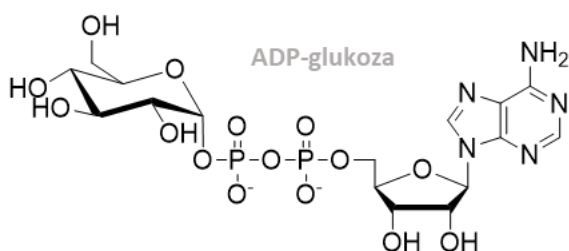


struktura dwuniciowego fragmentu B-DNA (PDB: 1D28)

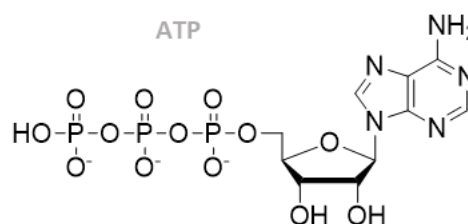
Przekazywanie sygnałów



Synteza polisacharydów i fosfolipidów



Źródło energii



Rysunek 2. Struktury wybranych nukleotydów i ich funkcje.

Cykliczne fosforany nukleozydów działają jako cząsteczki regulatorowe i sygnalizacyjne. Najbardziej znane są cykliczny AMP (cAMP) i cGMP. cAMP reguluje działanie kinaz białkowych, zwiększa przepuszczalność błon komórkowych, pośredniczy w działaniu hormonów np. noradrenaliny, pomaga w transporcie jonów, reguluje rozpad i syntezę glikogenu, przyspiesza utlenianie komórkowe i syntezę ATP.³ Z kolei cGMP reguluje główne wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe wpływając na aktywność kinaz białkowych G, fosfodiesteraz oraz kanałów kationowych. W ostatnich latach wykazano, że cGMP uczestniczy w regulacji procesów widzenia, neurotransmisji, homeostazy wapnia, agregacji płytek krwi, pracy serca, przebudowy kości i metabolizmu tłuszczów.⁴ Nukleotydy biorą również udział w syntezie polisacharydów (np. UDP-glukoza, ADP-glukoza) i fosfolipidów (np. CDP i CTP).⁵

Zestawienie najważniejszych funkcji nukleotydów przedstawia Rysunek 2, jednak trzeba mieć świadomość, że jest ich o wiele więcej. Ponadto nawet niewielka modyfikacja struktury nukleotydu może bardzo silnie wpływać na pełnione przez nukleotydy funkcje (Rozdział 3.2.2).

3.2.2. Naturalnie występujące modyfikacje nukleotydów i ich znaczenie

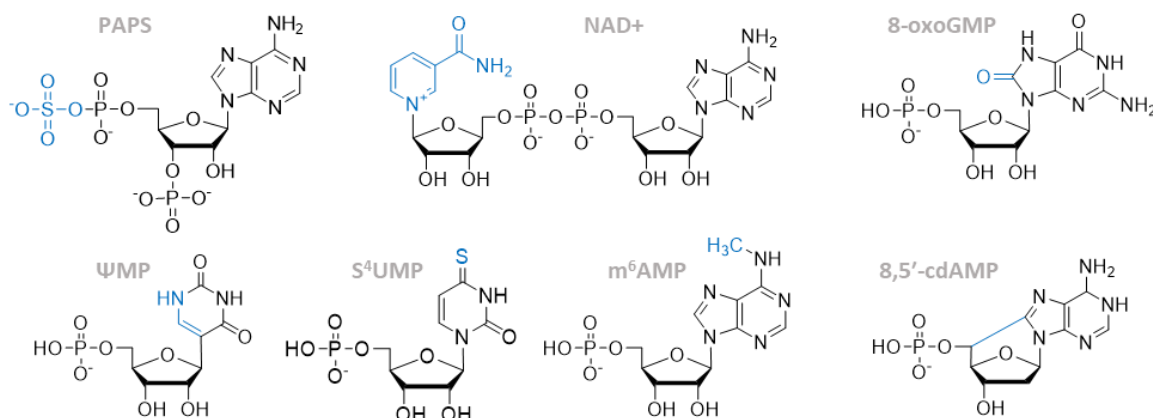
Obecność w organizmie analogów nukleotydów może mieć dla organizmu znaczenie zarówno pozytywne jak i negatywne. Modyfikowane nukleotydy możemy podzielić na trzy główne grupy: związki kluczowe dla funkcjonowania organizmu, związki szkodliwe dla organizmu oraz pochodne nukleotydów, które pojawiają w stanach chorobowych i mogą służyć jako biomarkery. Poniżej przedstawiłam przykłady nukleotydów dla każdej z wymienionych grup (Rysunek 3).

Nukleotydy niezbędne dla funkcjonowania organizmu to np. te, które są prekursorami i biorą udział w biosyntezie innych nukleotydów. Jako przykład można tutaj podać związki będące prekursorami AMP i GMP takie jak inozyno-5'-monofosforan (IMP), ksantozyno-5'-monofosforan (XMP) i adenylobursztynian (AS) oraz prekursor UMP - orotydyno-5'-monofosforan (OMP).⁶⁻⁹ Nukleotydy mogą działać również jako koenzymy, czyli cząsteczki niezbędne do aktywności białek. Na przykład NAD⁺ (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma utleniona), FMN (mononukleotyd flawinowy), FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) są koenzymami oksydoreduktaz uczestniczącymi w reakcjach utleniania-redukcji.^{10, 11} Innym przykładem koenzymu jest 5'-fosfosiarczan 3'-fosfoadenozyny (PAPS), który uczestniczy w reakcjach z udziałem sulfotransferaz.¹² Wiele modyfikacji występuje także w obrębie kwasów nukleinowych. Bardzo często są to metylacje nukleotydów. Metylacje występujące w obrębie zasad azotowych w DNA są kluczowe dla przebiegu wielu procesów np. wyciszania genów, dezaktywacji chromosomu X. Przykładem metylowanych nukleotydów są metylowane cytozyny u eukariontów.^{13, 14} Jeszcze więcej modyfikacji występuje w kwasach rybonukleinowych. Może to też wynikać z ich różnorodności strukturalnej. Najwięcej modyfikacji zidentyfikowano w obrębie transportującego RNA (tRNA). Jako przykłady można tutaj podać pseudourydyno-5'-monofosforan (ΨMP), 4-tiourydyno-5'-monofosforan (S⁴UMP) i 6-metyloadenozyno-5'-monofosforan (m⁶AMP). Nukleotydy te są kluczowe w transporcie za pośrednictwem tRNA.¹⁵ Mniejsza liczba modyfikacji została zidentyfikowana w obrębie mRNA, jednak są one kluczowe w procesach zachodzących podczas translacji. Jako przykład można podać 6-metyloadenozyno-5'-monofosforan (m⁶AMP), 7-metyloguanozyno-5'-

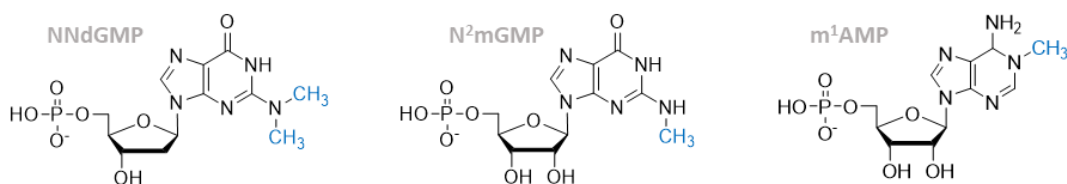
monofosforan (m^7GMP), 2'-O-metyloguanozyno 5'-monofosforan ($m^{2'}GMP$). m^6A jest najbardziej rozpowszechnioną wewnętrzną modyfikacją RNA, szczególnie w eukariotycznych informacyjnych RNA (mRNA). Modyfikacje m^6A RNA regulują splicing, translokację, stabilność i translację mRNA. Ponadto związek między m^6A , a występowaniem i rozwojem raka u ludzi, jest szeroko badany w celu odkrycia nowych markerów, rozwoju diagnostyki oraz molekularnej terapii celowanej.¹⁶⁻¹⁹

Nukleotydy niezbędne w procesach komórkowych

Biomarkery chorób



Nukleotydy, które mogą powodować zakłócenia procesów komórkowych



Rysunek 3. Przykłady naturalnie występujących, modyfikowanych nukleotydów.

Pojawienie się niektórych modyfikacji w obrębie nukleotydów może być niebezpieczne dla organizmu. Niepożądane modyfikacje w obrębie DNA czy RNA mogą zakłócać procesy transkrypcji i translacji. Modyfikacje DNA mogą powodować zmniejszenie wydajności procesu transkrypcji, powstawanie zmutowanych transkryptów, przyczyniać się do niestabilności genomu, a w rezultacie powodować dysfunkcje komórkowe, starzenie się, a nawet przedwczesną śmierć komórki oraz przyczyniać się do nowotworzenia. Pojawienie się niepożądanych modyfikacji może być konsekwencją m.in. stresu oksydacyjnego, promieniowania UV lub czynników chemicznych. Chociaż istnieją metody naprawy DNA, np. poprzez usuwanie zmodyfikowanej zasady, to jednak nie zawsze są one w pełni wydajne.²⁰ Przykładami modyfikowanych nukleotydów, których pojawienie się jest groźne dla organizmu może być np. 8-oksoguanino 5'-monofosforan (8-oxoGMP) lub 8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyno 5'-monofosforan (8,5'-cdAMP).^{21, 22}

W niektórych przypadkach obecność modyfikowanych nukleotydów jest oznaką pojawienia się stanu chorobowego. Szeroko badane są korelacje między pojawieniem się modyfikowanych nukleotydów lub wzrostem ich stężenia, a występowaniem chorób.²³⁻²⁵ Przykładami takich nukleotydów mogą być N,N-dimetyloguanozyno 5'-monofosforan (NNdGMP), którego obecność koreluje z występowaniem raka piersi²⁶ lub N-2-metyloguanozyno 5'-monofosforan (N^2mGMP) wskazujący na nowotwory związane z

układem moczowym.²⁷ Wzrost stężenia nukleotydów takich jak m^3 CMP lub m^1 AMP, może świadczyć o pojawieniu się nowotworu czy infekcji wirusowej.^{28, 29}

W świetle powyższego, ważna jest nie tylko identyfikacja, ale również oznaczanie stężenia nukleotydów. Jest to istotne ze względów diagnostycznych. Ciekawym zagadnieniem jest poznawanie nowych modyfikacji, które mogą być kluczowe dla przebiegu różnych procesów. W tym celu powstaje wiele metod służących do analizy nukleotydów w próbkach biologicznych, a dominującą techniką jest spektrometria mas (Rozdział 4).

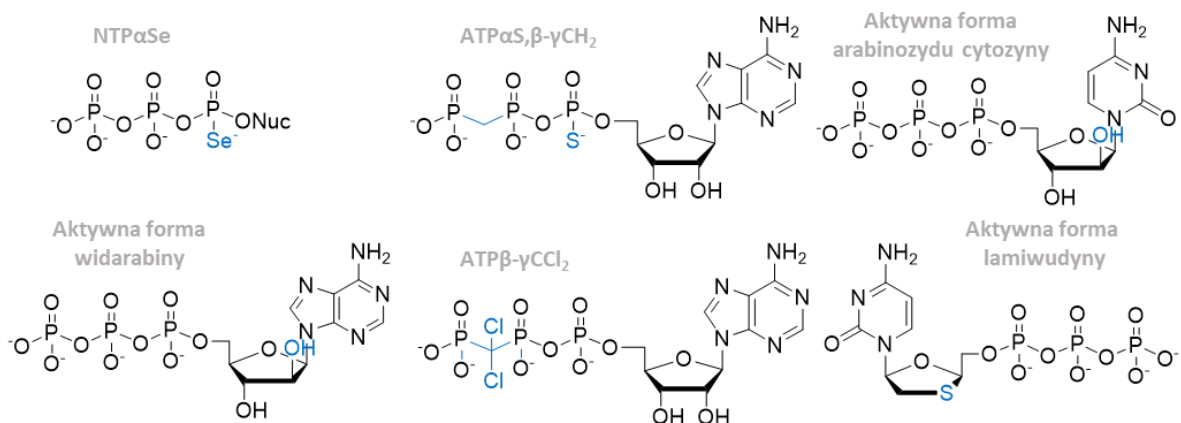
3.2.3. Modyfikacje nukleotydów do celów terapeutycznych

Skoro wprowadzenie niewielkich modyfikacji w obrębie nukleotydu może nadać tym cząsteczkom zupełnie nowe funkcje, również naukowcy z całego świata próbują poprzez modyfikację ich struktury nadać im nowe właściwości i wykorzystać jako leki lub narzędzia biomolekularne do badania procesów biologicznych.

Jako narzędzia molekularne stosuje się np. sondy nukleotydowe, które wyposażone w odpowiedni znacznik pozwalają na śledzenie procesów wewnątrzkomórkowych. Przykład takich sond będzie opisany w Rozdziale 5.5.2. Powstają również modyfikowane nukleotydy, które po wbudowaniu do RNA zwiększają jego odporność na nukleazy i mogą być użyte podczas badań krystalograficznych, badania funkcji niekodującego RNA oraz badania oddziaływań białko-RNA. Przykładem są trifosforany nukleozydów posiadające w swojej strukturze selen – $NTP\alpha Se$.³⁰

Nukleotydy mogą działać jako leki. W tym przypadku w leczeniu stosuje się głównie modyfikowane nukleozydy, które po dostarczeniu do komórek ulegają fosforylacji do trifosforanów i w ten sposób przyjmują swoją aktywną formę. W terapii przeciwwirusowej są one substratami dla wirusowej polimerazy DNA - jednocześnie po inkorporacji do DNA stają się terminatorami polimeryzacji i zapobiegają dalszej syntezie DNA. Przykładem takiego leku jest lamiwudyna, która stosowana jest w terapii anty HIV oraz w wirusowym zapaleniu wątroby typu B.³¹⁻³³ Przykładem związku wykorzystywanego w hematologii jest arabinozyd cytozyny. Stosuje się go jako lek przeciwnowotworowy w leczeniu białaczek, ziarnicy złośliwej i chłoniaków nieziarniczych.³⁴ Analogiem nukleotydu, który jest metabolitem leku przeciw osteoporozie jest $ATP\beta-\gamma CCl_2$.³⁵⁻³⁷ Z kolei obiecującym kandydatem w leczeniu choroby Alzheimera wydaje się być $ATP\alpha S, \beta-\gamma CH_2$ (Rysunek 4).^{38, 39}

Przykładów nukleotydów o znaczeniu terapeutycznym można podać o wiele więcej, jednak nie tylko pojedyncze nukleotydy mogą być skutecznymi lekami. Nie mniejsze znaczenie mają modyfikacje kwasów nukleinowych i ich zastosowanie w terapii genowej (Rozdział 3.3.5).



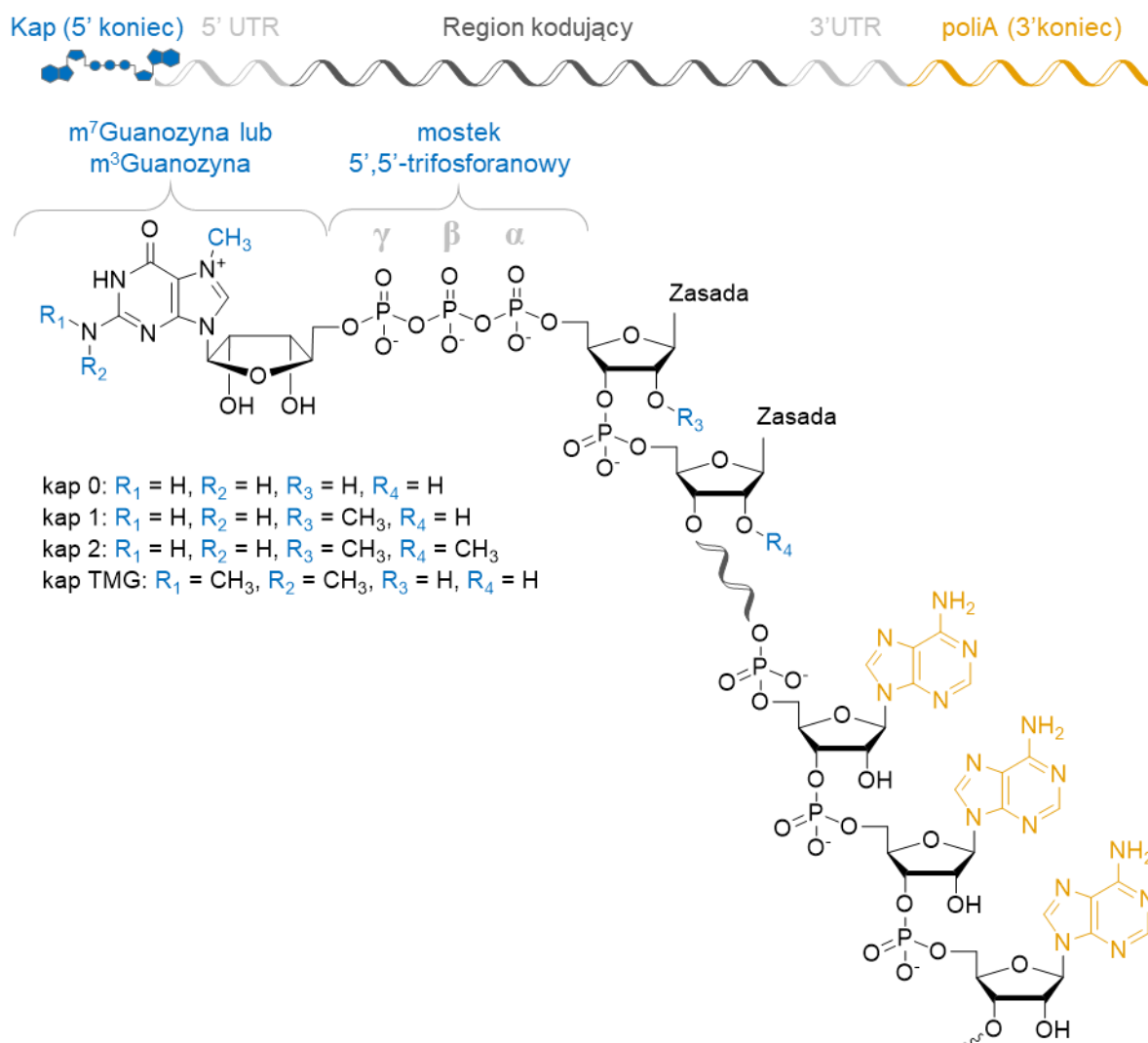
Rysunek 4. Przykłady nukleotydów o znaczeniu biologicznym i terapeutycznym. Nuc = nukleozyd.

3.3. Budowa oraz znaczenie biologiczne i terapeutyczne mRNA

Jedną z podstawowych funkcji nukleotydów jest budowa kwasów nukleinowych. Są one cząsteczkami przechowującymi informację genetyczną i pośredniczą w produkcji białek. Z tymi działaniami związane są dwa kluczowe procesy – transkrypcja, czyli przepisywanie informacji genetycznej z DNA na informacyjny RNA (*messenger* RNA, mRNA) oraz translacja – czyli synteza peptydów na podstawie sekwencji zakodowanej w mRNA. Procesy te są złożone i kilkietapowe oraz podlegają niezbędnym mechanizmom regulacji. Elementem łączącym te dwa procesy jest cząsteczka mRNA. Pełni ona wiele ważnych funkcji w procesie ekspresji genu, gdyż dzięki swojej specyficznej budowie zyskała unikatowe właściwości.

3.3.1. Budowa mRNA

Cząsteczka mRNA posiada na końcu 5' strukturę kapu, a na końcu 3' ogon poli(A). Pomiędzy tymi strukturami znajdują się regiony kodujące oraz regiony niekodujące – 5' i 3' UTR (*untranslated regions*) (Rysunek 5). W regionach kodujących zapisana jest sekwencja białka w postaci kodonów. Kodony to trzy kolejne nukleotydy, które kodują jeden aminokwas. Regiony kodujące zaczynają się od kodonu start – AUG, a kończą kodonem stop – UAA, UGA lub UAG. Pomiędzy tymi kodonami znajduje się sekwencja białka. Oprócz zakodowanej sekwencji białka, część regionów kodujących może zawierać sekwencje regulatorowe. W pre-mRNA (Rozdział 3.3.2) mogą one regulować proces splicingu.⁴⁰ Regiony 5' i 3' UTR nie podlegają translacji. Znajdują się one przed kodonem start (5'UTR) oraz po kodonie stop (3' UTR). Regiony UTR spełniają kilka funkcji w procesie ekspresji genu, regulując stabilność, lokalizację oraz wydajność translacji mRNA.⁴¹ Funkcja danego fragmentu UTR zależy od jego sekwencji. Warianty UTR mogą być związane z podatnością na choroby ze względu na zmiany w strukturze mRNA i translacji białka.⁴²



Rysunek 5. Struktura mRNA.

3.3.1.1. Budowa i właściwości końca 5' (kapu) i 3' (ogona poli(A))

Bardzo duży wpływ na właściwości mRNA ma charakterystyczna struktura końca 5' – kapu (Rysunek 5). Kap składa się z dodatnio naładowanej 7-metyloguanozyny połączonej z pierwszym transkrybowanym nukleotydem mostkiem 5',5'-trifosforanowym.

Metylacja w pozycji 7 guaniny znacznie zmienia właściwości tej zasady, a przez to całego mRNA. Formalny ładunek dodatni, który tworzy się w wyniku zaangażowania wolnej pary elektronowej atomu azotu i powoduje deficyt elektronów w pierścieniu imidazolowym, jest zlokalizowany pomiędzy atomami N^7 , C^8 , N^9 . W efekcie polarność zasady azotowej się zwiększa. W warunkach fizjologicznych obecna jest równowaga między formą kationową, a jonem obojnaczym 7-metyloguanozyny.⁴³

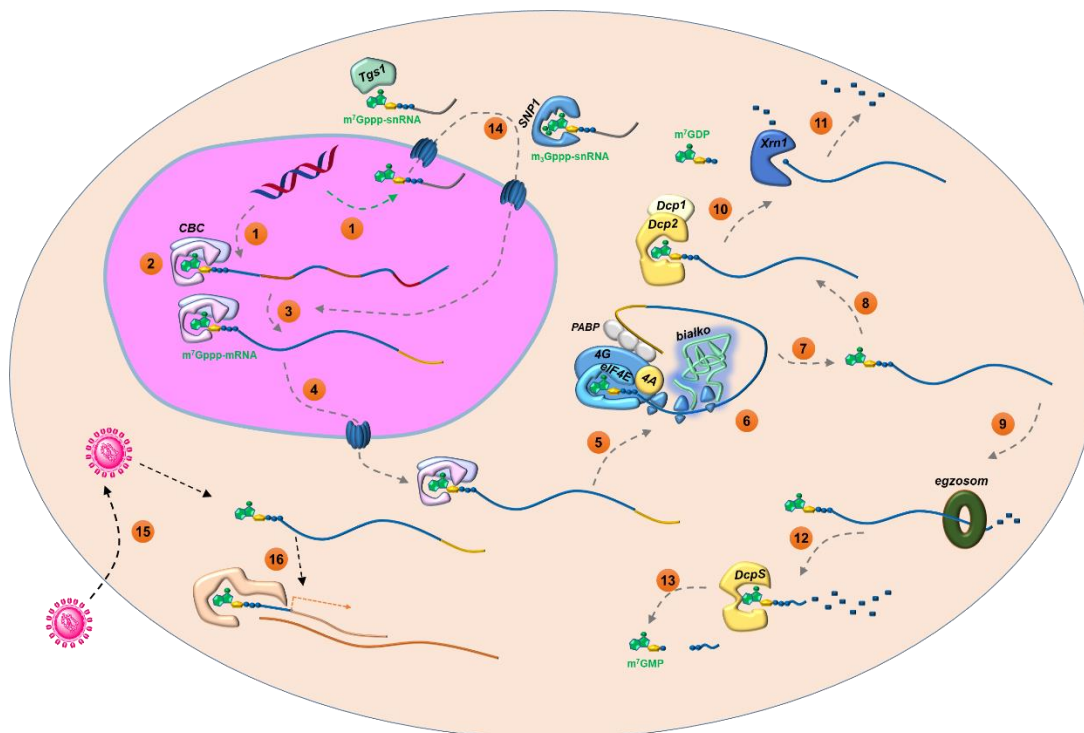
Mostek trifosforanowy w warunkach fizjologicznych, występuje w postaci zdeprotonowanej, co oznacza, że jest trzykrotnie ujemnie naładowany. Każdy ładunek ujemny jest zdelokalizowany pomiędzy dwoma niemostkowymi atomami tlenu danej grupy fosforanowej.

Czasami oprócz metylacji w pozycji N^7 guaniny (kap 0), struktura kapu może ulegać metylacji w innych pozycjach. W komórkach eukariontów najczęściej występuje kap 1. Kap 1

posiada dodatkową metylację w pozycji 2'-O rybozy pierwszego transkrybowanego nukleotydu, która jest efektem działania metylotransferaz w jądrze komórkowym. Dzięki tej metylacji możliwe jest rozróżnienie przez immunoreceptor RIG-I RNA własnych od RNA np. wirusowych.⁴⁴ Zidentyfikowano także obecność metylacji w pozycji 2'-O rybozy kolejnego transkrybowanego nukleotydu (kap 2), jednak jej rola nie została jeszcze dokładnie poznana.⁴⁵ Metylacje w obrębie 7-metyloguaniny, w pozycji N², skutkują natomiast powstaniem trimetyloguanozynokapu (TMG). Ta struktura kapu jest charakterystyczna dla małego jądrowego RNA (snRNA) oraz małego jąderkowego RNA (snoRNA). TMG jest rozpoznawany przez białko transporterowe Snurportynę1. Dzięki temu w pełni dojrzałe snRNA może zostać przeniesione z powrotem do jądra komórkowego, gdzie pełni ono swoją podstawową funkcję, czyli działa jako rybozym podczas splicingu.⁴⁶ TMG jest modyfikacją postranskrypcyjną.⁴⁷ Do innych modyfikacji postranskrypcyjnych należą modyfikacje zasad azotowych pierwszego transkrybowanego nukleotydu, w szczególności adeniny. Na dzień dzisiejszy wydaje się, że największe znaczenie ma metylacja w pozycji N⁶ adeniny. Pokazano, że obecność tej metylacji w obrębie pierwszego transkrybowanego nukleotydu poprawia wydajność translacji i wpływa na stabilność transkryptów.⁴⁸⁻⁵⁰ Natomiast znaczenie pojawienia się jej w innych miejscach mRNA jest wciąż intensywnie badane. Pokazano m.in. że obecność metylowanej adeniny może wpływać na regulację procesu translacji.⁵¹

Budowa kapu i jego właściwości sprawiły, że kap jest kluczowym elementem w wielu procesach związanych z ekspresją genu, głównie dzięki zdolności oddziaływania ze specyficznymi białkami. W jądrze komórkowym oddziałuje on z jądrowym kompleksem wiążącym kap, przez co bierze udział w dojrzewaniu i transporcie mRNA. W cytoplazmie jest on odpowiedzialny za inicjację translacji ze względu na oddziaływanie z eukariotycznym czynnikiem inicjującym translację (eIF4E, *eukaryotic translation initiation factor 4E*). Kap nie jest rozpoznawany przez 5'egzonukleazy, a tym samym chroni mRNA przed degradacją w kierunku 5' → 3'.^{47, 52} Ponadto kap jest również celem niektórych wirusów, które są zdolne do „przywłaszczenia” sobie tej struktury (*cap snatching*).⁵³

Na [Rysunku 6](#) przedstawiono schemat procesów, w które jest zaangażowana struktura kapu. Charakterystyczną budowę ma również koniec 3' mRNA tzw. ogon poli(A). Powstaje on w wyniku poliadenylacji (Rozdział 3.3.2). Ogon poli(A) składa się z od kilkudziesięciu do kilkuset nukleotydów adeninowych (z reguły od 50 do 250) połączonych wiązaniami 5', 3'-fosfodiesterowymi. Ogon poli(A) uczestniczy w eksporcie mRNA z jądra do cytoplazmy. Ponadto ogon poli(A) wpływa na wydajność translacji i chroni mRNA przed degradacją. W cytoplazmie ogon poli(A) stopniowo ulega skróceniu. Kiedy jest on wystarczająco krótki (10-25 nukleotydów), umożliwia zainicjowanie jednego ze szlaków degradacji mRNA (Rozdział 3.3.4).⁵⁵

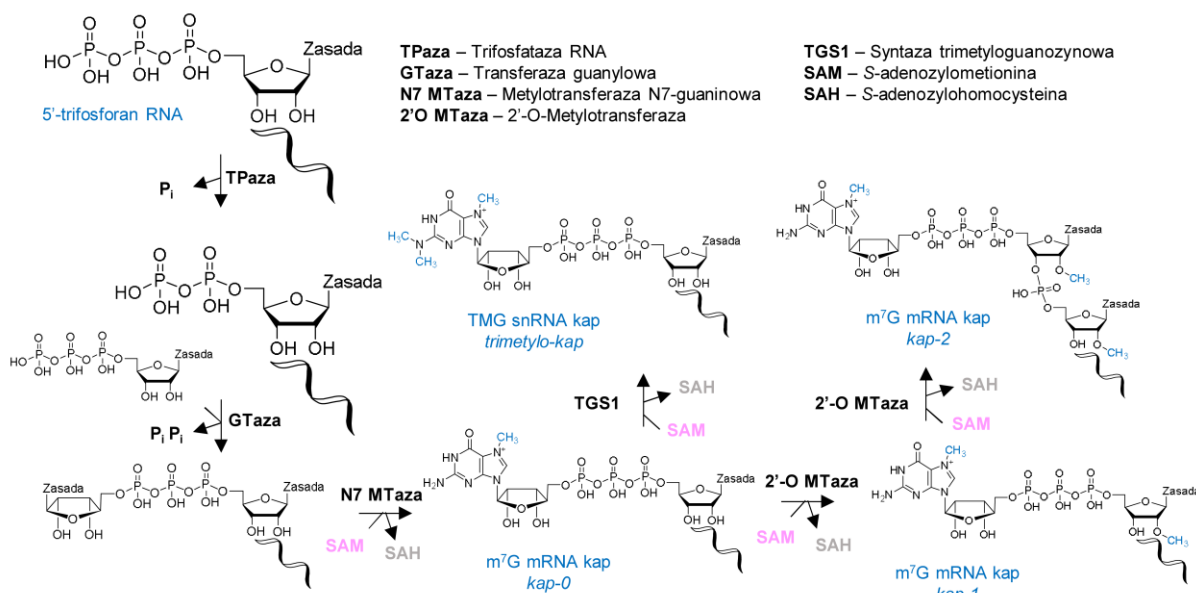


Rysunek 6. Przegląd procesów komórkowych, w które zaangażowana jest struktura kapu. Obrazek na podstawie Warmiński et al., 2017⁵⁴. 1 – transkrypcja genu i pojawienie się mRNA lub snRNA oraz synteza kapu, 2 – rozpoznanie pre-mRNA przez CBC (Cap Binding Complex), 3 – dojrzewanie mRNA: splicing i poliadenylacja, 4 – eksport mRNA do cytoplazmy, 5 – rozpoznanie mRNA przez eIF4E i utworzenie kompleksu inicjującego, 6 – translacja mRNA – biosynteza białka, 7 – deadenylation mRNA, 8 – degradacja mRNA w kierunku 5'→3', 9 – degradacja mRNA w kierunku 3'→5', 10 – dekapowanie mRNA przez Dcp1/2 z powstawaniem m⁷GDP, 11 – degradacja RNA przez 5'-egzonukleazy (ścieżka 5'→3'), 12 – degradacja RNA przez egzozom (ścieżka 3'→5'), 13 – hydroliza kapu przez DcpS z uwolnieniem m⁷GMP, 14 – dimetylowanie w pozycji N² niedojrzałego snRNA przez Tgs1 i import dojądrowy, 15 – inwazja wirusa, 16 – przywłaszczenie kapu przez wirusa.

3.3.2. Biosynteza kapu i dojrzewanie mRNA

mRNA powstaje w procesie transkrypcji, w wyniku którego polimeraza syntezuje łańcuch oligonukleotydowy używając 5'-trifosforanów nukleozydów jako substratów. Polimeraza kończąc swoje zadanie uwalnia oligonukleotyd, na końcu którego znajduje się 5'-trifosforan. Następnie dochodzi do hydrolizy wiązania pirofosforanowego z udziałem trifosfatazy mRNA, której produktem jest 5'-difosforan. W kolejnym etapie fragment guanozynomonofosforanowy pochodzący z GTP, jest przenoszony z udziałem transferazy guanylowej na koniec 5' z utworzeniem mostka 5',5'-trifosforanowego. W końcu pozycja N⁷ guaniny ulega metylacji w reakcji katalizowanej przez specyficzną metylotransferazę N⁷-guaninową. Tak powstaje opisana wcześniej struktura kapu 0, która może ulegać dalszym metylacjom.⁵⁶ Etapy biosyntezy kapu przedstawia Rysunek 7.

Po zakończeniu biosyntezy kapu, powstałe pre-mRNA ulega dalszej obróbce, co jest nazywane procesem dojrzewania mRNA. Pre-mRNA składa się z intronów – sekwencji niekodujących oraz egzonów – sekwencji kodujących. Pierwszym etapem dojrzewania jest splicing, czyli wycięcie intronów katalizowane przez spliceosom – kompleks białek i snRNA, a następnie łączenie egzonów.

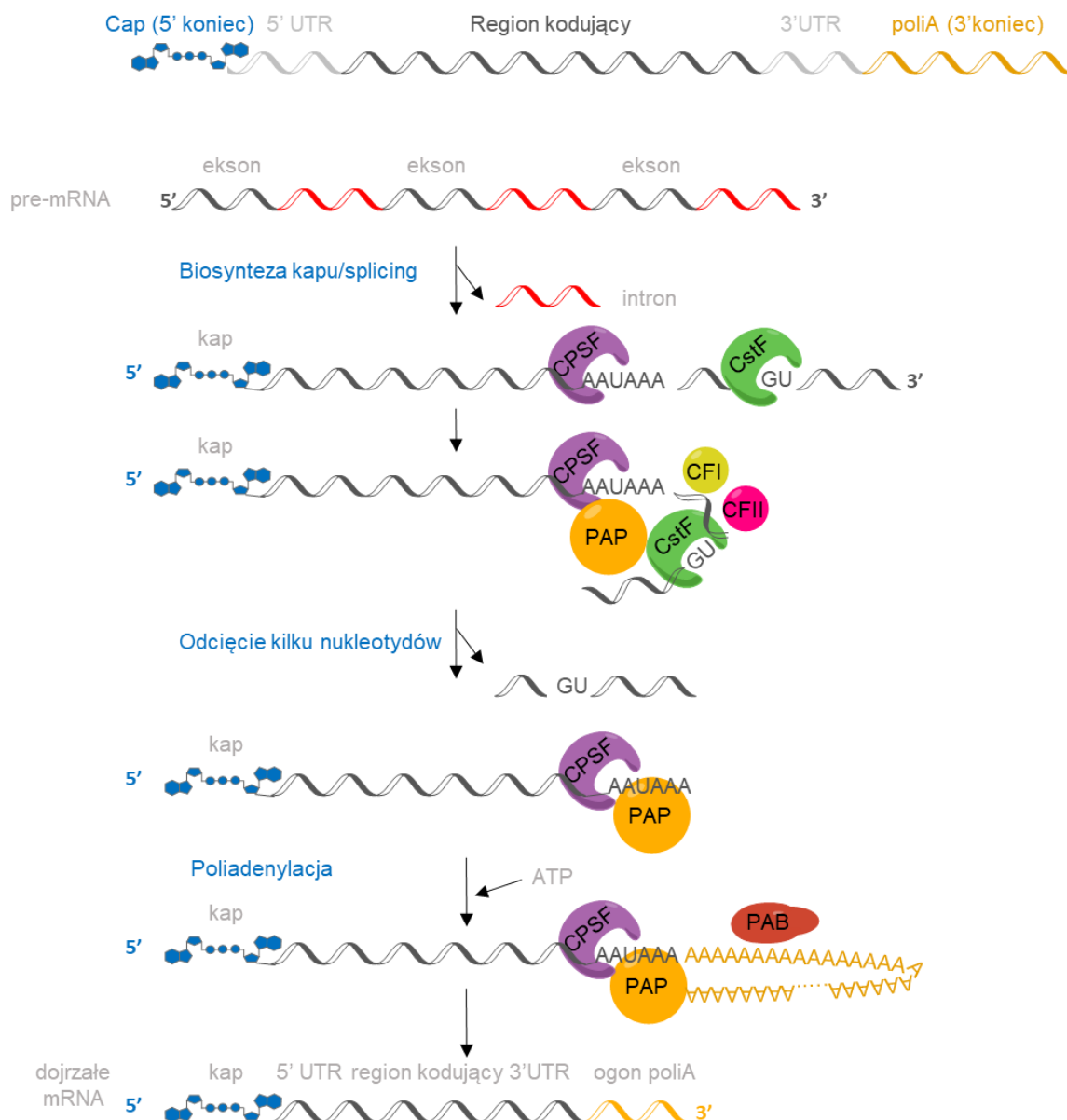


Rysunek 7. Schemat biosyntezy kapu. Na podstawie Warminski et al., 2017.⁵⁴

Opisano również zjawisko splicingu alternatywnego, który polega na tym, że łączone są ze sobą różne egzony, niekoniecznie według kolejności zapisanych w genach. Może również dochodzić do pominięcia niektórych egzonów lub nie usuwania niektórych intronów. Dzięki temu z jednego fragmentu DNA może powstać więcej niż jedna cząsteczka mRNA, co jest źródłem zmienności białek. Innym zjawiskiem powodującym zmianę sekwencji aminokwasów kodowanego białka w stosunku do tej przewidywanej przez sekwencje genomowego DNA jest edytowanie RNA. W wyniku procesów chemicznych jedna zasada azotowa zostaje zamieniona na inną np. adenozyna jest przekształcana w inozynę. Podczas translacji inozyna interpretowana jest jako guanozyna. W konsekwencji dochodzi do zmiany informacji genetycznej zawartej w transkrypcie RNA.⁵⁷

Kolejnym etapem dojrzewania pre-mRNA jest poliadenylacja. Proces ten polega na dobudowywaniu na końcu 3' nukleotydów adeninowych z wytworzeniem ogona poli(A). Proces katalizowany jest przez polimerazę poli(A) (*poly(A) polymerase*, PAP). Do końca 3' mRNA przyłącza się kompleks białkowy (*multi protein complex*). Czynniki CPSF (*cleavage and poly(A)denylation specificity factor*), który wchodzi w skład tego kompleksu, rozpoznaje i wiąże sekwencję AAUAAA, a kolejny czynnik CstF (*cleavage stimulation factor*) wiąże położony w pobliżu obszar bogaty w uracyl lub uracyl i guaninę. Kolejny czynnik, CFI, rozpoznaje sekwencję UGUAA i może rekrutować CPSF nawet, jeśli sekwencja AAUAAA nie jest obecna. Po związaniu tych czynników do RNA dochodzi do przecięcia cząsteczki w odległości około 35 nukleotydów za sekwencją AAUAAA. Jest to sygnał dla PAP do rozpoczęcia dołączania nukleotydów adeninowych. Inne białko, PABP (*poly(A) binding protein*), wiąże się z nowym, krótkim ogonem poli(A) i zwiększa powinowactwo PAP do RNA oraz kontroluje długość ogona. Gdy ogon poli(A) ma długość około 250 nukleotydów, PAP traci kontakt z CPSF, co sygnalizuje zakończenie poliadenylacji (Rysunek 8). Białko PABP wiążąc się do ogona poli(A) chronią go przed działaniem egzonukleaz, a tym samym RNA przed degradacją. Dojrzałe mRNA z ogonem poli(A) jest transportowane do cytoplazmy, do czego przyczynia się również obecność ogona poli(A). W cytoplazmie jedno z białek PABP,

dzięki oddziaływaniu z eIF4G umożliwia interakcje końca 3' z końcem 5' mRNA i stymuluje translację.⁵⁸



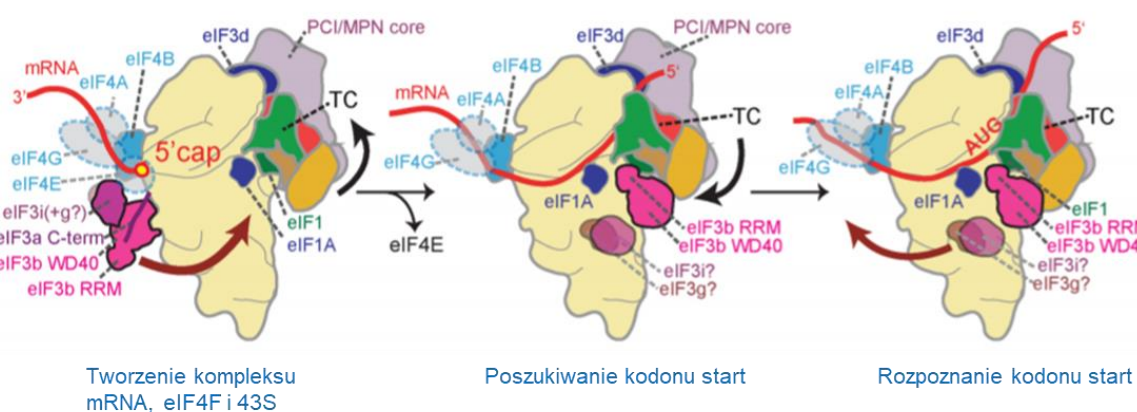
Rysunek 8. Schemat splicing i poliadenylacji.

3.3.3. Proces translacji

Proces tłumaczenia sekwencji nukleotydów zapisanej w mRNA na sekwencje aminokwasów w białku nazywa się translacją. Translacja to proces kilku etapowy i podlegający ścisłej regulacji. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa zdolność mRNA do specyficznego wiązania się z określonymi białkami i czynnikami regulatorowymi. Translację można podzielić na 3 główne etapy: inicjację, elongację i terminację.

W procesie inicjacji translacji ważną rolę odgrywa struktura kapu, która rozpoznawana jest przez czynnik białkowy eIF4E, co stanowi sygnał do zapoczątkowania procesu tworzenia się kompleksu inicjującego translację. W skład kompleksu inicjującego wchodzi mniejsza i większa podjednostka rybosomu oraz czynniki inicjujące (eIF). Jednym z tych czynników jest wspomniane białko eIF4E wiążące kap, ale również czynnik eIF4G, tworzący swego rodzaju

rusztowanie dla wiązania się innych białek w tym eIF4A, będącego helikazą rozplatającą struktury drugorzędowe występujące w rejonie 5'-UTR. Wszystkie te czynniki tworzą razem kompleks eIF4F. Kompleks eIF4F wraz z kapem łączy się z kompleksem 43S za pośrednictwem czynnika eIF3. 43S jest to kompleks złożony z metionylo-tRNA, mniejszej podjednostki rybosomu (40S) i czynnika eIF2. Razem te dwa oddziałujące kompleksy nazywane są 48S. Następnie zaczyna się proces skanowania mRNA w poszukiwaniu kodonu start. Po rozpoznaniu sekwencji startowej AUG, następuje oddysocjowanie eIF2 i przyłączenie eIF5B, po czym rozpoczyna się proces rekrutacji większej podjednostki rybosomu (60S). Po utworzeniu kompleksu inicjującego (80S) (**Rysunek 9**) i zainicjowaniu procesu translacji następuje wydłużanie łańcucha peptydowego w procesie elongacji.⁵⁹



Rysunek 9. Model kompleksu inicjującego translację oraz zmian konformacyjnych podczas początkowych etapów inicjacji. Zaczepnięto z pracy Eliseev et al., 2018⁶⁰.

Proces elongacji przebiega z udziałem czynników elongacyjnych eEF1 i eEF2. Pierwszy z tych czynników katalizuje proces przyłączenia aminoacylo-tRNA (kompleks tRNA-aminokwas, aa-tRNA) do rybosomu. Proces translacji zachodzi na zasadzie komplementarności kodonu mRNA z antykodonom na tRNA. Po przyłączeniu aa-tRNA następuje tworzenie się wiązania peptydowego między grupą aminową, a grupą karboksylową kolejnych aminokwasów z udziałem peptydotransferazy, wchodzącej w skład rybosomu. Następnie, po dołączeniu aminokwasu do syntezowanego peptydu, czynnik eEF2 uczestniczy w przesuwaniu nici mRNA wzdłuż rybosomu o jeden kodon (3 nukleotydy).⁶¹ Elongacja trwa do momentu napotkania przez rybosom kodonu stop (UAA, UAG lub UGA). Terminacja translacji podlega regulacji przez czynniki terminujące (eRF). eRF1 bierze udział w rozpoznaniu kodonu stop i zapoczątkowuje reakcję hydrolizy wiązania estrowego łączącego łańcuch peptydowy z tRNA. Następnie czynnik eRF3 posiadający aktywność GTPazy, pomaga eRF1 uwolnić zsintezowany polipeptyd do cytoplazmy. tRNA odłącza się od mRNA, a rybosom rozpada się na podjednostki, które mogą zostać ponownie wykorzystane w inicjacji translacji kolejnego mRNA.⁶²

3.3.4. Ścieżki degradacji mRNA

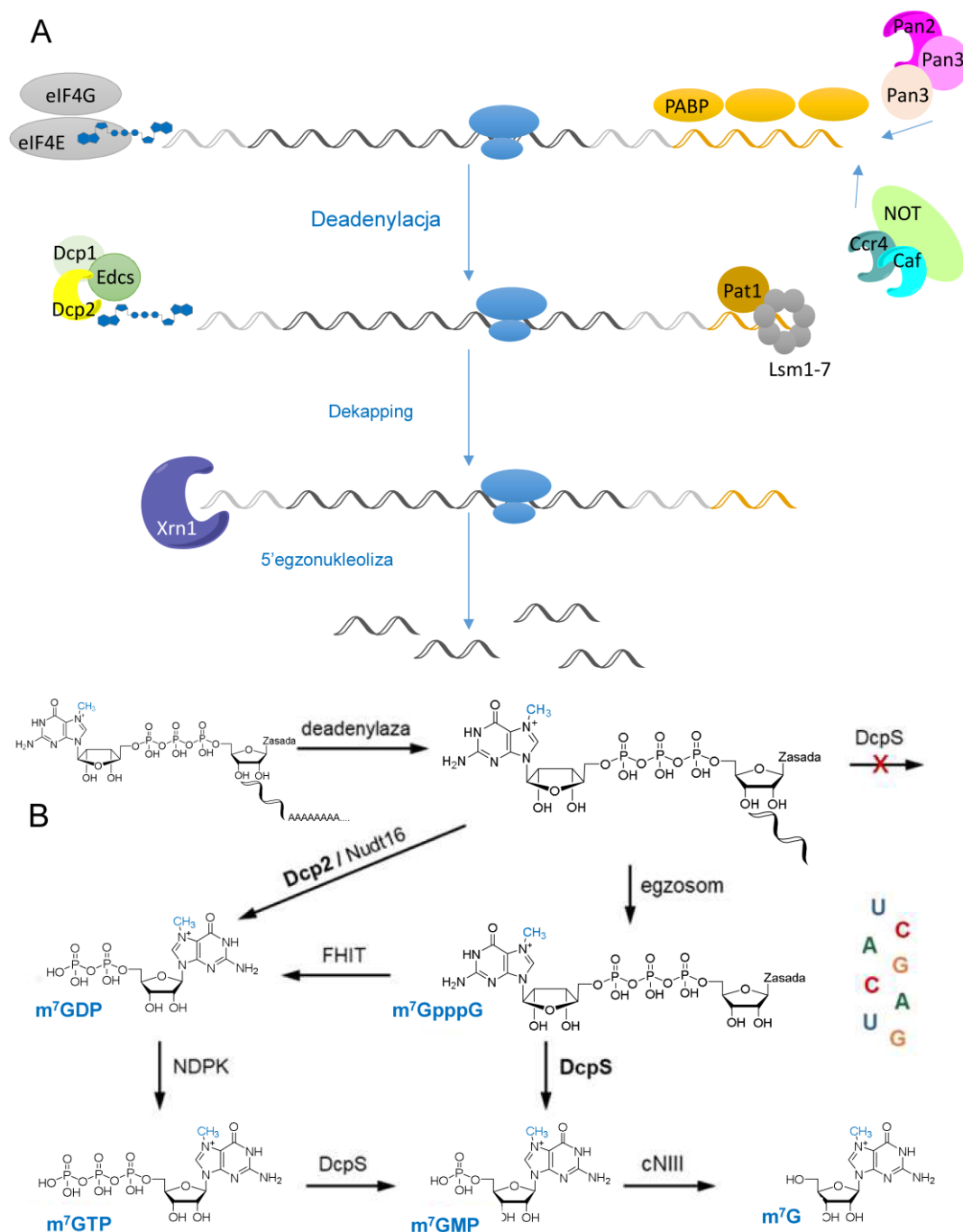
W celu regulowania procesu ekspresji genów, charakterystyczne struktury na końcu 5' i 3' mRNA, takie jak kap i ogon poli(A), chronią mRNA przed przedwczesną degradacją.

Umożliwia to zachowanie równowagi pomiędzy stabilnością i degradacją mRNA. Degradacja mRNA jest jedną z metod stosowanych przez komórki do kontrolowania, kiedy ekspresja danych genów się zakończy.

Procesy degradacji mRNA zaczynają się od skracania ogona poli(A). Ulega on stopniowej degradacji w wyniku działania cytoplazmatycznych egzonukleaz. W niektórych przypadkach może on ulec specyficznej degradacji poprzez działanie rybonukleazy PARN lub endonukleaz odcinających ogon poli(A) od reszty nukleotydów.^{63, 64} Proces deadenyacji rozpoczynający ścieżkę degradacji $5' \rightarrow 3'$, sprawia, że powinowactwo białek PABP zmniejsza się oraz dochodzi do zmniejszenia wydajności translacji.⁶⁵ Za proces deadenyacji odpowiedzialne są dwa duże kompleksy: PAN2-PAN3 oraz CCR4-NOT, którego jedną z podjednostek jest CNOT7 (*Ccr4-Not transcription complex subunit 7*) ([Rysunek 10](#)). Ostatnie doniesienia sugerują, że kompleksy te mogą celować w różne populacje mRNA.^{66, 67} Po usunięciu ogona poli(A) dochodzi do utworzenia kompleksu Pat1-Lsm1-7, który rekrutuje enzym dekapujący Dcp2 ([Rysunek 10](#)). Dcp2 hydrolizuje mostek $5',5'$ -trifosforanowy kapu, uwalniając m^7GDP oraz mRNA z resztą $5'$ -monofosforanową. Uwolnione mRNA ulega natychmiastowej hydrolizie do pojedynczych nukleotydów przez $5'$ -egzonukleazę Xrn1.

Została również opisana alternatywna ścieżka degradacji mRNA, degradacja w kierunku $3' \rightarrow 5'$. W tym przypadku egzozom hydrolizuje stopniowo deadenyłowany transkrypt rozpoczynając od końca $3'$. Jako produkt tej reakcji uwolniony zostaje m^7GpppN , który ulega dalszej degradacji głównie z udziałem enzymu DcpS (*Decapping Scavenger*).⁶⁸ Inhibitorem DcpS, przynajmniej w warunkach *in vitro*, jest produkt powstający w wyniku działania Dcp2 – m^7GDP .⁶⁹ Pokazano, że m^7GDP może ulegać fosforylacji z udziałem kinazy NDK do m^7GTP .^{70, 71} Oprócz DcpS zostały zidentyfikowane również inne enzymy zdolne do rozpoznawania struktury kapu np. FHIT, jednak procesy te są dalej badane.⁷² Wciąż badane są też dalsze losy m^7GMP i proces jego degradacji. Ostatnio opisano enzym cNIIIB, który *in vitro* katalizuje defosforylację m^7GMP . Jednak jego potencjalne znaczenie w ścieżkach degradacji RNA w komórce wciąż nie zostało ustalone.⁷³⁻⁷⁶

Ścieżki degradacji mRNA są intensywnie badane, mimo to wciąż wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Otwarte pytania dotyczą m.in. stopnia zaangażowania poszczególnych enzymów w metabolizm kapu, metabolizmu powstających produktów, identyfikacji ostatecznych metabolitów. Co więcej, nie jest jasne jak PAN2-PAN3 czy CCR4-NOT rozpoznają specyficzne transkrypty mRNA. W kontekście terapeutycznych zastosowań mRNA, jednym z ważniejszych zagadnień wydaje się być osiągnięcie zwiększonej stabilności mRNA w warunkach komórkowych. Poznanie ścieżek degradacji mRNA jest niezbędnym elementem do racjonalnego projektowania stabilizowanego mRNA. Do tego celu przydatne mogą być odpowiednio zaprojektowane narzędzia molekularne.



Rysunek 10. Proces degradacji mRNA. (A) - główne etapy degradacji 5'-3'. Na podstawie Mugridge et al., 2018.⁷⁴ (B) - ścieżki degradacji mRNA z uwzględnieniem produktów degradacji kapu. Na podstawie Warminski et al., 2017.⁵⁴

3.3.5. Znaczenie biologiczne i terapeutyczne syntetycznych analogów końca 5' mRNA i mRNA

Zaburzenia na jakimkolwiek z wcześniej opisanych etapów syntezy i degradacji mRNA mogą mieć poważne konsekwencje dla funkcjonowania organizmu. Dogłębne zrozumienie procesów związanych z mRNA umożliwia projektowanie syntetycznych mRNA lub jego analogów, które mogą mieć zastosowanie w terapii genowej. W szczególności uwaga naukowców skupiona jest na modyfikacji kluczowych struktur mRNA - takich jak kap i ogon poli(A), które odpowiadają za stabilność mRNA i powinowactwo do białek. Strategie

terapeutyczne ukierunkowane są na zmiany właściwości końców mRNA w taki sposób, żeby zwiększyć powinowactwo do białek je wiążących oraz zwiększyć stabilność mRNA i wydajność translacji. Takie strategie stosowane są w terapiach nowotworowych, terapiach chorób genetycznych, przeciwwirusowych oraz terapii genowej.⁷⁷⁻⁷⁹

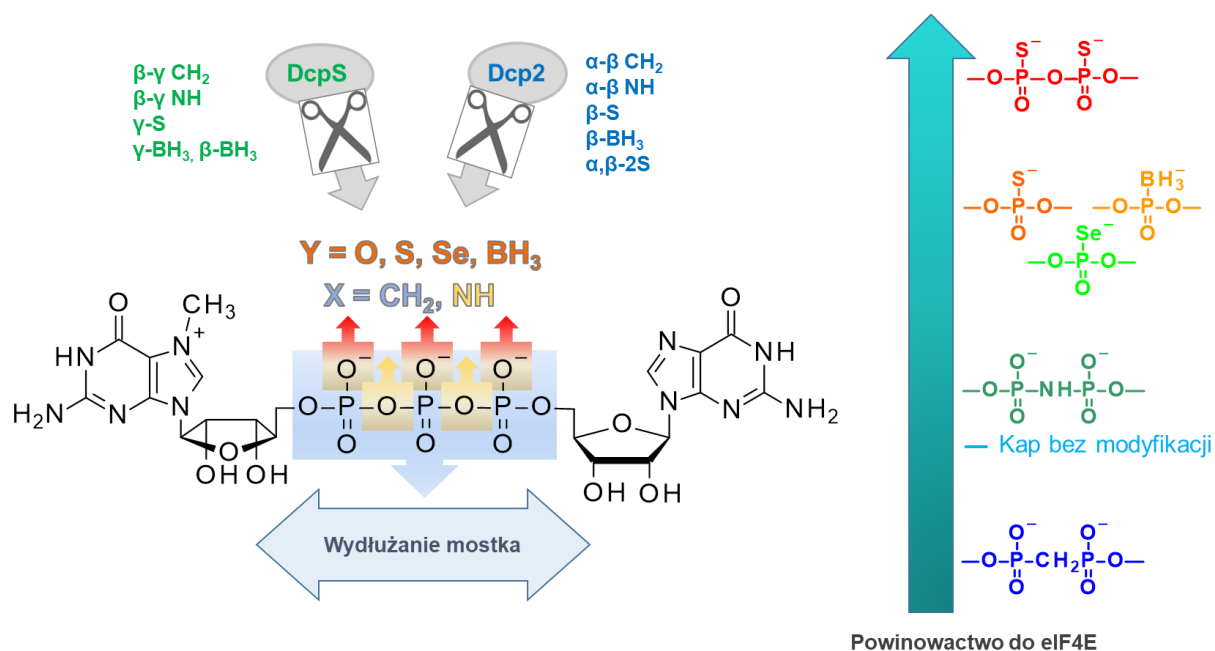
Chemicznie modyfikowane mRNA, np. zawierające odpowiednie znaczniki, mogą służyć jako sondy do badania procesów wewnątrzkomórkowych, w które zaangażowane jest mRNA. Małocząsteczkowe związki będące inhibitorami enzymów zaangażowanych w degradację mRNA również mogą stanowić narzędzia biomolekularne służące dogłębnemu zrozumieniu tych procesów, a tym samym projektowaniu skuteczniejszych terapeutyków. W kolejnych rozdziałach pokazane zostały przykłady modyfikowanych analogów końca 5' mRNA o wysokim potencjalnie terapeutycznym, strategii immunoterapii opartej o mRNA oraz analogi mRNA z modyfikacjami końca 3' mRNA i ich znaczenie.

3.3.5.1. Terapeutyczne zastosowania analogów końca 5' mRNA

Modyfikacje końca 5' prowadzone są w kierunku zwiększenia powinowactwa do białek wiążących kap, przez co mogą stać się ich inhibitorami oraz zapewnić większą stabilność mRNA. Z drugiej strony modyfikacje muszą być dobrane tak, aby zapewniać odpowiednią wydajność translacji. Jednym słowem analogi mRNA muszą stać się konkurencyjne w stosunku do mRNA naturalnie występującego w komórkach.

Jedną z strategii przeciwnowotworowych zakłada wykorzystanie zdolności analogów kapu do wiązania się z białkiem eIF4E. Zbadano, że nadekspresja tego białka jest charakterystyczna dla komórek nowotworowych i może powodować translację tzw. „słabych” mRNA, które w zdrowych komórkach nie ulegają translacji. „Słabe” mRNA kodują onkogenne czynniki wzrostu i w przypadku ich ekspresji dochodzi do nowotworzenia. Związanie nadmiaru eIF4E przez analogi kapu może przyczynić się do zmniejszenia translacji „słabych” mRNA, a tym samym zahamowania rozwoju nowotworu.⁸⁰ Analogi kapu o zwiększonym powinowactwie do eIF4E zostały przedstawione na [Rysunku 11](#).

Innym białkiem, które może być wykorzystane jako cel terapeutyczny jest DcpS. Inhibicja tego białka może być pomocna w terapii rdzeniowego zaniku mięśni (*Muscular Atrophy*, SMA). Przyczyną tej choroby jest niedostateczna ilość białka SMN spowodowana brakiem genu SMN1. Wykazano, że inhibicja DcpS ma związek z ekspresją genu SMN2. Do tej pory jako inhibitory w modelu mysim zastosowano pochodne 2,4-diaminochinazoliny.⁸¹ Znane są również analogi kapu inhibujące DcpS, w szczególności zawierające modyfikacje metylenobisfosfonianową lub imidodifosforanową w pozycji β - γ ^{82, 83} oraz modyfikacje fosforanu γ , takie jak γ -tiofosforan,⁸⁴ γ -boranofosforan,⁸⁵ czy 5'- γ -fosfotioester⁸⁶ ([Rysunek 11](#)). Modyfikacje w tych pozycjach mają swoje uzasadnienie w tym, że DcpS hydrolizuje kap z uwolnieniem m⁷GMP w przeciwieństwie do Dcp2, którego produktem degradacji jest m⁷GDP. W tym przypadku analogi odporne na hydrolizę przez ten enzym zawierają modyfikacje w pozycjach α - β , ale również jak w przypadku DcpS modyfikacje pozostałych tlenów niemoistkowych np. w pozycji β , takie jak β -tiofosforan,⁸⁴ czy β -boranofosforan,⁸⁵ ([Rysunek 11](#)). Analogi odporne na degradację przez Dcp2 syntetyzowane są w celu zwiększenia stabilności mRNA.



Rysunek 11. Powinowactwo i zdolność do inhibicji analogów kapu względem białek wiążących kap. Na podstawie Warminski et al., 2017.⁵⁴

Innym potencjalnym podejściem terapeutycznym wydaje się być zastosowanie analogów TMG kapu połączonych z nukleotydami antysensownymi (*antisense oligonucleotides*, ASO). Terapia oparta o zastosowanie antysensownych nukleotydów polega na korekcji procesu splicingu. Nieprawidłowy splicing może powodować produkcję nieprawidłowych białek w wyniku przesunięcia ramki odczytu lub pojawienia się mutacji punktowych. Jest to przyczyną chorób genetycznych takich jak dystrofia mięśniowa Duchenne’a. W celu otrzymania satysfakcjonującego efektu terapeutycznego, ważna jest prawidłowa lokalizacja ASO. Znakowanie TMG kapem antysensownych oligonukleotydów zapewnia pozostanie ASO w jądrze komórkowym, gdzie zachodzi proces splicingu.⁸⁷

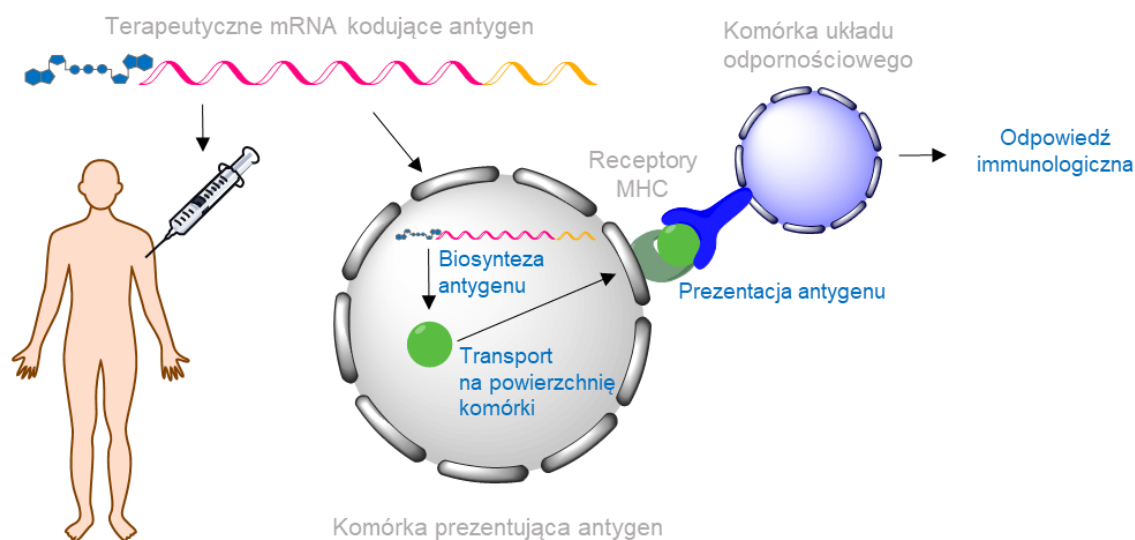
Kolejnym podejściem jest zastosowanie analogów kapu w terapii przeciwwirusowej. Materiał genetyczny wirusów ulega replikacji w cytoplazmie, co skutkuje pojawieniem się bardzo dużej ilości wirusowego RNA w zarażonych komórkach. W związku z tym wirusy wykształciły wiele systemów umożliwiających przetrwanie w komórkach gospodarza takie jak zwiększenie stabilności i upodobnienie się do RNA występującego w komórkach gospodarza. Ponadto wirusy wykształciły zdolność przywłaszczenia struktury kapu, przez co mogą zwiększyć ekspresję swoich białek dzięki rozpoznaniu ich RNA przez mechanizmy translacji zależnej od kapu żywiciela. Celem terapeutycznym są enzymy, które umożliwiają wirusowi syntezę kapu na jego RNA. Do tych enzymów należą między innymi RNA trifosfatazy, guanylotransferazy, metylotransferazy oraz enzymy odpowiadają za odcięcie kapu z mRNA gospodarza i dołączenie jej na końcu RNA wirusa. Do analogów kapu będących inhibitorami tych enzymów należą np. $\text{et}^2\text{m}^7\text{GMP}$, $\text{m}^{2,7}\text{GMP}$, $\text{m}^{2,7}\text{GpppG}$.⁸⁷

Analogi końca 5' posiadające potencjał terapeutyczny mają różną strukturę w związku z tym ich ścieżki metaboliczne mogą się różnić. Dlatego przydatne są metody monitorowania ich metabolizmu w komórkach.

3.3.5.2. Znaczenie biologiczne i terapeutyczne mRNA

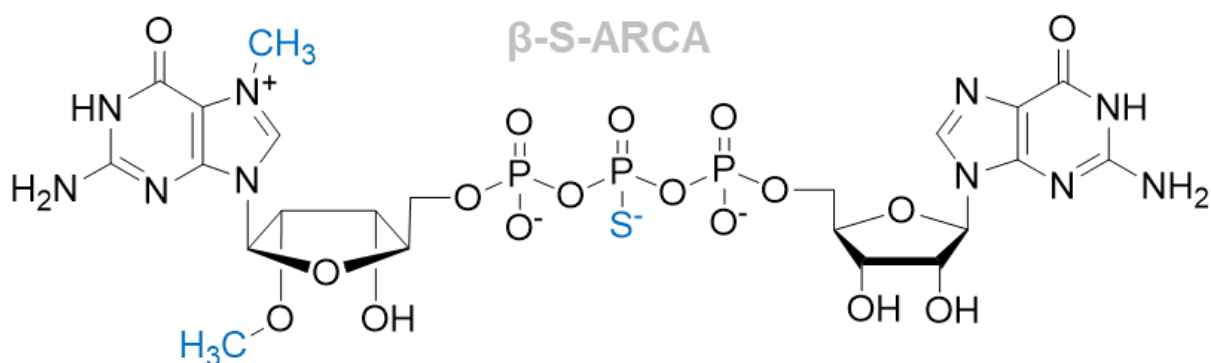
Innym podejściem terapeutycznym, w którym znaczenie ma mRNA, jest terapia genowa, która może działać przeciwnowotworowo, przeciwwirusowo oraz ma zastosowanie w przypadku chorób genetycznych. Terapia genowa może mieć zastosowanie przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe oraz w leczeniu chorób genetycznych związanych z dysfunkcją białek. W terapii genowej wykorzystuje się kwasy nukleinowe, które kodują sekwencje określonego białka. Jednakże mRNA wydaje się być bezpieczniejszym terapeutycznym niż DNA, ponieważ nie ma konieczności integracji z genomem pacjenta, aby doszło do syntezy białka. Ponadto ekspresja RNA zachodzi w cytoplazmie, przez co nie ma potrzeby dostarczania go do jądra komórkowego. Eliminuje to ryzyko mutagenyzy, a tym samym zmniejsza kancerogenność. Co więcej dostarczanie mRNA, można zrealizować za pomocą nanocząstek lipidowych lub liposomów, w przeciwieństwie do DNA, gdzie używa się wektorów wirusowych.^{88, 89} Zastosowanie takich wektorów wiąże się z ryzykiem uruchomienia odpowiedzi układu immunologicznego i wystąpienia poważnych skutków ubocznych. Zaletą mRNA jest to, że jego ekspresja jest przejściowa (RNA ostatecznie ulega degradacji). W przypadku DNA raz wbudowana do genomu sekwencja pozostaje tam „na zawsze” i jeśli ekspresja białka będzie nadmierna, trudno ją powstrzymać. Z drugiej strony niestabilność mRNA jest wyzwaniem podczas projektowania terapii.

Szczepionki mRNA są jednym z rodzajów przeciwnowotworowej immunoterapii genowej. W tej terapii wykorzystuje się fakt, że jedne z komórek układu immunologicznego – komórki dendrytyczne są zdolne do internalizacji mRNA z otoczenia. mRNA stosowane w takiej terapii koduje konkretne białko (antygen), które ulega ekspresji w komórkach dendrytycznych. Białko to powinno być białkiem charakterystycznym dla danego nowotworu, jednocześnie niewystępującym w zdrowym organizmie. Powstały antygen jest prezentowany na powierzchni komórek dendrytycznych, co wywołuje odpowiedź układu immunologicznego; m.in. wytwarzane są przeciwciała rozpoznające ten antygen oraz następuje aktywacja limfocytów T cytotoksycznych. W ten sposób układ odpornościowy jest aktywowany i dochodzi do odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym (Rysunek 12).



Rysunek 12.Strategia immunoterapii opartej o mRNA.

Dobrze zaprojektowany terapeutyk oparty o mRNA powinien charakteryzować się zwiększoną stabilnością oraz wydajnością translacji, w celu efektywnego wyprodukowania białka, które koduje. Te parametry można zapewnić dzięki odpowiednio zmodyfikowanej strukturze kapu odpornej na działanie enzymów degradujących takich jak Dcp2 oraz posiadających zwiększone powinowactwo do eIF4E, przez co uzyskuje się odpowiedni poziom translacji. Takie właściwości wykazują m.in. β -tiofosforanowe analogi kapu (tzw. β -S-ARCA, [Rysunek 13](#)), a zawierające je szczepionki przeciwko czerniakowi złośliwemu i rakowi piersi są obecnie na etapie badań klinicznych.⁹⁰



Rysunek 13. Struktura β -S-ARCA.

W sekwencji mRNA można zakodować praktycznie każde białko. Podejście to może być wykorzystane w leczeniu chorób genetycznych, których przyczyną jest deficyt określonych białek lub w szczepionkach przeciwvirusowych, kodując antygen charakterystyczny dla danego wirusa.

3.3.6. Otrzymywanie mRNA z modyfikowanym ogonem poli(A)

Ogon poli(A) odpowiada również za stabilizację mRNA oraz wydajność translacji w komórkach, więc można by oczekiwać, że jednoczesna stabilizacja końca 3' również mogłaby mieć korzystny wpływ na stabilność mRNA i wydajność translacji. Jednakże, doniesień odnośnie stabilizacji końca 3' mRNA w kontekście tworzenia potencjalnych terapeutyków jest znacznie mniej. Może to wynikać z kilku czynników. Mechanizmy procesów, w których bierze udział ogon poli(A) nie są do końca poznane. Nie udało się m.in. jeszcze uzyskać modelu oddziaływania białek eIF4E-4G-PABP podczas cyklizacji mRNA.⁹¹ Wiadomo, że kompleks ten zwiększa stabilność transkryptu oraz zwiększa wydajność translacji, jednak mechanizm nie został do końca wyjaśniony. Co więcej, wprowadzenie modyfikacji końca 3' w sposób kontrolowany i z zachowaniem wysokiej homogenności mRNA jest dużym wyzwaniem.

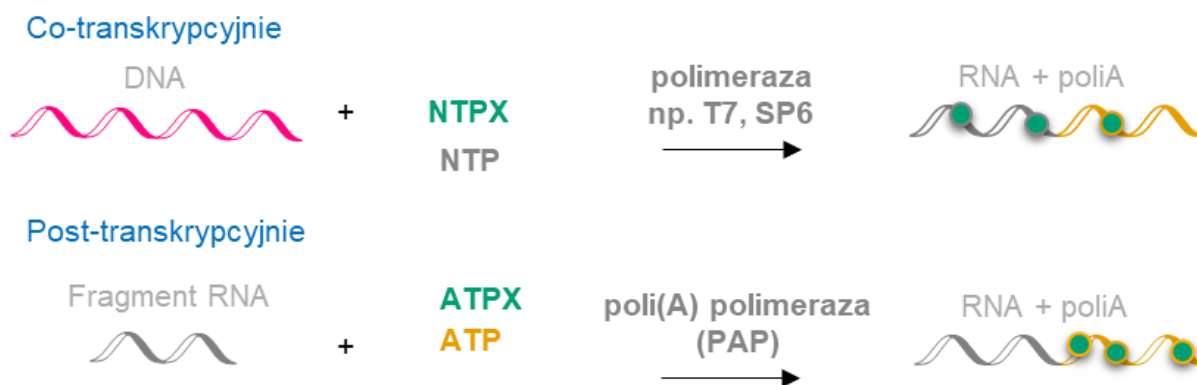
mRNA można otrzymać podczas transkrypcji (co-transkrypcyjnie) lub po transkrypcji (post-transkrypcyjnie) ([Rysunek 14](#)). mRNA otrzymywane co-transkrypcyjnie jest syntetyzowane na matrycy DNA (może również mieć zakodowany ogon poli(A)) z udziałem polimeraz np. SP6 lub T7. Do tej reakcji jako substratów używa się trifosforanów nukleozydów (NTP) lub ich analogów w przypadku, kiedy mRNA ma zawierać modyfikacje.⁹² Zaletą tego podejścia jest to, że otrzymany produkt charakteryzuje się wysoką homogennością. Polimeraza T7 akceptuje jako substraty nie tylko naturalne nukleotydy, ale również ich analogi np.

NTP α S⁹³, GTP γ S⁹⁴, 6-Aza-UTP⁹⁵ i inne.⁹² Wadą jest to, że modyfikacje nie są wprowadzane w sposób kontrolowany i mogą występować w całej cząsteczce mRNA.

Innym podejściem jest modyfikacja końca 3' mRNA post-transkrypcyjnie. W tym przypadku do fragmentu RNA, dosyntetyzowany zostaje ogon poli(A) z udziałem poli(A) polimerazy (PAP). Jako substratów w tej reakcji używa się ATP lub jego analogów. Zaletą tej metody jest otrzymanie mRNA, modyfikowanego tylko w obrębie ogona poli(A), natomiast wadą to, że otrzymane mRNA charakteryzują się wysoką heterogennością i wymagane jest ich oczyszczanie.

W literaturze opisano zastosowania mRNA modyfikowanych w obrębie ogona poli(A) jako narzędzi badawczych. Anhauser i współpracownicy stworzyli narzędzie badawcze w postaci mRNA znakowanego w obrębie ogona poli(A) znacznikami fluorescencyjnymi.⁹⁶ Sposób znakowania ogona poli(A) jaki zaproponowali nie zmieniał znacząco właściwości mRNA, a co więcej poprawiał wydajność translacji. W pracy pokazano, że za pomocą polimerazy poli(A) można wprowadzić do ogona poli(A) azydo-zmodyfikowane nukleotydy. Powstałe mRNA może reagować w reakcji „click” ze znacznikiem fluorescencyjnym.⁹⁶ Podejście to miało na celu umożliwienie badania lokalizacji komórkowej mRNA, ale także analizę białek wiążących mRNA. Zaprezentowane wyniki budzą nadzieję na zastosowanie tego podejścia do badań rozwojowych na organizmach modelowych lub nawet do badania terapeutycznych mRNA.

W związku z tym, że modyfikowane mRNA ma duże znaczenie terapeutyczne i biologiczne istnieje potrzeba udoskonalenia metod syntezy mRNA, a także potrzeba rozwoju nowych metod modyfikacji mRNA, które zapewniłyby większą wydajność i homogenność powstałych produktów.



Rysunek 14. Otrzymywanie i funkcjonalizacja mRNA.

3.4. Metody analizy nukleotydów i oligonukleotydów ze szczególnym uwzględnieniem mRNA

Wcześniejsze rozdziały pokazały jak duży potencjał ma zastosowanie modyfikowanych nukleotydów i mRNA w szeroko pojętej terapii. Jednak w celu racjonalnego projektowania nowych terapeutyków ważne jest dokładne poznanie i zrozumienie procesów komórkowych, w które mają one ingerować. Co więcej, dokładna charakterystyka strukturalna oraz powiązanie

struktury i funkcji nowych analogów mRNA jest kluczowym elementem umożliwiającym ich dalsze zastosowania. Tutaj z pomocą przychodzi szeroki wachlarz metod biochemicznych i biofizycznych pozwalających na dokładną charakterystykę struktury i właściwości mRNA. Metody biofizyczne i biochemiczne służą w szczególności do identyfikacji modyfikacji w obrębie mRNA oraz wpływu tych modyfikacji, na właściwości mRNA. Co więcej służą do badania powinowactwa do białek, stabilności mRNA i wydajności translacji.

3.4.1. Metody badania właściwości fizycznych nukleotydów i kwasów nukleinowych

Podstawową informacją, jaką należy uzyskać na temat otrzymanych cząsteczek jest ich dokładna struktura, z której wynika ich funkcja. Bardzo dokładną metodą badania struktury jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*nuclear magnetic resonance*, NMR). Metoda ta dostarcza informacji o szczegółach struktury elektronowej cząsteczki i jej poszczególnych grup funkcyjnych na podstawie zmiany częstotliwości rezonansowej badanych jąder atomowych, wywołanej przez wewnętrzcząsteczkowe pole magnetyczne wokół atomu w cząsteczce. Metoda bardzo dobrze sprawdza się w badaniu pojedynczych nukleotydów jednakże wraz ze wzrostem liczby atomów wyniki są coraz trudniejsze do interpretacji. Czynnikiem limitującym jest również potrzeba przygotowania znacznej ilości materiału do badania, co uniemożliwia zastosowanie tej techniki do badania struktury pełnej długości mRNA.

Drugą dominującą metodą w badaniach strukturalnych jest krystalografia rentgenowska. Jest to również bardzo dokładna technika, która umożliwia charakterystykę samych nukleotydów jak i kompleksów nukleotydowych z białkami je wiążącymi. Metoda pozwala na uzyskanie informacji na temat geometrii oraz rozkładu ładunku w otoczeniu poszczególnych atomów, co jest niezwykle cenną informacją w projektowaniu nowych analogów.^{97, 98} Czynnikiem ograniczającym tę metodę jest konieczność uzyskania monokryształu, co w wielu przypadkach jest rzeczą trudną, a czasami wręcz nie możliwą. Problemem jest również ograniczenie aparaturowe (dostępność źródeł synchrotronowych).

Jeśli chodzi o strukturę pierwszorzędową kwasów nukleinowych popularną metodą jest sekwencjonowanie. Najstarszą techniką sekwencjonowania jest metoda Sangera, która używa mieszaniny deoksynukleotydów i dideoksynukleotydów.⁹⁹ Powstało wiele technik sekwencjonowania opartych o metodę Sangera, które korzystają z dideoksynukleotydów znakowanych fluorescencyjnie oraz angażujących elektroforezę kapilarną.^{100, 101} Sekwencjonowanie dostarcza głównie informacji o sekwencji kwasów nukleinowych, jednak nie mówi nic o modyfikacjach w obrębie nukleotydów. Ostatnio pojawiła się nowa metoda sekwencjonowania – Nanopore, która umożliwia analizę sekwencji RNA i DNA, a nawet wykrycie niektórych modyfikacji zasad poprzez porównanie z wzorcem.¹⁰² Problemem metod sekwencjonujących jest pojawienie się kilku tych samych zasad pod rząd. Dlatego szczególny problem stanowi tutaj sekwencjonowanie ogona poli(A). Liu i współpracownicy zaproponowali nową metodę sekwencjonowania ogona poli(A) zwaną PAIso-seq (*Poly(A) inclusive RNA isoform sequencing*), która wymaga użycia mniejszej ilości materiału w stosunku do technik wcześniej znanych (TAIL-seq, PAL-seq, FLAM-seq)¹⁰³⁻¹⁰⁷ oraz umożliwia identyfikację nukleotydów innych niż adozynowe w obrębie ogona poli(A). Metoda ta nie

umożliwia jednak charakterystyki modyfikowanych ogonów poli(A). Z pomocą przychodzi tutaj spektrometria mas szeroko opisana w następnym rozdziale niniejszej pracy. Metoda ta umożliwia dokładny pomiar masy, wyznaczenie sekwencji oraz identyfikację modyfikacji przy niewielkim zużyciu badanego materiału.

3.4.2. Metody badania oddziaływań nukleotydów i śledzenia procesów komórkowych z nimi związanych

W niniejszym rozdziale zostały wybrane głównie te metody, które służą do badania oddziaływań nukleotydów, ponieważ nukleotydy mają zdolność specyficznego wiązania się z białkami. Znając strukturę otrzymanych analogów nukleotydów kolejnym krokiem jest zbadanie ich właściwości pod względem powinowactwa do białek i zdolności inhibicji *in vitro*. Parametrami, z jakimi związane są te właściwości są: stała dysocjacji (K_d) opisująca równowagę pomiędzy kompleksem białko-ligand a wolnym ligandem i białkiem oraz parametr inhibicji (IC_{50}), czyli stężenie inhibitora, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej z udziałem substratu jest równa połowie szybkości maksymalnej. Badanie oddziaływań nukleotydów z białkami można przeprowadzić między innymi metodami fluorescencyjnymi np. metodą miareczkowania fluorescencyjnego, gdzie w wyniku związania ligandu zmieniają się właściwości fluorescencyjne tryptofanów w białku,¹⁰⁸ czy metodą termoforezy mikroskalowej, w której zmiany w strukturze biomolekuł powodują ich różne zachowanie pod wpływem przyłożonego gradientu temperatur.¹⁰⁹ Jedną z metod umożliwiającą badanie procesu inhibicji *in vivo* jest śledzenie produktów hydrolizy enzymatycznej za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej i badanie ich ewentualnego przyrostu w czasie. W przypadku mRNA, odporność na degradację bada się głównie z wykorzystaniem elektroforezy żelowej obserwując fragmenty różnej wielkości rozdzielane w polu elektrycznym ze względu na ładunek i kształt.⁵⁴

Kolejnym etapem charakterystyki cząsteczek jest obserwacja ich zachowania *in vivo* oraz śledzenie procesów komórkowych. W tym celu syntetyzuje się liczne analogi zawierające różne znaczniki np. fluorescencyjne. Po wyniknięciu takich nukleotydów do komórki możliwe jest śledzenie ich metabolizmu np. z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Bardzo użyteczne w tym kontekście jest wykorzystanie zjawiska FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Zachodzi ono, kiedy dwie cząsteczki (chromofory) różnią się widmami absorpcji i emisji promieniowania oraz znajdują się na odległości nie większej niż 10 nm. Jedna z cząsteczek, będąca w stanie wzbudzonym jest donorem – zdolna do oddania energii, a druga akceptorem – zdolna do zabsorbowania energii. Wzbudzając donor wiązką o długości fali odpowiadającej maksimum jego absorpcji, obserwuje się emisję fali o długości odpowiadającej maksimum emisji akceptora. Jeśli cząsteczki znajdują się na dużej odległości przekazanie energii nie zachodzi, co może oznaczać, że badane molekuly nie oddziałują lub badane procesy zachodzą w różnych obszarach komórki. Jeśli zjawisko FRET w obrębie danej cząsteczki zachodziło i przestało mieć miejsce może to oznaczać, że dana cząsteczka uległa hydrolizie.¹¹⁰

Jeśli chodzi o identyfikację metabolitów nukleotydów w ekstraktach komórkowych lub w komórkach jest to zagadnienie dość skomplikowane ze względu na wieloskładnikowość badanego środowiska. Jedną z metod jest znakowanie badanych cząsteczek radioaktywnym izotopem fosforu ³²P. Taverniti i współpracownicy wykorzystali tę metodę do badania

degradacji kapu w ekstraktach komórkowych.⁷² Jednakże metody radioaktywne wymagają syntezy związków znakowanych, co nierzadko jest procesem trudnym i długotrwałym.

Metodą czułą i selektywną, pozwalającą na identyfikację związków i ich wyznaczenie ilościowe nawet w skomplikowanych matrycach jest spektrometria mas (Rozdział 4). Specyficzna odmiana spektrometrii mas tzw. *Native mass spectrometry* umożliwia nawet badanie struktury i oddziaływań między cząsteczkami (Rozdział 4.2.3).

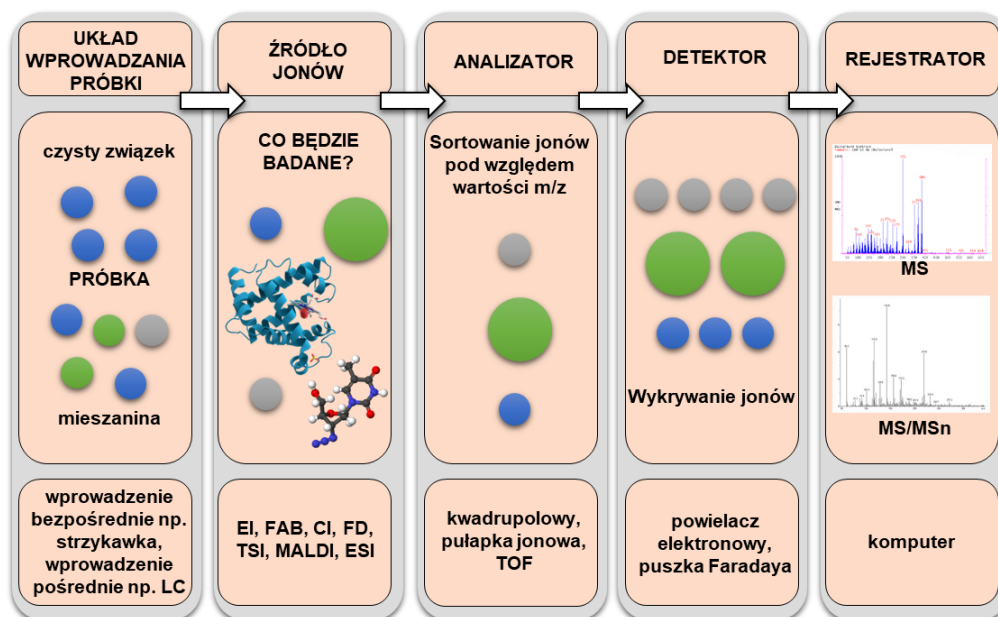
4. METODYKA BADAŃ

4.1. Podstawy fizyczne spektrometrii mas

Techniką wykorzystywaną w niniejszej pracy do badania nukleotydów i kwasów nukleinowych jest spektrometria mas. Metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością, rozdzielczością oraz szybkością. Takie właściwości pozwalają na stosowanie niewielkich ilości badanego materiału oraz uzyskanie informacji o badanym obiekcie w stosunkowo krótkim czasie. Dlatego też spektrometria mas jest szeroko stosowaną techniką analityczną. Spektrometria mas umożliwia wykonanie dokładnego pomiaru masy. Można ją stosować do badań szerokiej gamy związków, zarówno małych cząsteczek jak i dużych obiektów biologicznych takich jak białka czy kwasy nukleinowe. Technika ta dostarcza informacji zarówno jakościowych jak i ilościowych na temat badanej próbki. Podstawą metody spektrometrii mas jest wymuszona jonizacja związku, analiza masy powstałych jonów oraz ich detekcja.

4.1.1. Etapy analizy próbki za pomocą spektrometrii mas

Typowy spektrometr mas zawiera pięć kluczowych elementów umożliwiających jonizację próbki, analizę powstałych jonów i detekcję otrzymanych cząsteczek. Ogólny schemat analizy za pomocą spektrometrii mas jest przedstawiony na [Rysunku 15](#).



Rysunek 15. Etapy analizy próbki za pomocą spektrometrii mas: wprowadzenie próbki, jonizacja, analiza zależności stosunku masy do ładunku, detekcja jonu, rejestracja widma.

Wprowadzenie próbki do spektrometru może odbywać się na kilka sposobów. Najprostszą metodą jest bezpośrednie wprowadzenie próbki za pomocą pompy strzykawkowej lub płytki (jonizacja MALDI). Takie podejście nie nadaje się jednak do analizy bardziej skomplikowanych mieszanin. W tym przypadku najpowszechniejszą metodą jest połączenie spektrometru z chromatografią cieczową, która umożliwia rozdział mieszaniny na poszczególne składniki. Coraz bardziej powszechne jest łączenie spektrometrii mas z innymi technikami np. elektroforezą,¹¹¹ czy analizą ruchliwości jonów (*ion mobility mass spectrometry*).¹¹²

W spektrometrii mas wykorzystywane są różne metody jonizacji. W przypadku badania nukleotydów, kwasów nukleinowych i białek najpopularniejszą metodą jest elektrosprej, gdyż powoduje minimalną fragmentację analitów w źródle jonów. Następnie powstałe jony są przyspieszane w polu elektromagnetycznym i analizowane pod względem ich stosunku masy do ładunku. Dostępnych jest kilka rodzajów analizatorów np. potrójny kwadrupol, analizator czasu przelotu (TOF), pułapka jonowa. Wyselekcjonowane jony trafiają do detektora, którym najczęściej jest powielacz elektronowy. Ostatnim etapem jest rejestracja i analiza wyników przez specjalnie dedykowane oprogramowanie.

4.1.2. Przegląd metod jonizacji

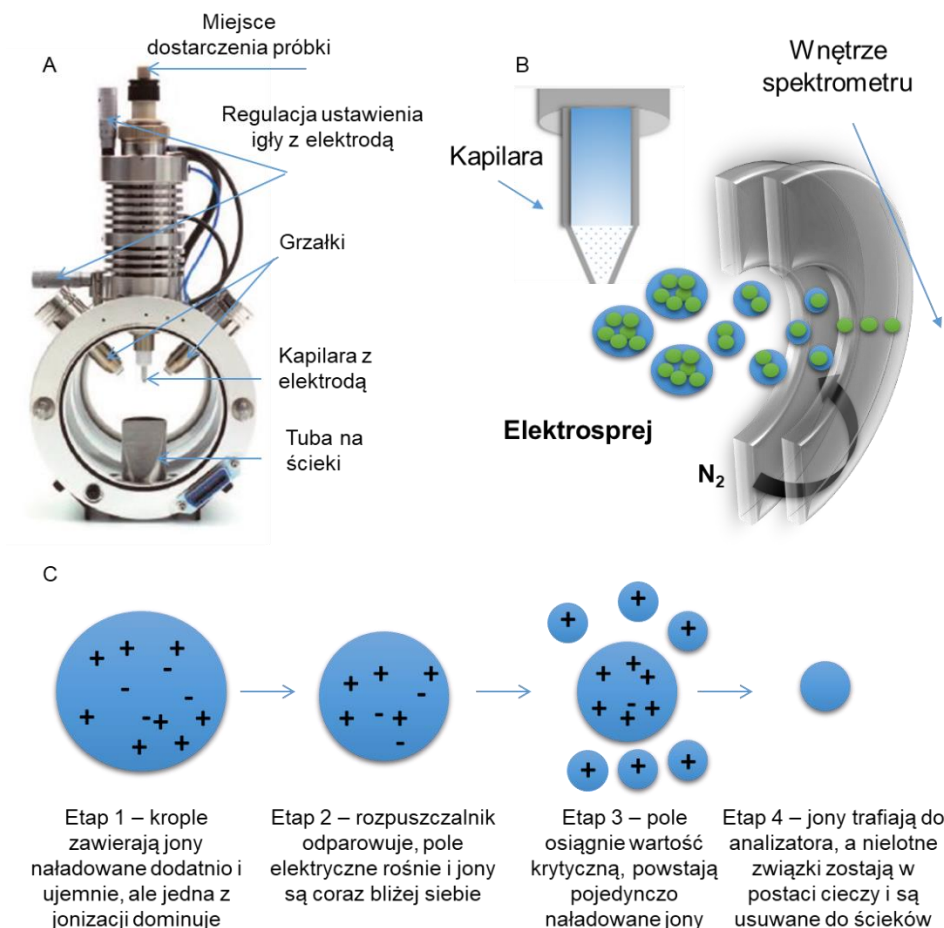
Metoda jonizacji odnosi się do mechanizmu jonizacji, podczas gdy źródło jonów jest narzędziem umożliwiającym zachodzenie procesu jonizacji. Jonizacja może odbywać się przez protonowanie (jonizacja w trybie jonów dodatnich), kationizację (jonizacja w trybie jonów dodatnich), deprotonowanie (jonizacja w trybie jonów ujemnych), transfer molekuly obdarzonej ładunkiem z fazy skondensowanej do fazy gazowej (jonizacja w trybie jonów dodatnich lub ujemnych), wybite elektronu (jonizacja w trybie jonów dodatnich), wychwyt elektronu (jonizacja w trybie jonów ujemnych). Powstały różne źródła jonów umożliwiające zachodzenie powyższych procesów. Najstarsze z nich, źródło z jonizacją elektronami lub jonizacją chemiczną, umożliwiały jonizację przez transfer elektronów czy protonów. Jednakże źródła te powodują znaczną fragmentację badanych obiektów, co wiąże się z problemami w interpretacji wyników. Nie zawsze jest jasne, czy najbardziej intensywny, obserwowany na widmie jon nie jest jonom fragmentacyjnym cząsteczki o większej masie. Innym źródłem jonów jest jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), która wykorzystuje wyładowania koronowe i transfer protonu. Jest to metoda, którą można zastosować do jonizacji w szczególności niepolarnych cząsteczek. Mniej destrukcyjną techniką jonizacji, którą można użyć do badania biomolekuł jest bombardowanie szybkimi atomami (*Fast Atom/Ion Bombardment*, FAB). Wykorzystuje ona mechanizm desorpcji jonów i transfer protonów. Źródło FAB używa matrycy i wiązki atomów do produkowania jonów z próbki. Zamiast wiązki atomów podczas jonizacji mogą być użyte lasery. Jonizatorami wykorzystującymi lasery podczas jonizacji są *Desorption/Ionization On Silicon* (DIOS) oraz *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI). Obie techniki wykorzystują absorpcję fotonu i transfer elektronu z tą różnicą, że DIOS jest niezależne od matrycy. DIOS nadaje się do analizy małych molekuł, więc można w ten sposób przyspieszyć i uprościć wysokoprzepustową analizę niskocząsteczkową. Do analizy większych cząsteczek

takich jak kwasy nukleinowe czy białka najpopularniejsze są źródła MALDI i elektrosprej (*Electrospray*, ESI). Skonstruowanie źródła MALDI zrewolucjonizowało analizę peptydów i białek, o czym może świadczyć fakt, że Tanaka otrzymał za ten wynalazek Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 2002 roku.¹¹³ Ukierunkowany transfer energii podczas procesu jonizacji laserem wspomaganego matrycą powoduje generowanie jonów z wysoką wydajnością, co znacznie zwiększa czułość i umożliwia badanie pikomolowych ilości związków. Co więcej, MALDI umożliwia jonizację bardzo dużych cząsteczek - 300 000 Da, a w specyficznych przypadkach nawet większych. Wadą tego źródła jonów jest to, że w przypadku mniejszych cząsteczek (poniżej 700 Da) może pojawić się tło pochodzące od matrycy. Co więcej próbka może degradować na skutek fotouszkodzeń spowodowanych laserem. Ponadto źródło to nie jest kompatybilne z innymi technikami takimi jak chromatografia cieczowa. Ograniczenia wynikające z użycia MALDI bardzo dobrze wypełnia źródło ESI opisane dokładniej w kolejnym rozdziale.¹¹⁴⁻¹¹⁷

4.1.3. Metoda jonizacji Elektrosprej (ESI)

Idea elektrospreju nie jest nowa, ale do powszechnego użytku weszła dopiero dzięki zastosowaniu jej do analizy biocząsteczek. Zjawisko było znane pod koniec lat 30 XX wieku i stopniowo rozwijane. Ostatecznie prace Fenn'a¹¹⁸ doprowadziły do zastosowania elektrospreju w metodzie spektrometrii mas i analizie makrocząsteczek biologicznych takich jak peptydy, białka, oligonukleotydy, syntetyczne polimery, lipidy i inne. Bardzo dobrze nadaje się również do analizy związków o mniejszych masach. Działa poprzez rozpylanie kropeł pod ciśnieniem atmosferycznym ([Rysunek 16](#)). Roztwór przechodzi przez kapilarę, do której jest przyłożone wysokie napięcie rzędu 700 do 5000 V. Z kapilary jest on rozpylany w postaci naładowanych kropeł. Krople rozpuszczalnika są odparowywane pod wpływem działania gazu obojętnego i wysokiej temperatury. W trakcie procesu odparowywania krople kurczą się, co powoduje wzrost gęstości ładunku na powierzchni kropli. W wyniku działania siły kulombowskiego odpychania pojedyncze jony zostają uwolnione z kropli. Powstałe jony w wyniku działania pola elektrycznego kierowane są do analizatora. Źródło ESI umożliwia wprowadzanie jonów do analizatora w sposób ciągły, dlatego jest kompatybilne z innymi technikami takimi jak chromatografia cieczowa czy elektroforeza kapilarna.

ESI generuje jony pojedynczo naładowane dla małych cząsteczek i wielokrotnie naładowane w przypadku większych. Można to uznać za zaletę, ponieważ ze względu na pomiar m/z , stwarza to możliwość obserwacji większych obiektów przy mniejszych zakresach pomiarowych analizatora. Jednakże może to być również wadą, ponieważ obecność kilku jonów o różnym ładunku zmniejsza czułość. Jonizacja białek i peptydów odbywa się głównie w wyniku porotonowania, co należy uwzględnić przy obliczaniu masy (M). Na widmie obserwuje się jony pseudomolekularne naładowane dodatnio typu: $[M+H]^+$, $[M+nH]^{n+}$. Należy mieć na uwadze, że możliwa jest obserwacja adduktów kationowych, np. sodowych ($[M + Na]^+$). Dla oligonukleotydów preferowana jonizacją jest jonizacja ujemna. Jest ona łatwiejsza do osiągnięcia, ze względu na występowanie reszt fosforanowych ($[M-nH]^{n-}$).



Rysunek 16. Schemat jonizacji elektrosprej. (A) Źródło jonów spektrometru firmy Sciex, (B) schemat metody elektrosprej, (C) etapy powstawania jonów.

Podsumowując, ESI posiada wiele zalet takich jak możliwość analizy masy małych i dużych cząsteczek (do 70 000 Da), pikomolowa czułość, łagodne warunki jonizacji, kompatybilność z innymi technikami i z tandemową spektrometrią mas. Wadą tej jonizacji jest zmniejszenie czułości, jeśli w próbce występuje duże stężenie soli lub w przypadku skomplikowanych mieszanin. Ponadto występowanie jonów wielokrotnie naładowanych może być mylące szczególnie podczas analizy mieszanin.¹¹⁹⁻¹²²

4.1.4. Przegląd analizatorów

Jony powstałe w źródle jonów kierowane są dalej do analizatora, który sortuje je pod względem stosunku masy do ładunku. Najpopularniejsze analizatory to kwadrupol, analizator czasu przelotu (*time-of-flight*, TOF), cyklotron jonowy (*ion cyclotron*, ICR), Orbitrap oraz kombinacje połączeń tych analizatorów. Nie istnieje uniwersalny analizator masy. Wybór analizatora zależy od wielu czynników między innymi: zakresu analizowanej masy, rozdzielczości, kompatybilności ze źródłem jonów, czułości. Wszystko to jest związane z tym jakie obiekty będą badane i jakie informacje chcemy uzyskać.

Analizator TOF umożliwia najszerzy zakres pomiaru masy od kilku Da do ponad 100 kDa. Co więcej, analizator ten charakteryzuje się wysoką rozdzielczością i umożliwia dokładny pomiar masy. Właściwością jonów, jaką rejestruje TOF jest czas, w którym przelatują one przez

komorę analizatora. Na końcu komory znajduje się detektor mierzący czas między impulsem elektrycznym, a momentem, kiedy jony dotrą do detektora. Czas przelotu określany jest wzorem

$$t = k \sqrt{\frac{m}{z}},$$

gdzie m to masa jonu, z ładunek jonu, k to parametr związany z urządzeniem i wyrażony wzorem $\frac{d}{\sqrt{2U}}$, gdzie d to długość analizatora, U to napięcie przyspieszające jony. Jak widać ze wzorów czas przelotu może być przeliczony na stosunek masy do ładunku jonu.

W analizatorach ICR pomiar masy odbywa się przez pomiar częstości rezonansowej w polu magnetycznym. Tor ruchu dostających się w pole magnetyczne jonów ulega zakrzywieniu w wyniku działania siły Lorentza. Częstość kołowa opisana jest wzorem

$$\omega = \frac{qB}{m},$$

gdzie B to wartość pola magnetycznego, q – ładunek, a m – masa cząsteczki. Jedną z głównych zalet tego analizatora jest zdolność do pomiaru masy z dużą rozdzielczością i dokładnością. Jednakże wytworzenie silnego pola magnetycznego wymaga stosowania dużych magnesów, które wymagają ciekłego helu do ich chłodzenia. Te aspekty czynią tę metodę bardzo kosztowną.

Kolejnym analizatorem umożliwiającym pomiar masy z wysoką rozdzielczością jest Orbitrap. W odróżnieniu do ICR, w Orbitrap oscylacje jonów wywołane są polem elektrycznym. Co więcej zdolność rozdzielcza Orbitrap jest nawet większa, dlatego można go zastosować do analizy większych molekuł i szeroko stosowany jest w proteomice.

Analizatory takie jak kwadrupol, zdolne do pomiaru masy w mniejszym zakresie m/z , mają inne zalety, które są opisane w kolejnych rozdziałach.¹²³

4.1.5. Analizator potrójny kwadrupol

Analizatory kwadrupolowe są często stosowanymi analizatorami w spektrometrii mas ze względu na ich stosunkowo niski koszt, zwartą konstrukcję, trwałość i niezawodność. Analizator kwadrupolowy jest nazywany filtratorem masy ze względu na to, że ma on zdolność przepuszczania jonów o określonym stosunku m/z . Kwadrupole składają się z czterech prętów ułożonych względem siebie w sposób pokazany na [Rysunku 17](#).

Jeżeli w wyniku jonizacji dodatniej do kwadrupola dostanie się jon o ładunku dodatnim będzie on przyciągany do pręta naładowanego ujemnie. Jeżeli potencjał pręta zmieni znak zanim jon ulegnie rozładowaniu to zmieni to trajektorię ruchu jonu. Odpowiednie ustawienia parametrów kwadrupola spowodują, że określone jony będą miały stabilną trajektorię aż do momentu dostania się do detektora.

Jony trafiające do kwadrupola podlegają działaniu pola elektrycznego składającego się z pola zmiennego nałożonego na pole stałe. Wynika to z przyłożenia do prętów odpowiednich potencjałów, które można zapisać równaniami:

$$\varphi_o = +(U - V \cos \omega t) \quad (1)$$

$$\varphi_o = -(U - V \cos \omega t) \quad (2)$$

gdzie: φ_o to napięcie przyłożone do prętów, U to napięcie stałe, V to amplituda napięcie o częstotliwości radiowej, ω to prędkość kątowna, która wyraża się wzorem $\omega=2\pi f$, gdzie f to

częstość pola. Jony są przyspieszane wzdłuż osi kwadrupola (z). W kierunku osi x i y działają siły powodujące przyspieszenie jonów, które można opisać równaniami:

$$F_x = ma_x = m \frac{d^2x}{dt^2} = -ze \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad (3)$$

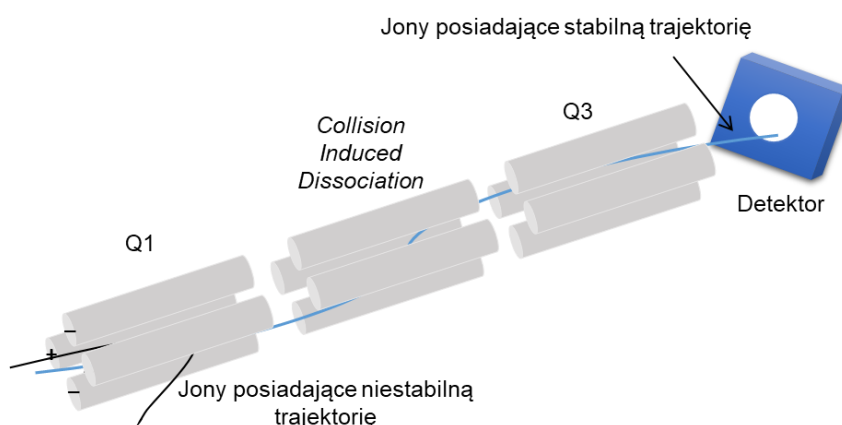
$$F_y = ma_y = m \frac{d^2y}{dt^2} = -ze \frac{\partial \phi}{\partial y} \quad (4)$$

gdzie: $ze=q$, czyli ładunek jonu, m to masa jonu. Te równania można przekształcić w inną postać (5 i 6), gdzie pojawią się parametry stabilności jonów takie jak a_u i q_u .

$$\frac{d^2x}{d\eta^2} + a_u - 2q_u \cos(2\eta) x = 0 \quad (5)$$

$$\frac{d^2y}{d\eta^2} + a_u - 2q_u \cos(2\eta) y = 0 \quad (6)$$

gdzie: $\eta = \frac{\omega t}{2}$, $a_u = \frac{8zeU}{mr_o^2\omega^2}$, $q_u = \frac{4zeV}{mr_o^2\omega^2}$. Wielkości charakterystyczne dla danego analizatora to r_o (promień wewnętrzny) i ω , natomiast U i V to wartości zmienne. Dla jonów o konkretnej masie można określić zmiany x i y w funkcji U i V tak, żeby nie przekraczały one wartości r_o . Te jony będą miały wówczas stabilną trajektorię.¹²⁴



Rysunek 17. Schemat budowy analizatora potrójnego kwadrupola.

Wadą analizatora kwadrupolowego jest zdolność pomiaru masy maksymalnie do 4000 Da. Co więcej, są to analizatory o niskiej rozdzielczości. Nie mniej jednak ogromną zaletą tego urządzenia jest wysoka kompatybilność z chromatografią cieczową i możliwość użycia kwadrupoli w konfiguracji tandemowej nie tylko z innym kwadrupolem, ale również z analizatorem TOF.

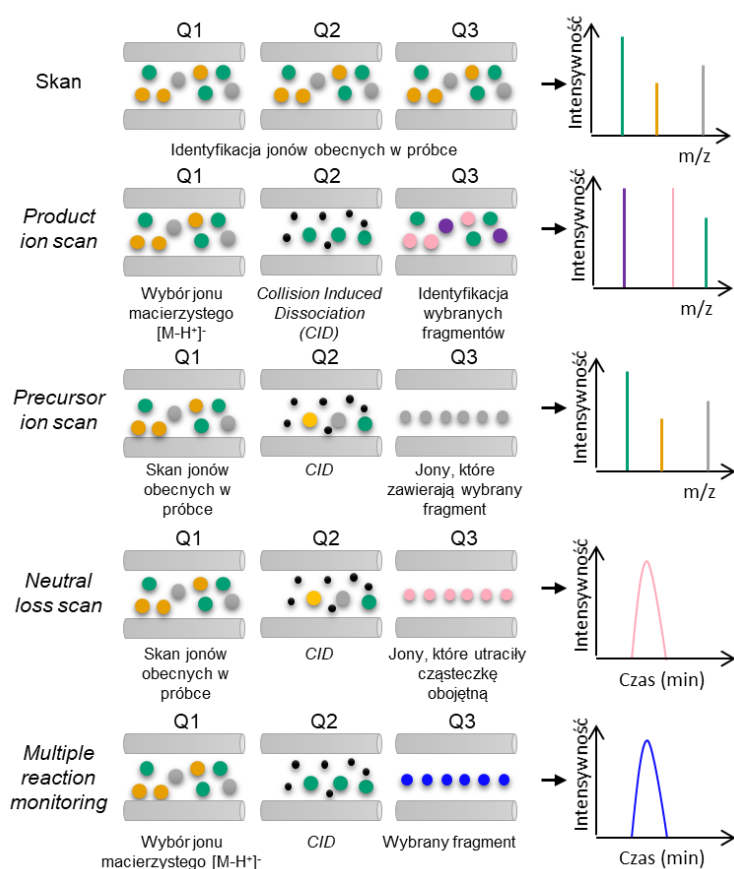
4.1.6. Tandemowa spektrometria mas

Szeregowe połączenie trzech analizatorów daje możliwość wykonania szeregu eksperymentów, które pozwolą nie tylko na analizę masy, ale także na ustalenie struktury badanych cząsteczek oraz pozwolą na zwiększenie czułości pomiaru w przypadku skomplikowanych próbek.

Ogólna zasada tandemowej spektrometrii mas polega na tym, że pierwszy analizator, służy do wyboru jonów, w drugim analizatorze odbywa się fragmentacja jonów, a powstałe produkty analizowane są w trzecim analizatorze. W tandemowej spektrometrii mas drugi analizator pełni funkcje komory zderzeń. Zachodzi tam zjawisko dysocjacji indukowanej kolizyjnie (*collision induced dissociation*, CID). Zjawisko to polega na tym, że jony są fragmentowane przez zderzenia z gazem obojętnym, którym najczęściej jest azot lub argon. Fragmentacja zachodzi z powodu kolizji z gazem obojętnym i konwersji części energii kinetycznej na energię wewnętrzną jonów powodując w ten sposób zerwanie wiązań wewnątrz analitu. Zjawisko to może być wykorzystane w różnym kontekście z czego wynika, że istnieje kilka typów eksperymentów możliwych do wykonania z udziałem tandemowej spektrometrii mas ([Rysunek 18](#)).

Najprostszy eksperyment to eksperyment *skan*, który umożliwia pomiar masy w szerokim zakresie. Jony przelatają przez kwadrupole nie ulegając fragmentacji, a jako wynik eksperymentu otrzymuje się widmo mas jonów obecnych w próbce. Eksperyment ten ma stosunkowo niewielką czułość, ponieważ spektrometr musi skanować kilkaset jonów w jednostce czasu.

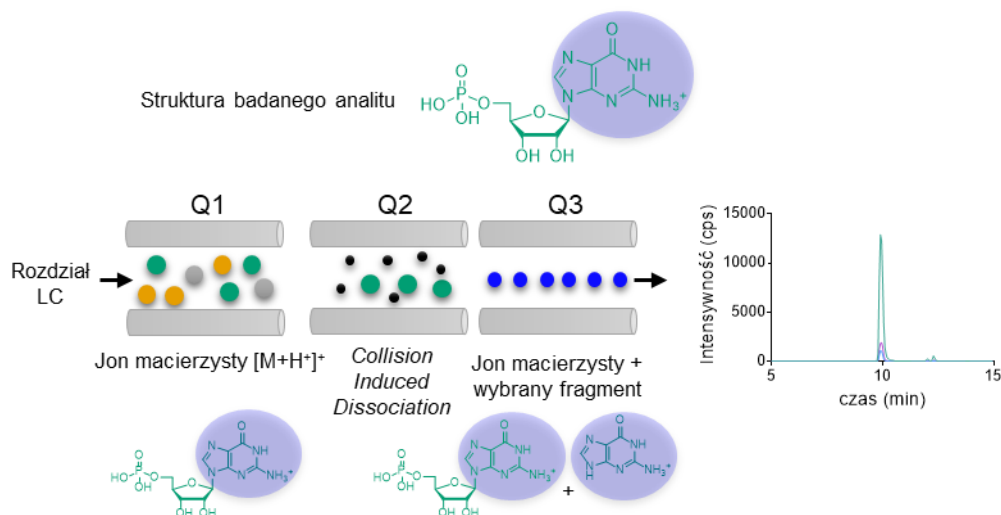
Product ions scan polega na tym, że w pierwszym kwadrupolu jest wybierany jon macierzysty o konkretnym stosunku m/z . Następnie jon ten poddawany jest fragmentacji i w trzecim kwadrupolu analizowane są powstałe fragmenty. Ścieżka fragmentacji jest charakterystyczna dla danego związku, a jego widmo fragmentacyjne często jest nazywane „odciskiem palca” i stanowi cenną informację strukturalną.



Rysunek 18. Typy eksperymentów, które są możliwe do przeprowadzenia za pomocą tandemowej spektrometrii mas.

W eksperymencie *Precursor ion scan* w pierwszym kwadrupolu są skanowane wszystkie jony, w drugim zachodzi fragmentacja, a w trzecim rejestrowane są tylko te jony, które podczas fragmentacji utraciły konkretny fragment. Ten eksperyment jest przydatny np. w badaniach proteomicznych, gdzie identyfikuje się, które białka zawierają taką samą modyfikację. Może to wiązać się z pełnieniem przez nie podobnej funkcji.

Neutral loss scan jest podobnym eksperymentem do skanowania jonów prekursorowych z tą różnicą, że w trzecim kwadrupolu rejestrowane są wszystkie jony, które utraciły wybraną cząsteczkę obojętną np. cząsteczkę wody. Monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) jest to tryb pracy spektrometru, który umożliwia wykonywanie badań ilościowych. Najczęściej tą metodę stosuje się w połączeniu z LC. Polega to na tym, że w pierwszym kwadrupolu jest wybierany jon macierzysty, który ulega fragmentacji w drugim kwadrupolu. W trzecim kwadrupolu szukany jest określony charakterystyczny jon fragmentacyjny. W celu lepszego zrozumienia tego eksperymentu możemy posłużyć się przykładem 5'-fosforanu guanozyny (GMP) ([Rysunek 19](#)).



Rysunek 19. Schemat metody monitorowania wybranych reakcji fragmentacji - Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Związek ten był oznaczany przez Lorenzetti i współpracowników¹²⁵ jako jeden z produktów działania fosfodiesteraz w celu weryfikacji ich aktywności po dodaniu inhibitorów. Eksperyment MRM wykonany był w trybie jonów dodatnich. W pierwszym kwadrupolu wybierany jest jon macierzysty odpowiadający m/z niepofragmentowanego analitu, który w przypadku GMP, w trybie jonizacji dodatniej wynosi 364. W drugim kwadrupolu następuje fragmentacja, a w trzecim skanowanie wybranego fragmentu. W przypadku tego związku jednym z jonów charakterystycznych może być m/z = 152, który odpowiada zasadzie azotowej. Wynikiem eksperymentu jest chromatogram, na którym pojawia się sygnał tylko wtedy, gdy detektor rejestruje wybrany jon macierzysty i fragmentacyjny. W przypadku GMP parę 364 i 152. W eksperymencie dla konkretnego analitu można wybrać kilka par MRM, co znacznie zwiększa selektywność, przy nieznacznym spadku czułości. Istnieje prawdopodobieństwo, że różne związki będą miały tą samą parę MRM, ale prawdopodobieństwo, że pojawią się dwie lub trzy takie same pary jest już znikome.

Eksperyment MRM zwiększa czułość i selektywność badania. Co więcej, w połączeniu z chromatografią ciekłą ten tryb pracy spektrometru umożliwia badanie skomplikowanych

mieszanin i selektywne śledzenie wybranych analitów. Jednak, żeby zaprojektować ten eksperyment konieczne jest posiadanie wiedzy jakie jony fragmentacyjne tworzą się z analitów, które nas interesują lub jakie są ich ogólne ścieżki fragmentacji. Opracowanie tego typu eksperymentów było jednym z wątków niniejszej pracy doktorskiej (Rozdział 5.3).¹²⁴

4.2. Połączenie spektrometrii mas z innymi technikami

Mimo, że już sama technika spektrometrii mas dostarcza wielu cennych informacji na temat badanych obiektów to dodatkową jej zaletą jest kompatybilność z innymi technikami takimi jak chromatografia cieczowa czy elektroforeza. Wstępny rozdział biomolekuł można również osiągnąć przez zastosowanie spektrometrii mobilności jonów. Połączenie spektrometrii mas z innymi technikami analitycznymi pozwala na charakterystykę badanych obiektów nie tylko wykorzystując ich właściwość fizyczną, jaką jest masa, ale również powinowactwo do złożeń, wielkość, kształt oraz ładunek.

4.2.1. Chromatografia cieczowa

Istotą każdej chromatografii jest rozdział analizowanej mieszaniny na składniki. Początki tej techniki sięgają końca XIX wieku. Podczas tak długiego okresu powstało wiele odmian tej metody. Dwie główne grupy to chromatografia gazowa i cieczowa. Obecnie w chemii analitycznej króluje wysokosprawna chromatografia cieczowa (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), której najważniejsze aspekty zostaną przedstawione w kolejnych podrozdziałach.

4.2.1.1. Kluczowe elementy chromatografu i parametry chromatogramu

Chromatografia cieczowa służy przede wszystkim do rozdzielania mieszaniny na składniki. Chromatograf cieczowy składa się zwykle z następujących elementów:

- zbiorników na fazę ruchomą: bufory, rozpuszczalniki;
- automatycznego odgazowywacza, który usuwa gazy z eluentów. Mimo odgazowywania rozpuszczalników przed analizą w trakcie ich mieszania i tworzenia gradientów, może dojść do wydzielania się gazów. Degazery usuwają gazy, gdyż ich obecność podczas analizy mogłaby znacznie zakłócić rozdział chromatograficzny;
- pomp z mieszalnikami, które zapewniają odpowiednie parametry przepływu i wartości gradientów;
- podajnika próbek: np. autosamplera;
- fazy stacjonarnej: przedkolumny (jeśli to konieczne, w zależności od składu próbki, umożliwia usuwanie części zanieczyszczeń, chroni kolumnę) i kolumny (więcej w następnym rozdziale).
- termostatu, który utrzymuje stałą temperaturę podczas analizy;
- detektora, którego zadaniem jest detekcja analitów, które napływają wraz ze strumieniem fazy ruchomej. Stosuje się różne rodzaje detektorów takie jak: spektrofotometri UV-VIS,

spektrofotometry fluorescencyjne, spektrometry mas, detektory laserowego światła rozproszonego, detektory refraktometryczne lub elektrochemiczne;

- zbiornika na zużyty eluent lub kolektora frakcji, który umożliwia odzyskiwanie analitów;
- komputera, który rejestruje chromatogram (graficzny zapis wyniku prowadzonego rozdzielania) i analizuje dane.^{126, 127}

Istnieje kilka kluczowych parametrów związanych z chromatografią, które są obszernie opisane w licznych źródłach¹²⁶⁻¹³⁰. Zostaną tutaj przytoczone tylko niektóre z nich, które są kluczowe z perspektywy zrozumienia chromatografii i niniejszej pracy.

Wielkością charakteryzującą oddziaływanie między analitem a fazą stacjonarną i ruchomą jest współczynnik podziału K . Proces rozdzielania składników podczas chromatografii następuje w skutek różnic w ich współczynnikach podziału. Współczynnik podziału jest definiowany jako stosunek stężeń składnika w fazie stacjonarnej C_s do stężenia składnika w fazie ruchomej C_m :

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (7)$$

Między analitami obecnymi w fazie ruchomej i stacjonarnej, ustala się równowaga dynamiczna. Przeszczepianie się substancji rozdzielanych w kolumnie następuje tylko w fazie ruchomej z udziałem eluentu. Wynika z tego, że większe wartości K oznaczają dłuższy czas przebywania w fazie stacjonarnej, późniejsze opuszczenie kolumny, przez co większą wartość czasu retencji.

Czas retencji t_r to czas odpowiadający czasowi elucji w maksimum piku. Jest to czas przebywania substancji chromatografowanej w kolumnie. Czas elucji jest funkcją prędkości przepływu fazy ruchomej F i objętości eluentu potrzebnego do wymycia analitu z kolumny, czyli objętości retencji V_r :

$$V_r = F * t \quad (8)$$

Substancja, która w ogóle nie oddziałuje z fazą stacjonarną (jej współczynnik podziału wynosi 0) przechodzi przez cały układ chromatograficzny i dociera do detektora w czasie t_0 lub t_m . Ten czas, nazywany jest zerowym czasem retencji lub czasem martwym. Czas martwy, czyli czas przebywania składnika w fazie ruchomej, nie jest cechą charakterystyczną analitu, jest nią natomiast czas oddziaływania substancji z fazą stacjonarną, który nazywany jest zredukowanym czasem retencji t'_r . Jest to różnica między całkowitym czasem retencji i czasem martwym.

Dobór warunków rozdzielania mieszanin związków na poszczególne składniki jest zwykle procesem nietrywialnym i pracochłonnym. Często nie jest możliwe rozdzielanie analitów, z zastosowaniem stałego składu fazy ruchomej, czyli w układzie izokratycznym. Wówczas należy stosować gradient (zmiana skokowa bądź ciągła składu fazy ruchomej). Kluczowym etapem jest jednak dobór odpowiedniej fazy stacjonarnej.^{126, 127, 130}

4.2.1.2. Rozdział analitów – typy chromatografii i fazy stacjonarnej

Wybierając odpowiednie warunki rozdziału analitów należy zwrócić szczególną uwagę na następujące czynniki: zmianę składu fazy ruchomej (zmiana ilościowego udziału

rozpuszczalników), zmianę pH fazy ruchomej, wybór odpowiedniego przeciwjonu (chromatografia par jonowych), zmianę typu fazy stacjonarnej.

Ze względu na różny mechanizm oddziaływań rozdzielanych substancji z fazą ruchomą i stacjonarną, układy chromatograficzne dzielimy na:

- jonowymienne układy chromatograficzne, gdzie rozdzielanie jest oparte na odwracalnej wymianie jonów z fazą stacjonarną,
- chromatografię powinowactwa, gdzie wykorzystuje się wysoce specyficzne oddziaływania (np. oddziaływanie enzym – substrat), albo inne oddziaływania np. tzw. chromatografia „metalopowinowactwa” (oddziaływania nikiel-siarka),
- filtrację żelową, którą stosuje się do rozdzielania substancji różniących się wielkością i kształtem, a niekiedy masą molową. Dlatego jest wykorzystywana do odsalania próbek białek oraz usuwania z nich związków niskocząsteczkowych,
- chromatografię adsorpcyjną w normalnym układzie faz. Na powierzchni fazy stacjonarnej znajdują się polarne centra, które oddziałują z grupami polarnymi badanych analitów. W układzie faz normalnych siła elucji rośnie jeśli polarność eluentu się zwiększa. Przykładem takiej fazy stacjonarnej mogą być żele krzemionkowe wraz z modyfikacjami np. grupy OH w postaci alkilodiolu. Typowe eluenty stosowane w chromatografii normalnych faz to rozpuszczalniki organiczne, najczęściej niemieszające się z wodą. Można też stosować fazy ruchome zawierające znaczne zawartości wody, z dodatkiem innych rozpuszczalników np. acetonitrylu, metanolu, kwasu octowego itp. polarnych i rozpuszczalnych w wodzie składników. Tego typu układy chromatograficzne noszą nazwę układów oddziaływań hydrofilowo – lipofilowych i są to warunki chromatografii adsorpcyjno – podziałowej (HILC).
- chromatografię w odwróconej fazie. W tym przypadku faza stacjonarna jest niepolarna a faza ruchoma polarna. Retencja i rozdzielanie substancji w warunkach układu faz odwróconych są zależne od różnic w hydrofobowości molekuł. Typowe fazy stacjonarne stanowią żele krzemionkowe modyfikowane grupami o niskiej polarności np. grupami C18 (n-oktadecylowa), C8 (n-oktylowa), fenyłowa (Ph). Fazę ruchomą stanowi mieszanina wody lub buforu z dodatkiem rozpuszczalnika organicznego rozpuszczalnego w wodzie np. metanolu lub acetonitrylu. Eluent charakteryzuje się wyższą siłą elucji im niższa jest w nim zawartość wody. Wzrost zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej skraca czas retencji. Substancje wymywane są w kolejności od najbardziej polarnych (najbardziej hydrofilowych, najsłabiej oddziałujących z fazą stacjonarną) do najbardziej lipofilowych (najmniej hydrofilowych). Do tej kategorii zalicza się również chromatografię oddziaływań hydrofobowych (HIC), gdy do rozdzielania wykorzystuje się hydrofobowe oddziaływania makromolekuł z hydrofobową powierzchnią fazy stacjonarnej.^{127, 129}

4.2.1.3. Chromatografia par jonowych i jej zastosowanie do analizy nukleotydów i oligonukleotydów

Obecność grup fosforanowych w strukturze nukleotydów sprawia, że związki te są bardzo polarne. W związku z tym, standardowe warunki chromatografii faz odwróconych nie

zawsze dają satysfakcjonujące rezultaty dla tych związków. Do analizy nukleotydów stosowane są chromatografia jonowymienna,¹³¹ filtracja żelowa,¹³² kolumny monolityczne,^{133, 134} kolumny z *porous graphitic carbon*,¹³⁵ fazy stacjonarne zawierające grupy cyjanowe, fenyłowe, fluorofenyłowe,¹³⁶ oraz różne kombinacje tych rodzajów chromatografii. Niestety, nie wszystkie z nich są kompatybilne z MS np. chromatografia jonowymienna (ze względu na obecność dużego stężenia soli). Skuteczną metodą analizy nukleotydów i kwasów nukleinowych, która została opracowana kilkanaście lat temu i przez wiele lat stosowana i rozwijana, jest chromatografia par jonowych.^{137, 138} Chromatografia par jonowych jest zaliczana do chromatografii faz odwróconych, w której niezbędne jest zastosowanie dodatku odpowiedniego reagenta. Reagent ten pełni funkcję „przeciwnonu”, który poprzez tworzenie par jonowych z analitem „maskuje” silnie polarne grupy w jego strukturze. Analit zmienia wówczas swoje właściwości chromatograficzne i obserwuje się wydłużenie jego czasu retencji. Gong i współpracownicy¹³⁹ porównali sześć odczynników do chromatografii par jonowych w celu określenia ich skuteczności jako modyfikatorów fazy ruchomej LC w analizie oligonukleotydów różnej długości. Testowano trietyloaminę, tripropyloaminę, heksyloaminę, N,N-dimetylobutyloaminę, dibutyloaminę i N,N-diisopropylloetyloaminę. Zwrócono uwagę na tworzenie się adduktów, rozdział chromatograficzny oraz intensywność sygnału MS. Pokazano, że w zależności od długości oligonukleotydu najlepszymi reagentami są tripropyloamina, N,N-dimetylobutyloamina i dibutyloamina. Procedury literaturowe zalecają również stosowanie dimetyloheksyloaminy z uwagi na możliwość użycia jej w stosunkowo małym stężeniu i osiągnięcia właściwego kształtu piku i rozdziału analitów.³⁵

Alternatywą dla chromatografii par jonowych w przypadku rozdziału nukleotydów wydaje się być chromatografia HILIC - *hydrophilic interaction liquid chromatography*. W przeciwieństwie do hydrofobowej fazy stacjonarnej stosowanej w chromatografii par jonowych w odwróconej fazie, w HILIC stosuje się hydrofilowe fazy stacjonarne. Anality są wymywane zgodnie ze wzrastającą polarnością. Zasada działania chromatografii HILIC jest obszernie badana. Jedną z hipotez zakłada, że retencja zachodzi przede wszystkim z powodu podziału analitu między fazę ruchomą bogatą w składniki organiczne i warstwę wodną na powierzchni fazy stacjonarnej. Możliwe jest również występowanie także oddziaływań elektrostatycznych i wiązań wodorowych.¹⁴⁰ Chociaż metoda ta ma duży potencjał, to wciąż jeszcze nie zapewnia tak dobrej rozdzielczości jak chromatografia par jonowych.¹⁴¹

4.2.2. Elektroforeza kapilarna

Chociaż chromatografia cieczowa jest najpowszechniejszą i najbardziej uniwersalną techniką rozdziału mieszanin kompatybilną ze spektrometrią mas, to w niektórych przypadkach możliwe jest również zastosowanie elektroforezy kapilarnej.

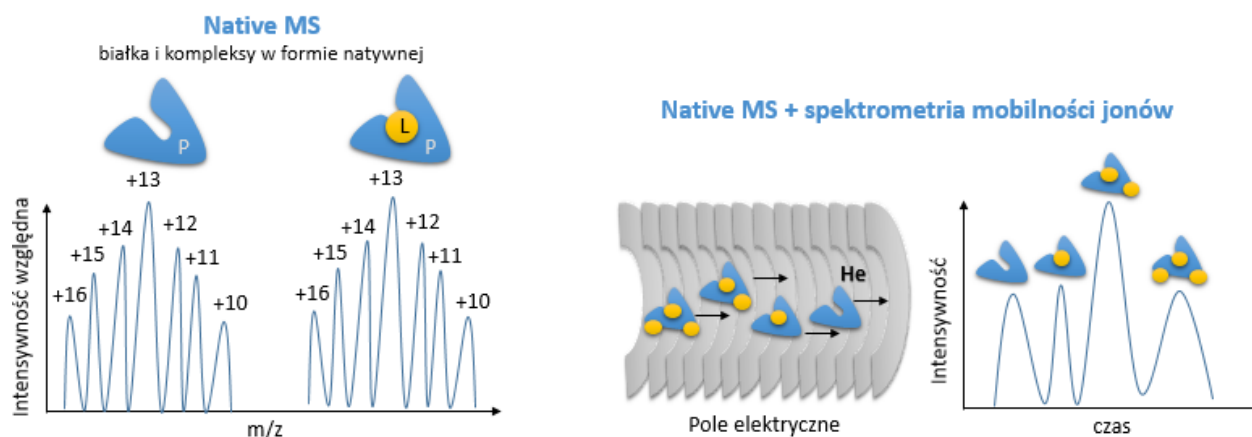
Elektroforeza kapilarna (CE) jest techniką rozdziału, która wykorzystuje wysokie pole elektryczne do wytworzenia przepływu elektroosmotycznego, przez co następuje rozdział jonów. Anality migrują z jednego końca kapilary na drugi w zależności od ich ładunku, lepkości i wielkości. Im wyższe pole elektryczne, tym większa mobilność jonów. CE jest kompatybilne z różnymi technikami jonizacji. Najczęściej stosowaną techniką jonizacji jest ESI.

CE ma kilka zalet w stosunku do LC. Jest tańsze i szybsze. Objętość próbki do analizy CE jest niewielka (rzędu nano-, pikolitra) i można dzięki tej metodzie uzyskać bardzo dobrą

separacje analitów. Ponadto CE umożliwia profilowanie i oznaczanie ilościowe metabolitów w pojedynczych komórkach. Głównym ograniczeniem CE-MS jest konieczność stosowania większych stężeń niż w przypadku LC. Innym ważnym zagadnieniem jest udoskonalenie połączenia ze źródłem jonów. Mimo wielu prac w kierunku rozwoju tej metody i zastosowania jej w analizie oligonukleotydów, nie jest ona stosowana rutynowo.¹⁴²

4.2.3. Spektrometria mobilności jonów w połączeniu ze spektrometrią mas

IMS to technika analityczna polegająca na rozdziale jonów w fazie gazowej na podstawie ich wielkości i kształtu pod wpływem pola elektrycznego, analogicznie do elektroforezy w fazie skondensowanej. Technika ta od dawna jest wykorzystywana do wykrywania nielegalnych lub niebezpiecznych substancji, na przykład materiałów wybuchowych na przejściach granicznych i do zbierania dowodów nielegalnego stosowania środków chemicznych.¹⁴³ IMS jest kompatybilna ze spektrometrią mas dlatego, że badane anality są również w fazie gazowej. Połączenie IMS i MS daje możliwość uzyskania komplementarnych informacji o badanych analitach. IMS pozwala na pomiar zarówno masy, jak i wielkości biomolekuł w fazie gazowej, przez co możliwe jest określenie struktury przestrzennej i stabilności pojedynczych cząsteczek, a także dużych wieloskładnikowych kompleksów. Spektrometria mobilności jonów (*ion mobility-mass spectrometry*, IM-MS) stwarza możliwość rozwiązywania struktur biomolekuł oraz kompleksów. Dobranie odpowiednich warunków eksperymentu umożliwia analizę cząsteczek oraz kompleksów w formie natywnej, dzięki czemu możliwa jest nie tylko charakterystyka strukturalna, ale również opis kinetyki zachodzących procesów takich jak wiązanie ligandów, fałdowanie białek, zamiany konformacyjne, kooperatywność, tworzenie kompleksów białkowych, ustalenie liczby miejsc aktywnych w białku itp.¹¹² Na [Rysunku 20](#) pokazano schemat metody *native MS*. Na widmie mas widać sygnały odpowiadające np. białku w formie natywnej oraz białku powiązanemu z ligandem. Wiązanie się ligandów często powoduje zmianę konformacji i kształtu cząsteczek. Takie cząsteczki mają różną ruchliwość w polu elektrycznym, dzięki temu mogą być najpierw rozdzielne w zależności szybkości ich migracji, a następnie identyfikowane na podstawie masy ([Rysunek 20](#)). W efekcie dzięki IM-MS można uzyskać widmo dwuwymiarowe – zależność od czasu migracji i masy.



Rysunek 20. Schemat metody native MS i spektrometrii mobilności jonów IMS

4.3. Zastosowanie spektrometrii mas do badań kwasów nukleinowych i ich składników

Spektrometria mas ma zastosowanie w analizie jakościowej i ilościowej pojedynczych nukleotydów jak i dużych biopolimerów. W tym Rozdziale zostały przedstawione wybrane przykłady zastosowania spektrometrii mas w kontekście badania nukleotydów i kwasów nukleinowych oraz został nakreślony potencjał jaki daje technika *native mass spectrometry*. Do analizy małowzrostkowych nukleotydów w szczególności stosowana jest tandemowa spektrometria mas w połączeniu z chromatografią cieczą. W kolejnym Rozdziale zostanie podanych kilka wybranych przykładów zastosowania spektrometrii mas do analizy nukleotydów z uwzględnieniem celu ich oznaczania. Małowzrostkowe nukleotydy analizuje się często w celach poznawczych, w celu powiązania ich obecności i ilości z określonym stanem organizmu. Niektóre nukleotydy są markerami chorób, dlatego oznacza się je w celach diagnostycznych. Spektrometria mas służy też do poszukiwania nowych nukleotydów oraz nieznanymi dotąd modyfikacji, które występują w organizmach. Ponadto służy do analizy metabolizmu syntetycznych analogów nukleotydów, które są narzędziami biologicznymi lub posiadają właściwości terapeutyczne. W kontekście kwasów nukleinowych informacje jakie chcemy pozyskać to głównie: sekwencja, obecność modyfikacji i długość łańcucha. Dobrze zaprojektowany eksperyment z udziałem spektrometrii mas, zastosowanie różnych metod jonizacji i detekcji pozwala na otrzymanie wszystkich tych informacji.

4.3.1. Analiza składników kwasów nukleinowych

4.3.1.1. Analiza endogennych nukleotydów w celach poznawczych

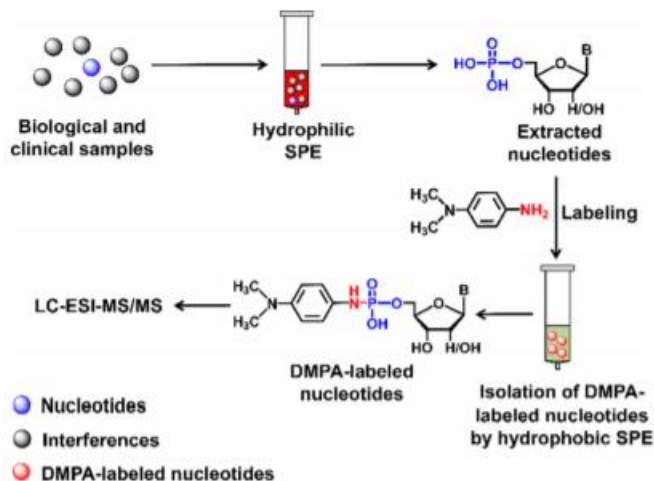
Metoda LC-MS/MS jest stosowana do analizy próbek biologicznych w celu identyfikacji ilościowej i jakościowej naturalnie występujących nukleotydów. Oznaczanie ilościowe i jakościowe tych cząsteczek oraz ich metabolitów jest przydatnym narzędziem do zrozumienia ich metabolizmu. Dzięki temu możliwe jest powiązanie występowania danego nukleotydu ze stanem chorobowym, bądź ustalenia zaburzeń w szlakach biosyntetycznych czy procesach degradacji nukleotydów. W konsekwencji nukleotydy mogą stać się markerami i być oznaczane w celach diagnostycznych (Rozdział 4.3.1.2). Stężenie poszczególnych nukleotydów różni się w zależności od różnych typów komórek i materiału zewnątrzkomórkowego (osocze, mocz). Ilości wewnątrzkomórkowych analogów nukleotydów mogą się również różnić u różnych pacjentów, co może skutkować źle dobranym sposobem terapii.^{23, 144} W związku z często bardzo niskimi wewnątrzkomórkowymi stężeniami analogów nukleotydów w porównaniu z ich niezmiennymi wariantami, do analizy jakościowej i ilościowej niezbędne są wysoce czułe i selektywne metody analityczne. W tym celu prowadzi się analizy ukierunkowane, czyli oznaczanie konkretnych znanych nukleotydów w szczególności używając trybu spektrometru MRM lub nieukierunkowane, gdzie szuka się nowych modyfikacji, w szczególności skanując określony zakres m/z (Rozdział 4.3.1.3).

Nowotwór, podobnie jak inne choroby, którym towarzyszą zmiany metaboliczne, wykazuje charakterystyczne modyfikacje DNA / RNA i aktywność enzymów modyfikujących, co powoduje wahania poziomów nukleotydów. Zhu i współpracownicy¹⁴⁵ opracowali szybko,

czułą, wysokowydajną metodę ilościową, aby jednocześnie oznaczać 20 endogennych nukleozydów i nukleotydów w trzech liniach komórkowych: raka płuc, raka okrężnicy oraz raka piersi. Metoda została przygotowana w oparciu o ultrawysokosprawną chromatografię cieczową z jonizacją elektrosprej i potrójnym kwadropolem (UHPLC-MS/MS). Najlepszy kształt piku uzyskano przy zastosowaniu 0,12% dietyloaminy w fazie ruchomej i pH 11.5. Użycie fazy mobilnej o tak wysokim pH było możliwe dzięki zastosowaniu grafitowej kolumny węglowej (*Porous Graphitic Carbon*, PGC), która może działać w szerokim zakresie pH. Eksperyment wykonywany był w trybie MRM, stosując jonizację ujemną. W celu ustalenia przejść MRM zostały zarejestrowane widma MS/MS dla wzorców badanych analitów, a następnie wybrano najbardziej intensywne pary MRM dla każdego z nich. W celu oznaczenia ilościowego nukleotydów i nukleozydów przygotowano krzywe kalibracyjne i jako wzorce wewnętrzne zastosowano analog nukleozydu - alamiwudynę i związek izotopowy adenozy- $^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$ 5'-trifosforan. Oznaczone anality to między innymi mono-, di-, tri- fosforany adenozy, cytozyny, guanozyny oraz ich nukleozydowe odpowiedniki. Ponadto cykliczny monofosforan adenozy i guanozyny oraz inozyna i monofosforan ioniczny. Zakres limitów oznaczalności wynosił od 6 do 0,6 nM, przy czym najmniejszy był dla cAMP. Autorzy pokazali, że dla każdej z badanych linii komórkowych stężenia poszczególnych nukleotydów różnią się, co może mieć zastosowanie w diagnostyce określonego typu nowotworu. Zaproponowana metoda pozwala na oznaczenie z wysoką czułością naturalnie występujących, niemodyfikowanych nukleotydów, jednak nie pokazano jak opracowane warunki sprawdzają się w przypadku analizy nukleotydów modyfikowanych w tym modyfikacji epigenetycznych np. metylacji.

Przykładem metylowanej zasady jest 5-metylocytozyna (m^5C), która odgrywa ważną rolę w różnych procesach komórkowych (Rozdział 3.2.2). Ze względu na ważne role regulatorowe, dla prawidłowego funkcjonowania komórek niezbędne jest utrzymanie prawidłowego poziomu metylacji DNA i RNA.¹⁴⁶ Nieprawidłowa metylacja DNA i RNA może powodować takie choroby jak cukrzyca,¹⁴⁷ zaburzenia neurologiczne,¹⁴⁸ i nowotwory.¹⁴⁹ Oprócz metylacji kwasów nukleinowych z udziałem metylotransferazy, obecne w komórkach metylowane nukleotydy, po uprzednim ufosforylowaniu, mogą być potencjalnie włączane do DNA czy RNA podczas replikacji i transkrypcji, wyciszając w ten sposób niektóre geny.¹⁵⁰ Aby zapobiec ich inkorporacji, endogenne m^5dCMP może być enzymatycznie deaminowany do monofosforanu tymidyny (TMP)¹⁵¹ i prawdopodobnie dlatego ciężko jest oznaczyć ilościowo faktyczną ilość m^5dCMP i m^5CMP . Zeng i współpracownicy¹⁵² zaproponowali bardzo czułą metodę oznaczania nukleotydów zawierających metylowaną cytozynę. Metoda polegała na znakowaniu oznaczanych nukleotydów N, N-dimetylo-p-fenylenodiaminą (DMPA), co znacznie zwiększyło czułość pomiaru (88-372 razy). Schemat znakowania został przedstawiony na [Rysunku 21](#). Jako wzorców wewnętrznych do przygotowania krzywych kalibracyjnych i oznaczania ilościowego użyto analogów badanych analitów znakowanych deuterem w obrębie DMPA. Metoda wykorzystywała chromatografię cieczową w połączeniu z jonizacją elektrosprej i detekcją za pomocą potrójnego kwadropola. Jednocześnie oznaczano 10 nukleotydów naturalnie występujących w tym m^5dCMP i m^5CMP . Wyniki pokazały, że endogenne m^5dCMP i m^5CMP powszechnie występują w komórkach ludzkich, tkankach i próbkach moczu. Ich obecność wskazuje, że deaminazy mogą niecałkowicie deaminować m^5dCMP i m^5CMP . W konsekwencji obecne metylowane nukleotydy cytozynowe mogą

przekształcać się w trifosforany i być wbudowywane do DNA lub RNA. Zaobserwowano spadek ilości m^5dCMP i m^5CMP w tkankach raka nerki i próbkach moczu pacjentów z chłoniakiem. Może to być spowodowane tym, że nukleotydy te są częściej wbudowywane do kwasów nukleinowych. Taka różnica stężeń w komórkach nowotworowych względem komórek zdrowych może mieć w przyszłości znaczenie diagnostyczne.



Rysunek 21. Schemat znakowania nukleotydów DMPA. Zaczepnięto z Zeng et al. 2017.¹⁵² CopyRights (2017) American Chemical Society.

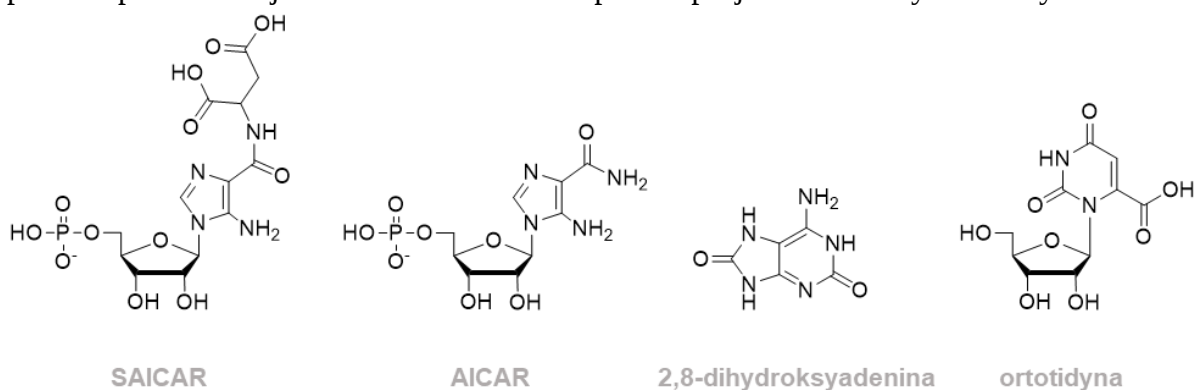
4.3.1.2. Analiza składników kwasów nukleinowych w celach diagnostycznych

Kiedy wiadomo jaki związek i w jakim stężeniu odpowiada za dany stan chorobowy, mamy do czynienia z analizą ukierunkowaną i oznaczany jest specyficzny analit w próbce.^{24, 28} Znanych jest kilkadziesiąt dziedzicznych zaburzeń wynikających z błędów metabolizmu puryn i pirymidyn, dlatego oznaczanie poziomów nukleozydów i nukleotydów jest wykorzystywane w ich diagnostyce i monitorowaniu leczenia. Zaburzenia metabolizmu puryn i pirymidyn są bardzo zróżnicowane - objawy obejmują problemy z odpornością, kamice nerkową, wady neurologiczne i inne.¹⁵³ Jedną z przyczyn zaburzeń metabolizmu nukleozydów jest zbyt niski poziom deaminazy adenozykowej (ADA), która odpowiada za deaminację adenozy, przekształcając ją w inozynę, która jest dalej metabolizowana. Niedobory tego enzymu powodują akumulację adenozy (Ado), deoksyadenozy (dAdo) oraz trifosforanu deoksyadenozy (dATP). Prowadzi to do ciężkiego złożonego niedoboru odporności (*severe combined immunodeficiency*, SCID).¹⁵⁴ Osoby z tym zespołem mają wysoką podatność na zarażenia wirusowe, bakteryjne i grzybicze. Są podatne na powtarzające się i uporczywe infekcje, które mogą być bardzo poważne lub zagrażające życiu. Dzieci dotknięte tą chorobą rosną znacznie wolniej niż dzieci zdrowe, a niektóre mają zaburzenia rozwojowe. U większości osób z niedoborem ADA diagnozuje się SCID w pierwszych 6 miesiącach życia. Bez leczenia dzieci zwykle nie przeżywają więcej niż 2 lata. Dlatego ważne jest prowadzenie badań przesiewowych noworodków i diagnostyka SCID w celu rozpoczęcia terapii np. terapii genowej. Szybka analiza bardzo dużej ilości próbek, co ma miejsce w badaniach przesiewowych, wymaga zastosowania metod wysokoprzepustowych. Al.-Dibrashi i współpracownicy zaprojektowali metodę w oparciu o tandemową spektrometrię mas, która pozwala na identyfikację metabolitów Ado i dAdo w ciągu 2,5 min oraz ocenę aktywności ADA.¹⁵⁵ Do analizy użyto tandemowej spektrometrii mas z jonizacją elektrosprej. Z racji tego,

że badane były nukleozydy pomiar wykonywano w trybie jonów dodatnich w trybie MRM. Chociaż próbka była wprowadzana do spektrometru za pomocą chromatografii cieczowej, nie używano kolumny, gdyż rozdział składników nie był potrzebny. W celu oznaczenia ilościowego Ado i dAdo używano ich analogów znakowanych izotopowo: węglem 13 i azotem 15 . Zaletą zaproponowanej metody jest to, że w stosunkowo krótkim czasie dostarcza informacji o ilości nukleozydów związanych z zaburzeniami ADA oraz o aktywności tego enzymu. Metoda ta jest uzupełnieniem dla metody *T-cell receptor excision circles* (TRECs) z suchej kropli krwi (*dried blood spots*, DBSs), gdyż sama analiza TREC jest niewystarczająca, żeby określić przyczynę SCID. Dzięki szybkiej metodzie opartej o tandemową spektrometrię mas, możliwa jest szybka identyfikacja i detoksykacja metabolitów, co daje możliwość efektywnego leczenia chorych noworodków.

Innymi ważnymi biomarkerami nukleotydowymi są: SAICAR (*phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide*), który wskazuje na deficyt liazы adenylbursztynianowej co powoduje upośledzenie umysłowe;¹⁵⁶ AICAR (*5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide*) wskazuje na zaburzenia AICAR transformylazy/IMP cyklohydrolazy (ATIC), co skutkuje chorobami układu nerwowego;¹⁵⁷ 2,8-dihydroksyadenina jest wskaźnikiem dla fosforybozylotransferazy adeninowej (APART), której zaburzenia działania prowadzą do kamicy nerkowej i chorób nerek¹⁵⁸ oraz ortotidyna wskazująca na deficyt syntetazy monofosforanu urydyny (UMPS) co powoduje acydurię orotową ([Rysunek 22](#)).¹⁵⁹

Monostori i współpracownicy opracowali metodę opartą o LC-MS/MS, która pozwoliła na analizę 27 różnych metabolitów pochodzenia nukleotydowego, w tym wyżej wymienionych biomarkerów, w próbkach moczu.¹⁶⁰ Do analizy próbek moczu używano kolumny C18 i spektrometru mas z jonizacją elektrosprej i potrójnym kwadrupolem, co pozwoliło identyfikować metabolity w trybie MRM. Zaproponowana metoda jest szybka i czuła, a ponadto pozwala na jednoznaczne wskazanie próbek pacjentów zdrowych i chorych.

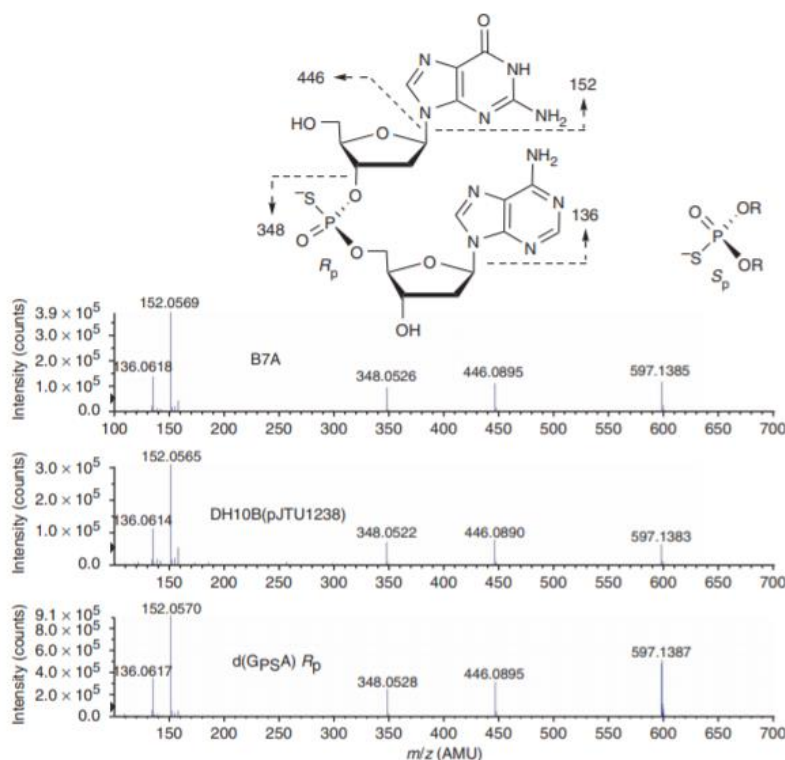


Rysunek 22. Struktury biomarkerów pochodzenia nukleotydowego.

4.3.1.3. Poszukiwanie nowych nukleotydów

Spektrometria mas jest ważnym i szeroko stosowanym narzędziem w analizie naturalnie występujących nukleotydów. Rezultatem postępu technologicznego w tej dziedzinie i rozwojem metod rozdziału analitów, jest możliwość projektowania czułych i selektywnych metod pozwalających na identyfikację związków występujących w bardzo małych stężeniach w próbkach biologicznych, przez co mogły być one dotychczas niezidentyfikowane.

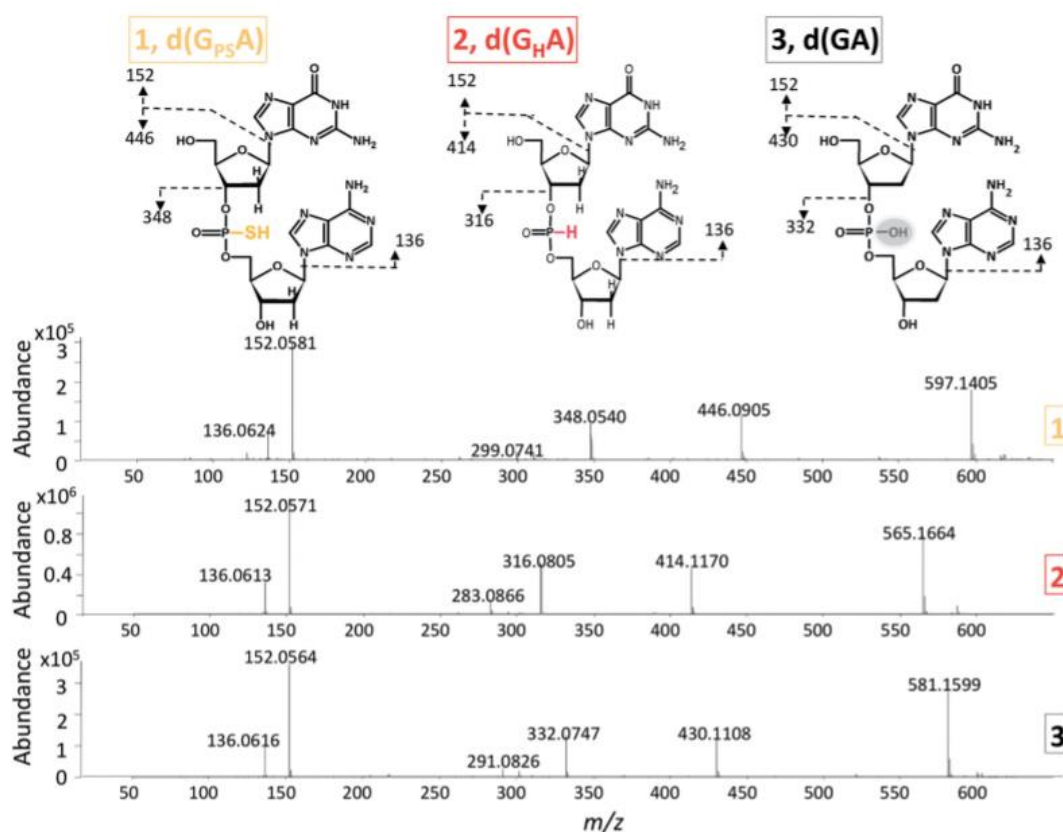
LC-MS/MS bardzo dobrze sprawdza się w poszukiwaniu nowych, nieodkrytych dotąd nukleotydów. W tym celu najczęściej stosuje się analizę nieukierunkowaną, chociaż nie zawsze. Przykładem zastosowania spektrometrii mas do poszukiwania nowych analogów nukleotydów może być identyfikacja modyfikacji tiofosforanowej w DNA bakterii. Chociaż już w latach 80tych, analizy elektroforetyczne sugerowały występowanie nietypowo modyfikowanego DNA w bakteriach,^{161, 162} ostatecznie udało się zidentyfikować obecność grup tiofosforanowych dzięki zastosowaniu chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas przez Wanga i współpracowników w 2007 roku.^{163, 164} W eksperymencie bakterie były hodowane na pożywce zawierającej siarkę ³⁵S. DNA z takich bakterii zostało wyizolowane, trawione za pomocą SVPDE, a otrzymane fragmenty były analizowane za pomocą LC-MS/MS. Stanowiły one kontrolę, gdyż zawierały nukleotydy z ³⁵S. Następnie, znając czas retencji fragmentów DNA zawierających siarkę, wyizolowano materiał genetyczny z bakterii, które nie rosły na pożywce z ³⁵S i porównano z kontrolą. Zidentyfikowano masy, które odpowiadały strukturze dinukleotydów zawierających tiofosforan (1 szczep $m/z = 597.1385$, 2 szczep = 597.1383 , teoretyczna masa obliczona $m/z = 597.1393$). Następnie zarejestrowano widma fragmentacyjne w wysokiej rozdzielczości (w trybie jonów dodatnich) dwóch badanych szczepów bakteryjnych i kontroli (Rysunek 23). Na zarejestrowanych widmach obecne były jony fragmentacyjne wskazujące na obecność siarki, co potwierdziło obecność tiofosforanu w wyizolowanych dinukleotydach.



Rysunek 23. Widma mas wysokiej rozdzielczości dinukleotydów zawierających tiofosforan. Widma fragmentacyjne wykonywano w trybie jonów dodatnich. Trzy widma przedstawiają dwa różne szczepy bakterii i kontrolę. Zaczepnięto z Wang et al., 2007.¹⁶³

Tiofosforylacja DNA w bakteriach jest uważana za modyfikację epigenetyczną, a jej znaczenie jest szeroko badane. Pokazano między innymi, że DNA lub RNA bakteryjne zawierające modyfikację tiofosforanową jest bardziej odporne na nukleazy, zapewnia stabilność DNA w niesprzyjających warunkach życia bakterii oraz zapewnia odporność na stres

oksydacyjny.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Wpływ nadtlenków, w tym H_2O_2 na bakterie zawierające tiofosforany w DNA badali Xie i współpracownicy.¹⁶⁷ Okazało się, że po użyciu utleniaczy w obecności DNA z tiofosforanem zachodzi reakcja redoks, co sugeruje, że takie DNA może działać jako odczynnik redukujący. Do identyfikacji produktów utleniania DNA autorzy wykorzystali spektrometrię mas (Rysunek 24).



Rysunek 24. DNA zawierające tiofosforan jest utleniane przez H_2O_2 . Figura przedstawia widma fragmentacyjne produktów po utlenianiu DNA. Zaczepnięto z Xie et al., 2012 (Numer licencji: 4964751084166).¹⁶⁷

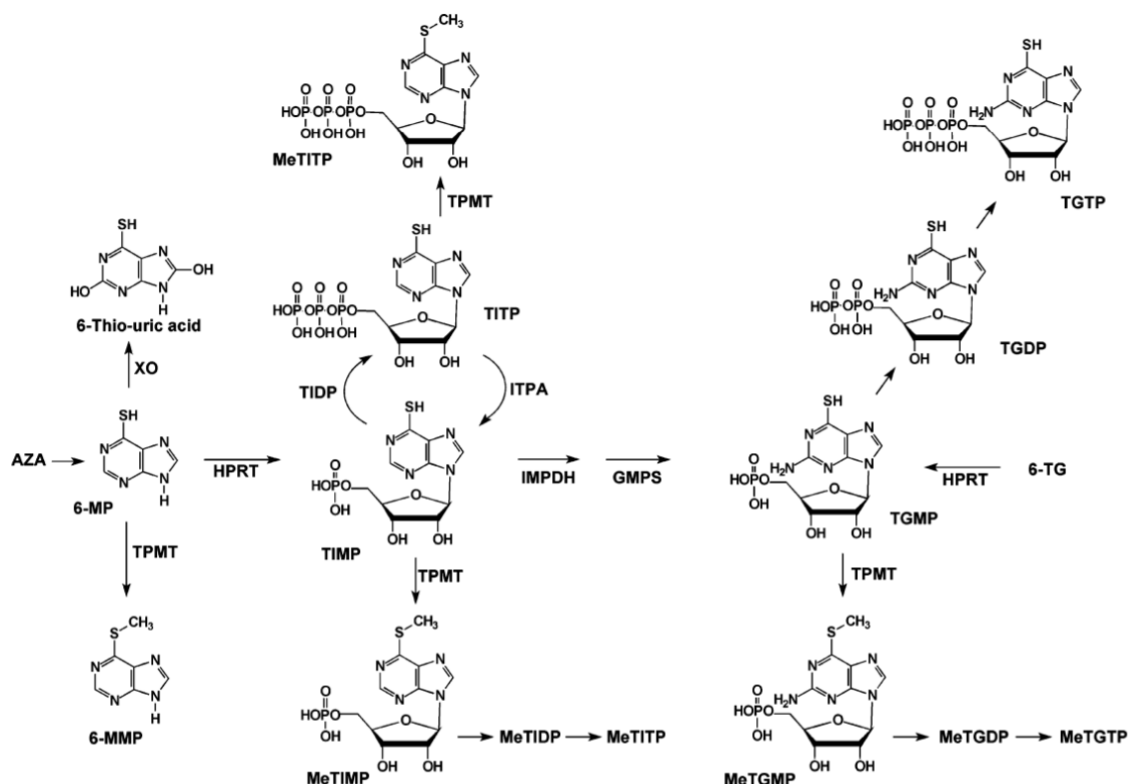
DNA/RNA zawierające modyfikacje tiofosforanową ma podobne właściwości do fosforanu, ale zapewnia odporność na degradację enzymatyczną jest obiecującym kandydatem do stosowania w celach terapeutycznych. Tiofosforany znalazły zastosowanie w terapeutycznych oligonukleotydach nie tylko ze względu na zwiększoną odporność na nukleazy, ale również ze względu na zwiększoną biodostępność *in vivo*.¹⁶⁸

4.3.1.4. Analiza metabolizmu syntetycznych nukleotydów

Metabolizm nukleotydów jest jednym z głównych celów terapeutycznych w komórkach. Syntetyczne analogi tych związków znalazły szerokie zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych, przeciwwirusowych i immunosupresyjnych.^{39, 169, 170} Dostarczenie do komórki analogu nukleozydu modyfikowanego w obrębie zasady lub rybozy do skutecznego działania wymaga wewnątrzkomórkowej aktywacji. Ta forma „proleku” wymaga fosforylacji do mono-, di- lub trifosforanów. Ważna jest również identyfikacja jego metabolitów, monitorowanie stężenia i kinetyka zachodzących procesów. Identyfikacja metabolitów syntetycznych analogów jest konieczna w celu zweryfikowania czy produkty metabolizmu nie

są toksyczne dla organizmu. Analog, którego metabolizm zachodzi według ścieżki, w której produktami są potencjalnie toksyczne związki nie może być zastosowany jako lek. W przypadku metabolizmu pronukleotydów oprócz potencjalnie szkodliwych prometabolitów ważne jest zidentyfikowanie, czy po dostarczeniu do komórek dany pronukleotyd jest metabolizowany w kierunku uzyskania aktywnej formy. LC-MS/MS jest szeroko stosowaną metodą w analizie leków i proleków.

Jako przykład analizy z wykorzystaniem LC-MS/MS można przytoczyć analizę proleków azatiopryny i 6-merkaptopuryny, które są dobrze znanymi lekami przeciwnowotworowymi i immunosupresyjnymi. Są one intensywnie metabolizowane przez enzymy aktywujące i dezaktywujące. Za główne metabolity uważane są nukleotydy 6-tioguaninowe (TGN) i nukleotydy metylo tioinozyny, które wydają się przyczyniać również do efektu cytotoksycznego. Często obserwowane są efekty niepożądane związane z tiopuryną.¹⁷¹ Z tego względu monitorowanie TGN i pochodnych metylo tioinozyny może przyczynić się do poprawy jakości terapii np. w chorobie Crona. W celu wyjaśnienia molekularnych mechanizmów metabolizmu azatiopryny, 6-merkaptopuryny i 6-tioguaniny opracowano wysoce specyficzną i czułą metodę LC-MS/MS do jednoczesnego oznaczenia jedenastu mono-, di- i trifosforanów tioguanozyny, metylo tioinozyny, metylo tioguanozyny i tioinozyny (Rysunek 25).

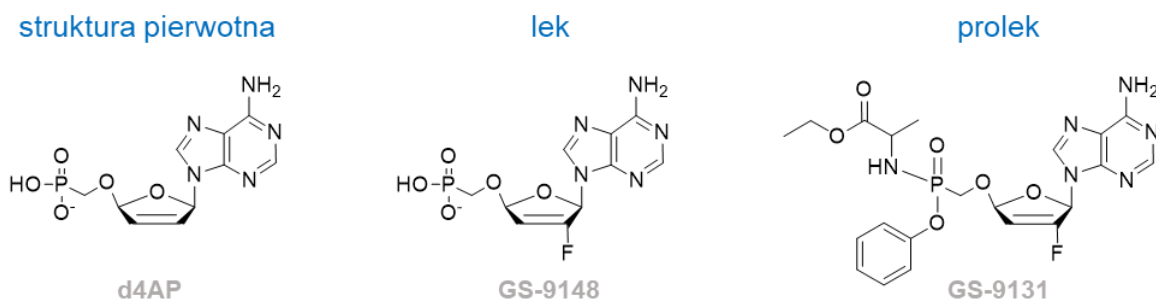


Rysunek 25. Metabolizm azatiopryny (AZA), 6-merkaptopuryny (6-MP) i 6-tioguaniny (6-TG). Zaczerpnięto z Hofmann et al., 2012.¹⁷¹ Copyrights (2012) American Chemical Society.

Nukleotydy oznaczano w próbkach krwi 18 pacjentów z chorobą Crona. Jako standardy wewnętrzne stosowano analogi badanych związków znakowane deuterem. Rozdział składników próbki odbywał się za pomocą chromatografii jonowymiennej stosując gradient pH, a detekcja z użyciem spektrometru z jonizacją elektrosprej i potrójnym kwadrupolem. Próbkę były analizowane w trybie MRM, w trybie jonów dodatnich, ponieważ zwiększało to

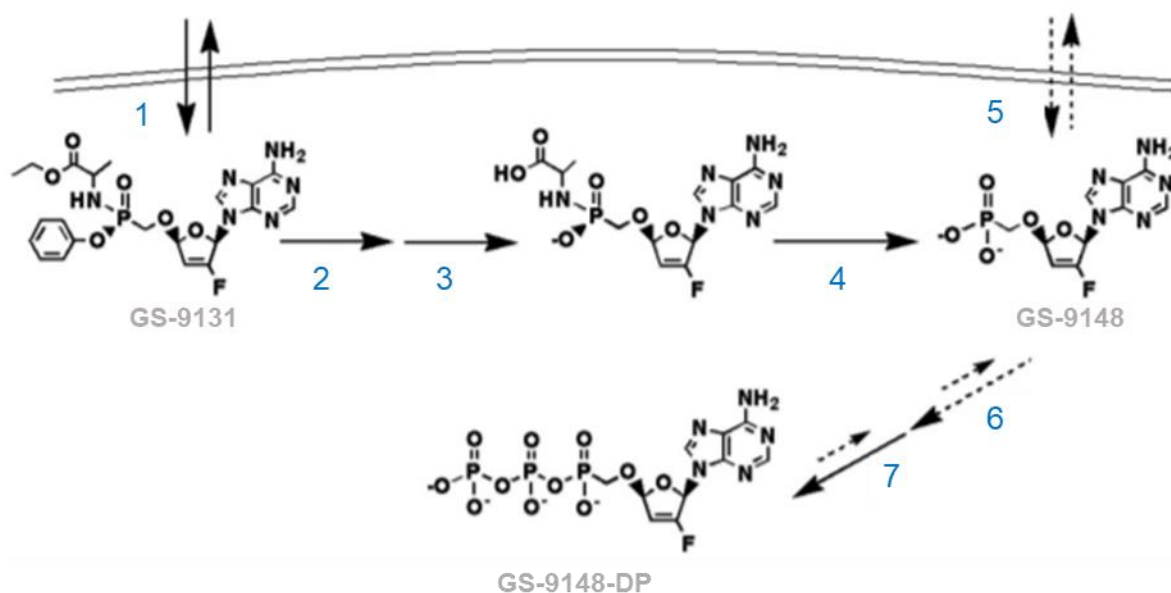
intensywność sygnałów badanych analitów. Co więcej, umożliwiała to wyznaczenie charakterystycznych jonów fragmentacyjnych związanych z modyfikacjami zasady azotowej. Badania wykonano u kilku pacjentów przyjmujących wyżej wymienione leki wykazując, że reakcja na obecność poszczególnych metabolitów jest cechą wysoce indywidualną. Dlatego też ważne jest śledzenie metabolizmu leków zawierających nukleotydy tiopurynowe, w szczególności u dzieci z białaczką. Zaproponowana metoda umożliwia szybką i dokładną analizę metabolizmu takich leków.¹⁷¹

Innym przykładem analizy metabolizmu proleków z wykorzystaniem spektrometrii mas jest analiza GS-9131. Jest to pronukleotyd, który w komórkach jest metabolizowany do GS-9148 ([Rysunek 26](#)). Związek ten został zaprojektowany przez amerykański koncern farmaceutyczny *Gilead Sciences* i wykazuje działanie przeciwwirusowe w tym przeciw HIV, nawet w przypadku mutacji, które są odporne na działanie innych leków. Działanie jego polega na inhibowaniu odwrotnej transkryptazy, przez co hamuje namnażanie się wirusa.¹⁷² Pierwotnie, jako potencjalny lek, został zaprojektowany d4AP, jednak produkty jego metabolizmu okazały się toksyczne dla organizmu. Podstawienie fluoru w pozycji 2' rybozy okazało się bardzo trafne, a otrzymany związek GS-9148 i jego prolek GS-9131 znajdują się obecnie w fazie badań przedklinicznych.¹⁷³



Rysunek 26. Struktury analogów nukleotydów wykazujących działanie przeciwwirusowe.

Metabolizm GS-9131 w komórkach były monitorowany za pomocą LC-MS/MS.¹⁷⁴ Ray i współpracownicy wykorzystali do analizy GS-9131 chromatografię par jonowych w połączeniu z ESI i potrójnym kwadrupolem. Analiza była wykonywana w trybie MRM, stosując jonizację dodatnią. Jako odczynnika do chromatografii par jonowych zastosowano octan tertrabutylamonu.¹⁷⁵ W celu oznaczenia ilościowego badanych analitów przygotowano krzywe kalibracyjne i ustalono limit oznaczalności w przedziale 0.05 to 0.1 pmol/mln komórek. Analizy metabolizmu GS-9131 wykonywano w różnych typach komórek w tym w komórkach zarażonych wirusem HIV-1. Za pomocą metody LC-MS/MS monitorowano przenikalność GS-9131 i GS-9148 przez błony komórkowe i stwierdzono, że GS-9131 ma nawet 290 razy większą przenikalność. Zaobserwowano, że GS-9131 był w komórkach skutecznie metabolizowany do GS-9148, a ten następnie fosforylowany do GS-9148-DP. Na podstawie zaobserwowanych metabolitów, ich stężeń i farmakokinetyki zaproponowano ścieżkę metabolizmu GS-9131 ([Rysunek 27](#)). Dotychczas nie zaobserwowano toksycznego wpływu metabolitów GS-9131 na organizm. Dzięki temu związek ten ma szansę stać się skutecznym lekiem w terapii przeciwwirusowej.



Rysunek 27. Domniemany mechanizm metabolizmu GS-9131. Strzałki przerywane oznaczają procesy mniej wydajne w stosunku do tych, które zostały oznaczone strzałkami z linią ciągłą. 1 – lipofilowy prolek przechodzi przez błony komórkowe, 2 – następnie jest metabolizowany przez komórkowe hydrolazy, 3 – fenol jest usuwany spontanicznie, 4 – pozostała grupa jest usuwana przez fosforoamidazy lub uwalnia się spontanicznie ze względu na niskie pH, 5 – przechodzenie GS-9148 przez błony komórkowe jest procesem bardzo mało wydajnym, 6, 7 – GS-9148 jest fosforylowany przez kinazy. Zaczerpnięto z Ray et al., 2008.¹⁷⁴

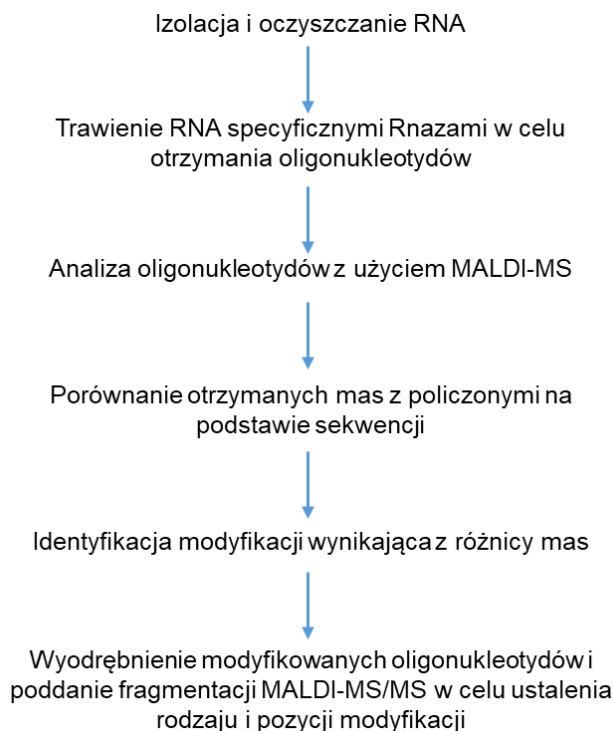
Przykładów użycia metody LC-MS/MS do analizy pojedynczych nukleotydów jest znacznie więcej. Można zaryzykować stwierdzenie, że dysponując odpowiednio zaprojektowaną metodą można oznaczyć jakościowo i ilościowo każdy nukleotyd. W analizie celowanej najpopularniejszą metodą jest MRM. Jednak, żeby wybrać odpowiednie pary MRM należy albo mieć dostępne wzorce każdego z badanych analitów, albo dokładnie znać ścieżki fragmentacji badanych związków. Istnieją bazy deponujące widma MS (np. MassBank Europe), jednakże znaleźć w nich można głównie niemodyfikowane, naturalnie wysypujące nukleotydy. W związku z tym, że w świetle projektowania metod w trybie MRM, poznanie ścieżek fragmentacji i ich systematyczne zbadanie jest zagadnieniem kluczowym, stało się to jednym z głównych zadań podjętych w ramach niniejszej pracy (Rozdział 5.3).

4.3.2. Analiza oligonukleotydów i kwasów nukleinowych

4.3.2.1. Zastosowanie MALDI do analizy oligonukleotydów i kwasów nukleinowych

Chociaż obecnie najczęściej do analizy oligonukleotydów i kwasów nukleinowych stosowana jest jonizacja elektrosprej, to jonizacja MALDI również dostarcza cennych informacji. Widma masowe wytwarzane przez MALDI są stosunkowo łatwe do interpretacji, ponieważ są zdominowane przez pojedynczo naładowane jony, co umożliwia analizę złożonych mieszanin oligonukleotydów. Bezpośredni pomiar jest możliwy tylko dla łańcucha długości kilkudziesięciu merów. Analizę modyfikacji w znacznie dłuższych RNA, takich jak rybosomalne RNA, można przeprowadzić przez trawienie RNA enzymami specyficznymi dla kwasów nukleinowych. MALDI-MS jest szczególnie użyteczny w przypadkach, w których inne techniki, np. analizy chromatograficzne, są trudne do wykonania. Do tej pory MALDI-MS był używany do identyfikacji modyfikacji rRNA, które biorą udział w podstawowych

procesach syntezy białek, a także nieznanymi dotąd miejsc metylacji u bakterii, która daje oporność na antybiotyki, takie jak awilamycynę,¹⁷⁶ kapreomycynę,¹⁷⁷ chloramfenikol¹⁷⁸ i teltromycynę¹⁷⁹. Takie zastosowanie MALDI-MS odegrało zasadniczą rolę również w identyfikacji enzymów katalizujących te modyfikacje.¹⁸⁰ Analiza RNA za pomocą MALDI składa się z kilku ogólnych etapów (Rysunek 28).



Rysunek 28. Strategia identyfikacji modyfikacji w obrębie RNA za pomocą MALDI-MS. Na podstawie Douthwaite et al., 2007.¹⁸⁰

Pierwszy etap obejmuje otrzymanie RNA za pomocą transkrypcji *in vitro* bądź izolację autentycznego RNA z danego organizmu. Następnie w przypadku bardzo długich RNA należy poddać je trawieniu specyficznymi RNazami, otrzymując w ten sposób krótsze fragmenty oligonukleotydowe. W niektórych przypadkach może być pożądanym wyizolowanie określonych regionów sekwencji, a to wymaga kilku dodatkowych kroków podczas przygotowywania próbki i zastosowania kombinacji różnych enzymów. Produkty trawienia RNazami są zwykle analizowane bezpośrednio za pomocą MALDI, chociaż ich interpretacja może być w wielu przypadkach trudna, dlatego też czystość próbki można poprawić poprzez oczyszczanie z użyciem chromatografii par jonowych. Następnie otrzymane oligonukleotydy są mieszane z matrycą i analizowane za pomocą MALDI/MS. W przypadku RNA sygnały otrzymane za pomocą jonizacji MALDI są porównywalnej intensywności zarówno w przypadku jonizacji w trybie jonów ujemnych jak i dodatnich. Prawdopodobnie wynika to z tego, że w trybie jonów ujemnych jest większa czułość, jednak użycie trybu jonów dodatnich zapewnia lepszą stabilność instrumentu i dlatego jest preferowana w wielu przypadkach.¹⁸⁰ W przypadku większych wartości m/z (powyżej 6000) interpretacja sygnałów jest utrudniona przez dwa główne czynniki: spadek czułości – większe fragmenty mają tendencję do rozpadu przed dotarciem do detektora, oraz poszerzenie sygnału i spadek rozdzielczości wynikający z obecności naturalnych izotopów węgla. W celu dokładniejszego opisu modyfikacji np. pozycji modyfikacji wybrany oligonukleotyd poddaje się fragmentacji. Główną zaletą MALDI jest to,

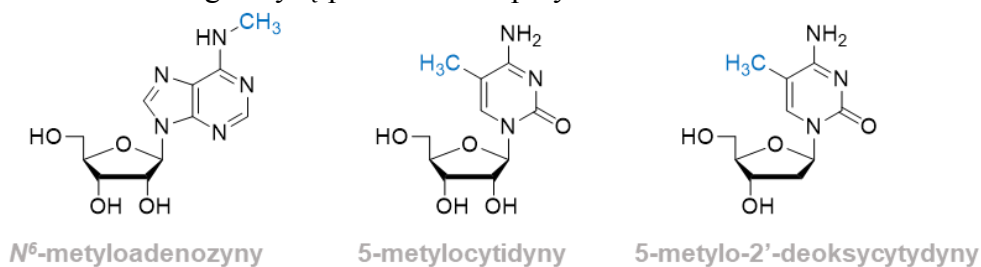
że na widmie dominują jony pojedynczo naładowane. Natomiast podstawową wadą jest niekompatybilność z technikami chromatograficznymi. Problem ten można rozwiązać stosując elektroskrepj (ESI), który z kolei dobrze łączy się z chromatografią.

4.3.2.2. Zastosowanie ESI do analizy oligonukleotydów i kwasów nukleinowych

Przed analizą ESI-LC-MS, RNA jest enzymatycznie trawione na oligonukleotydy, które następnie zostają rozdzielone z użyciem chromatografii cieczowej i analizowane za pomocą MS i MS/MS.¹⁸¹ Zmodyfikowane nukleozydy, z wyjątkiem pseudourydyny, która jest izomerem urydyny, są możliwe do oznaczenia z uwagi na różnicę w masie w porównaniu do kanonicznego nukleotydu. Rodzaj i pozycję modyfikacji w obrębie otrzymanego po trawieniu produktu oligonukleotydowego można zidentyfikować po ustaleniu sekwencji. Sekwencje można ustalić poprzez trawienie w taki sposób, aby fragmenty otrzymanych oligonukleotydów się nakładały. Można to osiągnąć poprzez zastosowanie specyficznych nukleaz.¹⁸²

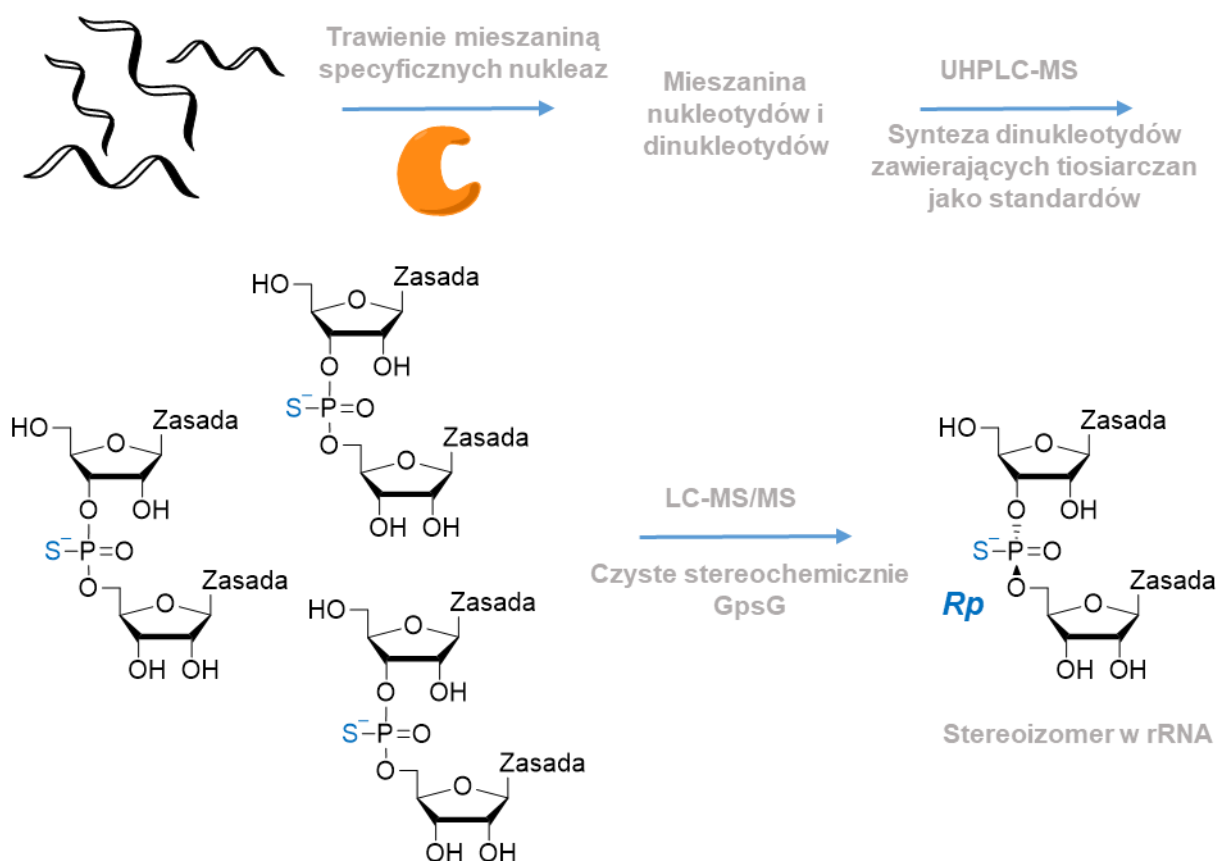
W większości przypadków do fragmentacji nukleotydów stosowana jest metoda CID, którą opisano w Rozdziale 4.1.6. Caldersi i współpracownicy zaproponowali alternatywną metodę fragmentacji - *radical transfer dissociation* (RTD).¹⁸³ RTD umożliwia sekwencjonowanie RNA do 39 merów i jest wyjątkowo przydatne w przypadku fragmentacji nukleotydów z labilnymi grupami takimi jak 5-hydroksymetylocytydyna i 5-formylocytydyna.

Za pomocą LC-ESI-MS/MS analizowano metylowane zasady np. *N*⁶-metyloadenozynę (*m*⁶A). Jest to jedna z najważniejszych modyfikacji RNA, która odgrywa fundamentalną rolę w epigenetycznej regulacji transkryptomu ssaków.^{50, 184} Huang i współpracownicy¹⁸⁵ zastosowali metodę LC-ESI-MS/MS do analizy metylacji w komórkach nowotworowych CTC (*circulating tumor cells*). Autorzy zoptymalizowali metodę otrzymywania komórek CTC z krwi, następnie przeprowadzili lizę tych komórek, izolację kwasów nukleinowych i ich trawienie. W konsekwencji wyizolowano pojedyncze nukleozydy, które poddano dalszej analizie metodą ESI-LC-MS/MS. Rozdział analitów był wykonywany z użyciem kolumny C18-T, a do detekcji używano potrójnego kwadrupola. Analiza była wykonywana w trybie jonów dodatnich, MRM, gdzie jony fragmentacyjne pochodziły głównie od zasad lub metylowanych zasad. Dzięki tej metodzie możliwa była identyfikacja 5-metylo-2'-deoksycytydyny, 5-metylocytydyny i *N*⁶-metyloadenozyny w pojedynczej komórce CTC (Rysunek 29). Badania wykazały, że w komórkach CTC obserwuje się znaczny spadek metylacji DNA (5-metylo-2'-deoksycytydyny), a wzrost metylacji cytozyny i adeniny w RNA (5-metylocytydyny i *N*⁶-metyloadenozyny) w porównaniu do innych komórek. Badania pokazały, że ilość metylacji odgrywa ważną rolę w tworzeniu się i rozwoju nowotworu, a co więcej może ułatwić diagnostykę przerzutów w przyszłości.



Rysunek 29. Metylowane nukleozydy oznaczane w komórkach CTC.

Metoda LC ESI-MS/MS została również wykorzystana przez Wu i współpracowników¹⁸⁶ do analizy modyfikacji tiofosforanowej w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Wyizolowane RNA było trawione mieszaniną nukleaz. Następnie podczas analizy identyfikowano nukleotydy takie jak CpsA, GpsC i GpsG. Najczęściej występował dinukleotyd GpsG, dlatego poddano go dalszej analizie w celu jego ostatecznej identyfikacji i określenia konfiguracji absolutnej. W tym celu zsyntetyzowano chemicznie dwa stereoizomery GpsG: *Sp* i *Rp*. Porównano czasy retencji, intensywności pików izotopowych oraz jony fragmentacyjne zsyntetyzowanych diastereoizomerów oraz związku wyizolowanego z komórek. Dzięki temu potwierdzono, że zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych obecna jest modyfikacja tiofosforanowa oraz, że występuje ona w konfiguracji *Rp* (Rysunek 30).



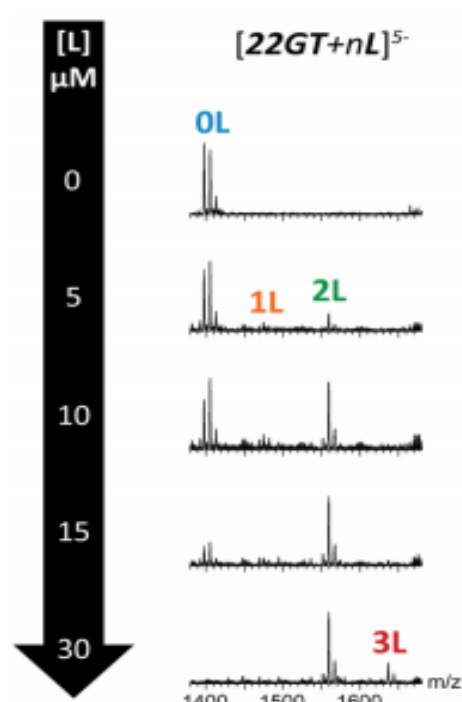
Rysunek 30. Schemat analizy modyfikacji tiofosforanowej w RNA. Na podstawie Wu et al., 2020.¹⁸⁶

Odkrycie to pozwoliło na identyfikację nowych modyfikacji w komórkach eukariotycznych, a tym samym stworzyło pole do badania ich znaczenia w regulacji ekspresji genu. Z wykorzystaniem LC-MS analizowano też dłuższe sekwencje np. oznaczanie długości ogona poli(A).¹⁸⁷ Co więcej, dzięki temu pokazano działanie polimeraz i udowodniono, że otrzymywane mRNA wykazują wysoką heterogenność, jeśli chodzi o długość ogona poli(A). Ponadto pokazano, że natywna spektrometria mas umożliwia badanie większych RNA np. tRNA o dł. 80nt^{188, 189} oraz pozwala na analizę oddziaływań niekowalencyjnych z innymi cząsteczkami.

4.3.3. Analiza niekowalencyjnych oddziaływań oligonukleotydów z innymi cząsteczkami

Analiza cząsteczek w formie natywnej za pomocą spektrometrii mas z jonizacją elektrosprej jest narzędziem do badania niekowalencyjnych oddziaływań biomolekularnych. Jest szeroko stosowana do badania kompleksów białkowych np. oddziaływania białko-ligand, interakcji pomiędzy podjednostkami białkami, oddziaływań białko-białko.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Opisano również badanie oddziaływań białko-RNA¹⁹⁴ oraz oddziaływania RNA-RNA np. badanie dimeryzacji RNA wirusa HIV-1.¹⁹⁵ Wiele prac opisuje oddziaływanie kwasów nukleinowych z mniejszymi cząsteczkami.¹⁹⁶ Dzięki opracowaniu warunków przez Marchanda i współpracowników możliwe jest użycie natywnej spektrometrii mas do obserwacji G-kwadrupleksów w formie natywnej,¹⁹⁷ a tym samym wykorzystywanie tej techniki do analizy oddziaływania oligonukleotydów tworzących G-kwadrupleksy z ligandami. G-kwadrupleksy są to struktury DNA, które tworzą się w regionach bogatych w guaninę. Zostały znalezione w obszarach promotorowych onkogenów i w regionach telomerowych, przez co są ciekawym celem terapeutycznym.¹⁹⁸ Wiązanie się ligandów do tych struktur jest ważnym i szeroko badanym zagadnieniem. Dzięki odpowiednio dobranym warunkom możemy obserwować sygnały na widmie MS pochodzące od G-kwadrupleksu bez liganda (0L), ze związanym 1 ligandem (1L), 2 ligandami (2L) itd. (Rysunek 31).

Na podstawie obserwacji sygnałów oraz ich intensywności możliwe jest obliczenie stałej wiązania oraz ustalenie jego stechiometrii i kooperatywności. Dzięki temu podejściu udało nam się zbadać w stosunkowo krótkim czasie wiązanie różnych ligandów do 21 sekwencji DNA. W konsekwencji pokazano, że jeden z nich (Cu-ttpy), wiąże się selektywnie i z wysoką kooperatywnością do antyrównoległych G-kwadrupleksów znajdujących się w regionach telomerowych człowieka.¹⁹⁹ Wyodrębnienie takiego ligandu wiążącego się specyficznie do określonego typu G-kwadrupleksów jest ważnym krokiem w kierunku syntezy związków regulujących ekspresję genów lub wiążących się do regionów telomerowych komórek nowotworowych. Nativna spektrometria mas w połączeniu z spektrometrią mobilności jonów daje jeszcze więcej możliwości i cały czas jest rozwijana.



Rysunek 31. Przykładowe widma MS sekwencji 22GT oraz liganda Cu-ttpy (Zaczerpnięto z Marchand et al., 2016; Numer licencji: 4964691374198).¹⁹⁹

5. BADANIA WŁASNE

5.1. Motywacja i obiekty badań

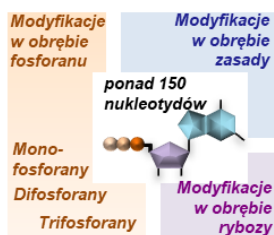
Chcąc wnieść swój wkład w rozwój spektrometrii mas oraz poszerzyć wiedzę na temat kwasów nukleinowych i ich składników, w niniejszej pracy opracowałam narzędzia w oparciu o spektrometrię mas, służące do ich analizy. W pierwszej części skupiłam się na analizie jakościowej i ścieżkach fragmentacji nukleotydów w celu stworzenia bazy danych, która pomoże w identyfikacji tych związków w próbkach biologicznych. Następnie wiedzę dotyczącą fragmentacji nukleotydów wykorzystałam do śledzenia metabolizmu końca 5' mRNA w ekstraktach z komórek ludzkich oraz badania składu modyfikowanego mRNA, w szczególności w obrębie ogona poli(A). Znajomość metabolizmu nukleotydów w ekstraktach oraz powiązanie struktury analogów mRNA z ich funkcją, dostarcza cennych informacji na temat ich właściwości i na tej podstawie pozwala na racjonalne projektowanie ulepszonych analogów. Takie cząsteczki mogą mieć zastosowanie w terapii genowej, antywirusowej lub jako szczepionki przeciwnowotworowe.

5.2. Plan badań

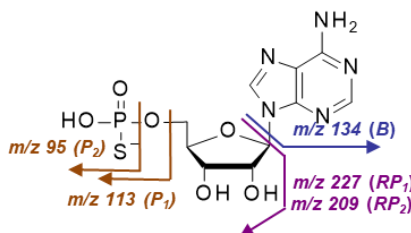
Realizowany projekt doktorski obejmuje opracowanie uniwersalnych metod opartych na tandemowej spektrometrii mas, pozwalających na analizę ilościową i jakościową nukleotydów, oligonukleotydów, ich syntetycznych analogów oraz kwasów nukleinowych o potencjale biologicznym lub terapeutycznym. Projekt składa się z dwóch zasadniczych części, których schemat ideowy przedstawiony jest na [Rysunku 32](#). Pierwsza część dotyczy jakościowej analizy nukleotydów, natomiast druga – ilościowego oznaczania nukleotydów w próbkach biologicznych takich jak ekstrakty komórkowe czy mieszaniny po reakcjach enzymatycznych. Celem pierwszej części było otrzymanie widm fragmentacyjnych (MS/MS) nukleotydów, zrozumienie ich ścieżek fragmentacji, sformułowanie ogólnych reguł rządzących procesem fragmentacji oraz przygotowanie bazy danych. Opracowana baza może być pomocna w identyfikacji metabolitów leków pochodzenia nukleotydowego, poszukiwaniu nowych naturalnych modyfikacji nukleotydów oraz w szybkiej identyfikacji produktów syntezy chemicznej. Celem badań ilościowych było zaprojektowanie metod LC-MS/MS do analizy produktów metabolizmu nukleotydów i kwasów nukleinowych (występujących naturalnie oraz ich syntetycznych analogów) wykazujących znaczący potencjał terapeutyczny. W kontekście mRNA, metodę LC-MS/MS wykorzystałam do badania składu modyfikowanego mRNA, procesów komórkowych związanych z metabolizmem mRNA, w szczególności tych, w które zaangażowane są charakterystyczne struktury znajdujące się na końcach 3' i 5' mRNA. Z drugiej strony rozwijane metody posłużyły analizie małych cząsteczkowych związków nukleotydowych, w tym naturalnych metabolitów, pronukleotydów o potencjale terapeutycznym oraz sond molekularnych pozwalających na badanie procesów komórkowych, czy aktywności poszczególnych enzymów związanych z nukleotydami i kwasami nukleinowymi. Otrzymane przeze mnie wyniki pozwolą na racjonalne projektowanie nukleotydów o wysokim potencjale terapeutycznym, modyfikowanych mRNA o ulepszonych właściwościach biologicznych oraz inhibitorów enzymów zaangażowanych w proces degradacji nukleotydów oraz kwasów nukleinowych.

Przegląd badań

Badania ścieżek fragmentacji nukleotydów za pomocą spektrometrii mas



Badanie fragmentacji różnych nukleotydów i ich analogów



Sformułowanie ogólnych reguł rządzących procesem fragmentacji

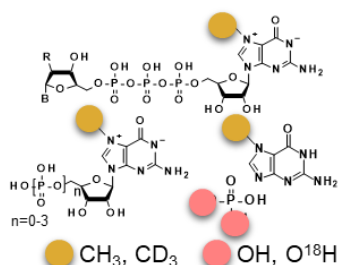
msTide

www.mstide-db.com

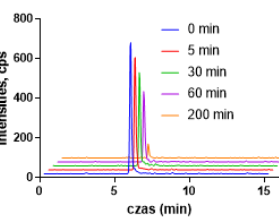
Przygotowanie bazy danych dostępnej online

Opracowanie metod LC-MS/MS do analizy nukleotydów w próbkach biologicznych

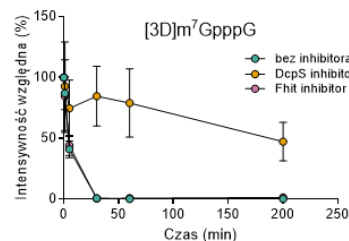
Badanie metabolizmu końca 5' w ekstraktach komórkowych



Synteza związków znakowanych izotopowo do wykorzystania jako wzorce

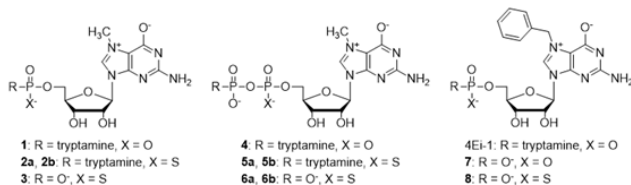


Opracowanie metody LC-MS/MS

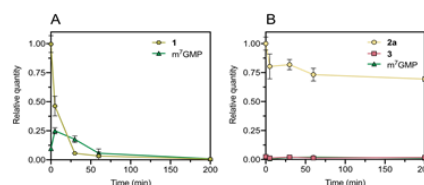


Monitorowanie metabolizmu końca 5' mRNA i jego analogów w ekstraktach komórkowych

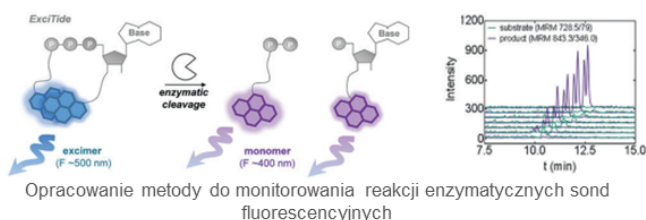
Analiza pronukleotydów w ekstraktach komórkowych



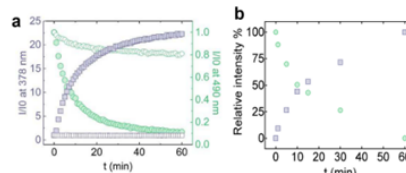
Badanie metabolizmu potencjalnych prolektów w ekstraktach komórkowych



Badanie reakcji enzymatycznych z udziałem nukleotydowych sond fluorescencyjnych

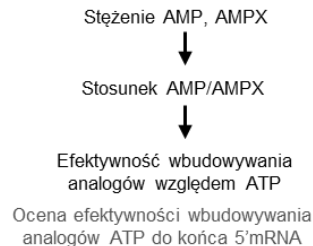
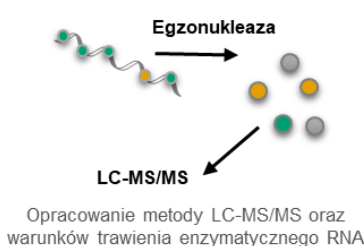
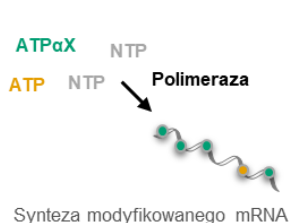


Opracowanie metody do monitorowania reakcji enzymatycznych sond fluorescencyjnych



Porównanie zgodności metody LC-MS/MS z metodami fluorescencyjnymi

Synteza modyfikowanego mRNA i badanie jego składu



Rysunek 32. Schemat ideowy głównych założeń projektu pokazujący kolejność zadań.

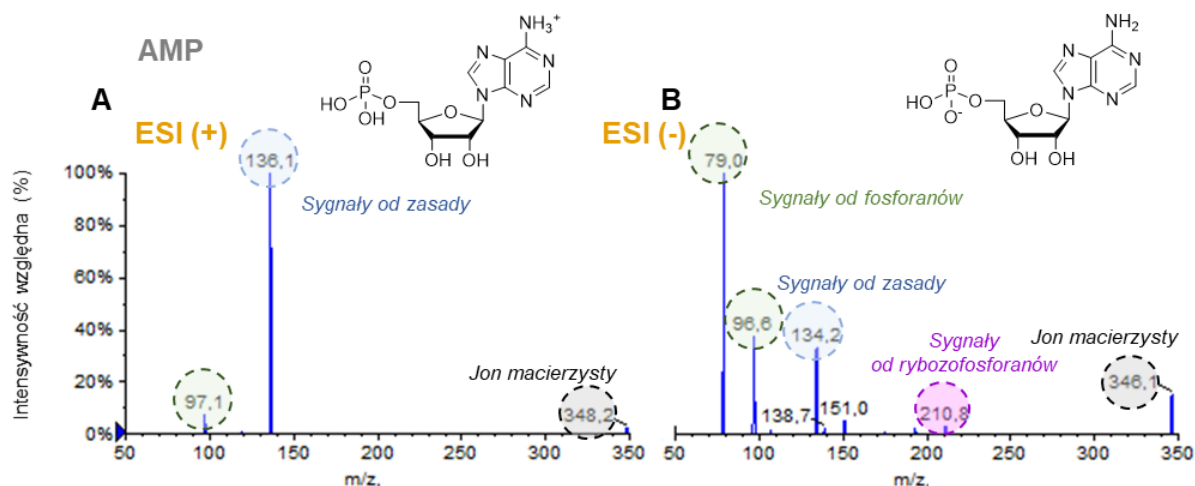
5.3. Badanie fragmentacji nukleotydów za pomocą spektrometrii mas

Poznanie ścieżek fragmentacji nukleotydów i ich chemicznie modyfikowanych analogów jest przydatne w projektowaniu metod jakościowych i ilościowych opartych na spektrometrii mas do analizy metabolizmu nukleotydów. W celu opracowania takich ścieżek zgromadziłam bibliotekę ponad 150 różnych nukleotydów, w tym naturalnie występujących jak i ich syntetycznych analogów. Niektóre z nich zawierały kilka modyfikacji lub były związkami izobarycznymi lub izomerami. Następnie wybrałam sposób jonizacji, który będzie najbardziej odpowiedni do moich badań oraz sprawdziłam, jaki wpływ na widmo fragmentacyjne nukleotydów ma sposób przygotowania próbki i niektóre parametry pomiaru. Zinterpretowałam otrzymane jony fragmentacyjne, a w celu ich weryfikacji opracowałam syntezę związków znakowanych izotopowo. W pierwszej kolejności dogłębnie zanalizowałam widma mono-, di- i trifosforanów nukleotydów, a następnie sprawdzałam jak obecność poszczególnych modyfikacji wpływa na strukturę widma MS/MS. Co więcej, wybrałam związki, które były izobarami i izomerami, żeby sprawdzić czy na podstawie widma fragmentacyjnego tak podobne strukturalnie związki są możliwe do rozróżnienia. Jako efekt tych badań powstała baza danych opisana w Rozdziale 5.3.8. Stanowi ona wygodne narzędzie pozwalające w prosty sposób śledzić ścieżki fragmentacji nukleotydów, dla których widma już zarejestrowano, ale również przewidywać widma fragmentacyjne dla nowych nukleotydów. Baza ta była wykorzystywana podczas badań opisanych w niniejszej rozprawie jak również jest dostępna *on line* dla innych badaczy.

5.3.1. Fragmentacja w trybie jonów ujemnych vs dodatnich

Widma nukleotydów rejestrowałam w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Zaobserwowałam, że na widmach w trybie jonów dodatnich pojawia się mniej sygnałów i pochodzą one głównie od zasady azotowej. Sygnały pochodzące od fosforanów są niskiej intensywności lub nie pojawiają się w ogóle. Sygnały od zasad azotowych zostały wcześniej opisane w pracy, której badano fragmentację nukleotydów: adenozyne, guanozyne, cytydiny i urydiny.²⁰⁰ Widma uzyskane przeze mnie w trybie jonów ujemnych oprócz sygnałów pochodzących od zasady zawierają również fragmenty pochodzenia fosforanowego lub rybozofosforanowego ([Rysunek 33](#)).

Widma rejestrowałam w taki sposób, aby jon macierzysty miał względną intensywność od 5 do 30% najwyższego sygnału na widmie. W przypadku, kiedy intensywność jonu macierzystego jest bardzo mała lub jeśli nie jest on obecny na widmie, do fragmentacji użyta została zbyt wysoka energia kolizji (CE) co powoduje, że badana cząsteczka została zdegradowana w znacznym stopniu i obserwowane jony fragmentacyjne są niespecyficzne. Natomiast w przypadku, kiedy sygnał pochodzący od jonu macierzystego jest zbyt intensywny, fragmentacja cząsteczki zachodzi mniej wydajnie i sygnałów fragmentacyjnych jest niewiele. Porównanie widma fragmentacyjnego w trybie jonów ujemnych i dodatnich na przykładzie AMP zaprezentowałam na [Rysunku 33](#).



Rysunek 33. Widma MS/MS AMP: (A) – w trybie jonów dodatnich, (B) – w trybie jonów ujemnych. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

Fragmentacje niemodyfikowanych zasad oraz ich analiza za pomocą MS były badane i zostały opisane w literaturze.^{200, 202} W niniejszym projekcie skupiłam się głównie na analizie nukleotydów zawierających modyfikacje w obrębie fosforanu i rybozy, dlatego też badałam głównie widma wykonane w trybie jonów ujemnych. Pozwalają one wskazać obecność i rodzaj modyfikacji w tych obszarach oraz dostarczają więcej informacji strukturalnych. Po wybraniu odpowiedniej jonizacji, kolejnym zagadnieniem wartym zweryfikowania było to, czy ścieżki fragmentacji są jednakowe niezależnie od warunków pomiaru i przygotowania próbki.

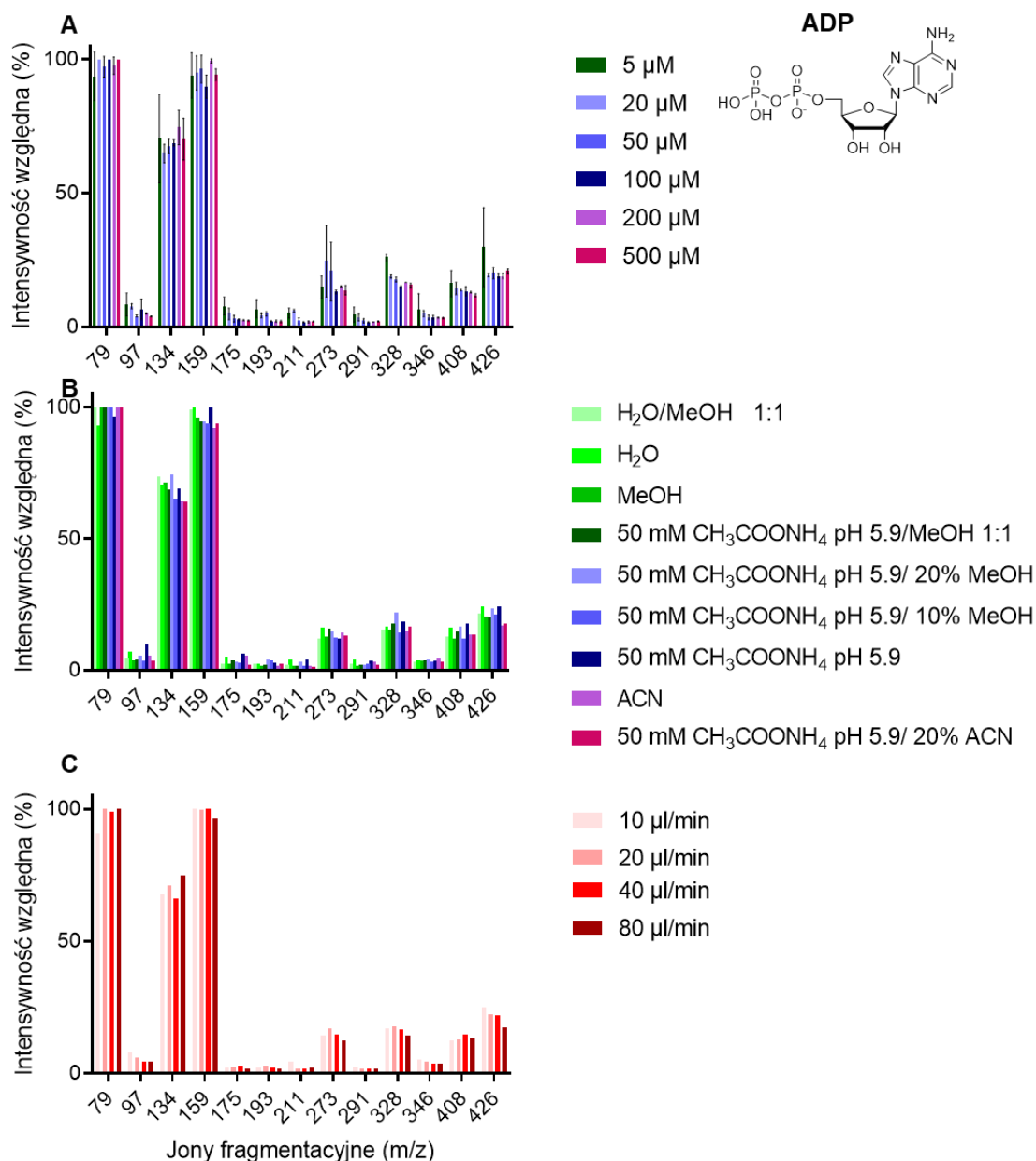
5.3.2. Wpływ różnych warunków na strukturę widma fragmentacyjnego (MS/MS)

Celem badań dotyczących fragmentacji było przede wszystkim stworzenie uniwersalnego narzędzia pozwalającego na szybką identyfikację nukleotydów w próbkach o różnym składzie i matrycy. Widma fragmentacyjne powinny być takie same niezależnie od warunków eksperymentu, a struktura otrzymanego widma MS powinna być zasadniczo niezależna od używanego spektrometru w przypadku stosowania tej samej metody jonizacji. W przypadku niniejszej pracy był to elektrosprej (ESI). W celu zweryfikowania, czy różne warunki przygotowania próbki i parametry MS wpływają na strukturę widma fragmentacyjnego testowałam różne rozpuszczalniki, różne stężenia próbki oraz szybkości przepływu. Widma MS i MS/MS rejestrowałam na spektrometrze wyposażonym w potrójny kwadrupol, gdzie trzeci kwadrupol może działać jak pułapka jonowa (Sciex, QTRAP 3200). Ponadto dla wybranych próbek zarejestrowałam widma na spektrometrach wyposażonych w inne analizatory mas takie jak: analizator czasu przelotu i specyficzny rodzaj pułapki jonowej - Orbitrap.

Na Rysunku 34 przedstawiłam wyniki dla ADP. Jak można zauważyć we wszystkich przypadkach obecne są te same jony fragmentacyjne. Ponadto ich względne intensywności są bardzo podobne, a otrzymane różnice nie są istotne statystycznie. Można, więc stwierdzić, że w przypadku testowanych warunków, żaden z nich nie wpływa w istotny sposób na strukturę widma fragmentacyjnego. Ścieżka fragmentacji jest taka sama dla wszystkich wcześniej wymienionych analizatorów.²⁰¹

Wyniki zaprezentowane w dalszej części pracy otrzymałam przy wykorzystaniu analizatora potrójnego kwadrupola. Stężenia wszystkich nukleotydów jakie używałam do

badan mieściły się w przedziale 40–400 μM , a przepływ 10–100 $\mu\text{l/min}$. Rozpuszczalnikiem w większości przypadków była mieszanina woda/metanol lub woda/bufor 50 mM AcONH_4 , pH = 5.9. Pozostałe parametry źródła jonów optymalizowałam dla każdego związku, a ich zakresy podałam w Części Eksperymentalnej, Rozdział 7.4.2.

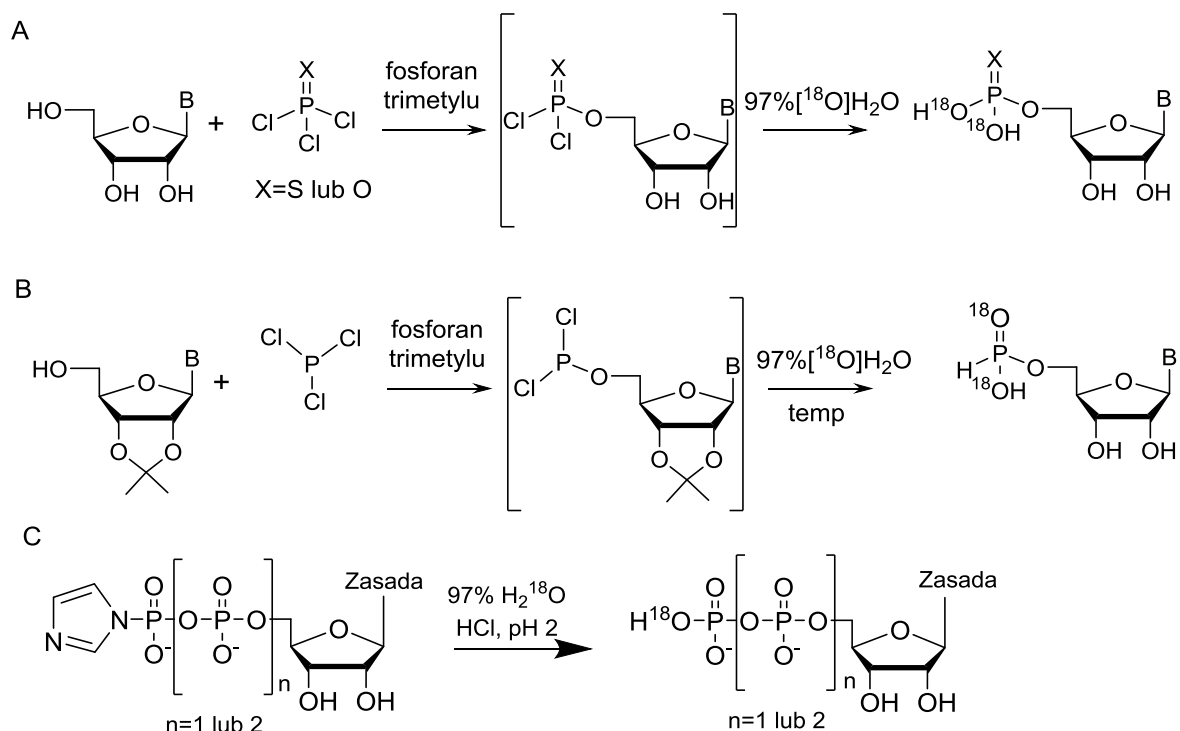


Rysunek 34. Wpływ warunków: stężenia nukleotydu (A), składu rozpuszczalnika (B) oraz wielkości przepływu (C) na względną intensywność sygnałów fragmentacyjnych ADP. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

5.3.3. Metody syntezy związków znakowanych izotopowo

W celu przypisania otrzymanym jonom fragmentacyjnym prawidłowej struktury opracowałam syntezę związków znakowanych izotopowo jednym [^{18}O] lub dwoma atomami tlenu 18 [^{18}O , ^{18}O] w obrębie fosforanu. W projekcie, do otrzymania izotopologów monofosforanów nukleozydów: AMP (5' monofosforan adenozyne), GMP (5' monofosforan guanozyne), AMPS (5' tiofosforan adenozyne), AMPH (H-fosfonian adenozyne) AMPBH_3

(5'boranofosforan adenozyne), GDP (5' difosforan guanozyne), GTP (5' trifosforan guanozyne), ATP (5' trifosforan adenozyne), znakowanych tlenem 18 wykorzystałam głównie trzy strategie syntezy, których schemat został przedstawiony na [Rysunku 35](#).



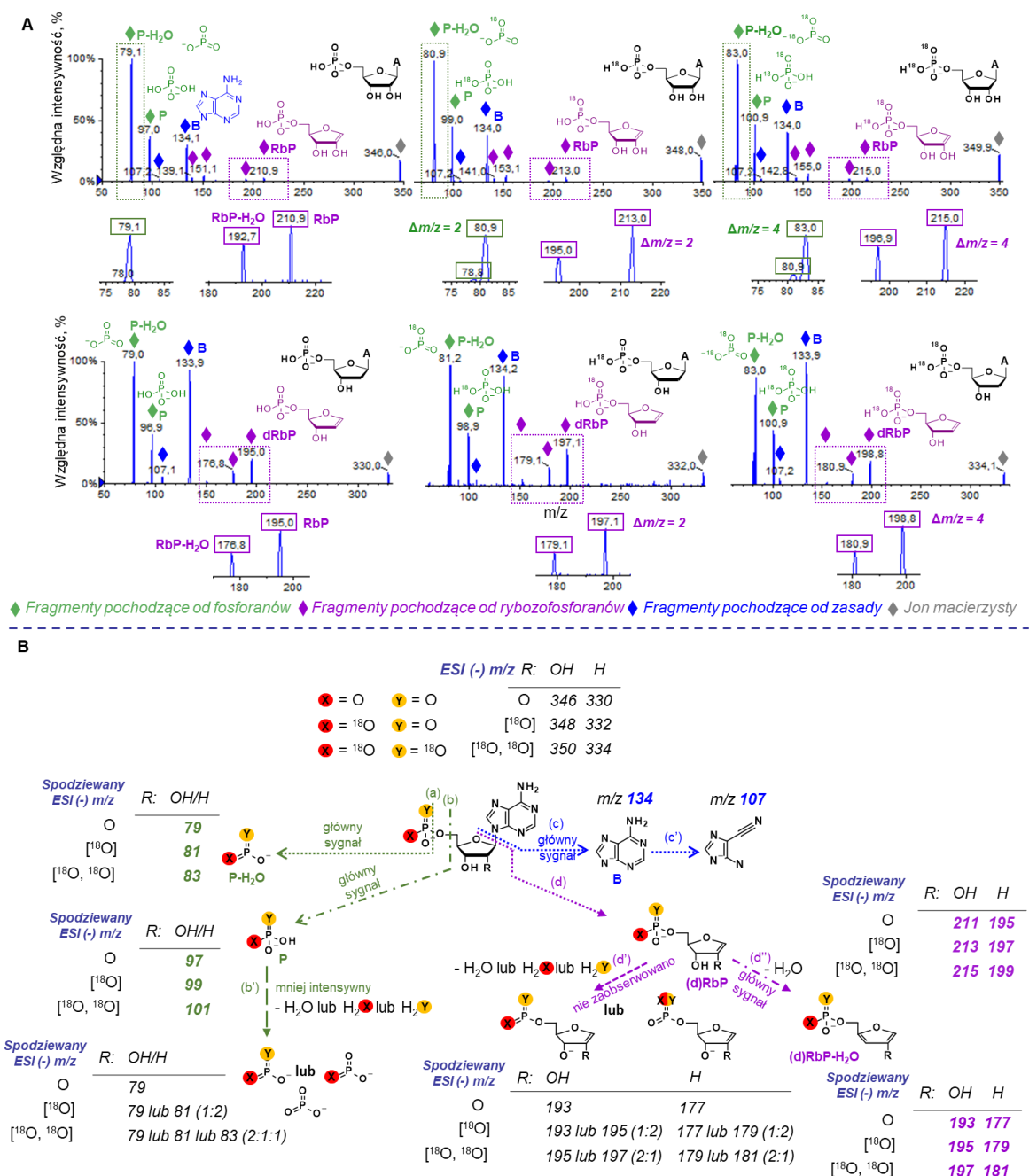
Rysunek 35. Schemat syntezy nukleotydów znakowanych izotopowo (A) – 5' fosforylacja nukleozydu i 5' tiofosforylacja nukleozydu, (B) otrzymywanie H-fosfonianu znakowanego tlenem 18, (C) otrzymywanie związków γ lub β-[18O]-znakowanych. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

AMP, GMP oraz AMPS otrzymano metodą fosforylacji lub tiofosforylacji nukleozydu (metoda Yoshikawy²⁰³). W celu otrzymania związku znakowanego tlenem 18, hydrolizę dichlorofosforanowych lub dichlorotiofosforanowych pochodnych nukleozydów w mieszaninie poreakcyjnej przeprowadziłam przy użyciu 97% H₂¹⁸O. Znakowany tlenem H-fosfonian otrzymałam w reakcji fosforylacji 2',3'-izopropylidenoadeozyny, produkt pośredni (5'-dichlorofosforan 2',3'-izopropylidenoadeozyny) hydrolizując 97% H₂¹⁸O przez 6 h w temperaturze pokojowej. W tych warunkach usunięciu ulegała również grupa 2',3'-izopropylidenowa.⁸⁵ Produkty oczyszczane były za pomocą HPLC ([Tabela 5](#)). W celu otrzymania nukleotydów γ lub β-[18O]-znakowanych, pochodną imidazolową nukleotydu rozpuściłam w 97% H₂¹⁸O. Reakcja prowadzona była w pH 2. Kiedy hydroliza zaszła całkowicie, pH reakcji doprowadziłam do 5-6 używając NaOH. Oczekiwany produkt γ lub β-[18O]-znakowany nukleotyd był oczyszczany używając HPLC ([Tabela 5](#)). Widma fragmentacyjne związków znakowanych tlenem pomogły w przypisywaniu struktury jonom fragmentacyjnym, które były charakterystyczne dla widm MS/MS nukleotydów.

5.3.4. Widma fragmentacyjne niemodyfikowanych 5'-monofosforanów nukleotydów (NMP)

Jednym z założeń projektu było dokładne poznanie ścieżek fragmentacji nukleotydów, a także przyporządkowanie najbardziej prawdopodobnych struktur dla obserwowanych jonów

fragmentacyjnych. W niniejszym rozdziale została dokładnie przedyskutowana struktura widma fragmentacyjnego uzyskana w trybie jonów ujemnych dla 5'-monofosforanu rybonukleozydu i deoksyrybonukleozydu na przykładzie AMP i dAMP (Rysunek 36, Panel A).



Rysunek 36. (A) widma fragmentacyjne AMP i dAMP jak i ich izotopologów znakowanych tlenem ¹⁸O, (B) zaproponowana ścieżka fragmentacji NMP na przykładzie AMP. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

Na każdym z widm fragmentacyjnych w trybie jonów ujemnych możliwe jest wyszczególnienie pewnych charakterystycznych grup sygnałów: sygnały pochodzące od zasady azotowej (B), sygnały pochodzące od fosforanów (P) oraz sygnały pochodzące od rybozofosforanów (RbP). Spośród sygnałów pochodzących od zasady azotowej najbardziej intensywny jest ten, który odpowiada niepofragmentowanej zasadzie azotowej. W przypadku niemodyfikowanych nukleotydów A, G, C, U sygnały te przyjmują wartości m/z odpowiednio

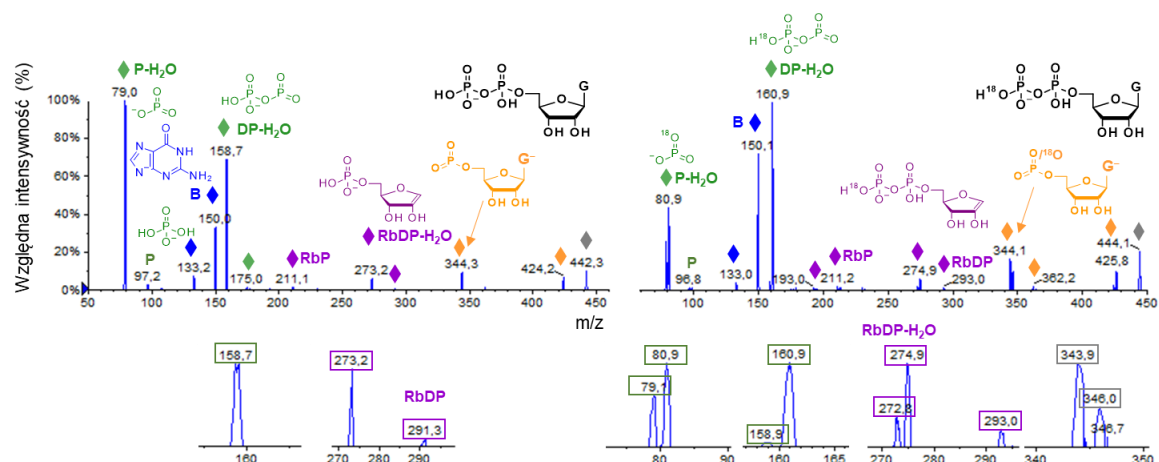
134, 150, 111 i 112. Czasami na widmie pojawiają się niewielkie sygnały związane z fragmentacją zasady azotowej.^{200, 202} Sygnały pochodzące od niemodyfikowanego fosforanu (V) monofosforanów (P) przyjmują wartość m/z 97. Na widmie obserwowany jest również sygnał o wartości m/z 79, który pochodzi od odwodnionego anionu fosforanowego (P-H₂O). Na widmie możemy zaobserwować fragmenty o większych wartościach m/z : 211 i 193 – odpowiadają one resztom rybozofosforanowym (RbP i RbP-H₂O). Dla deoksyrybonukleotydów fragmenty te mają wartość m/z mniejszą o 16: dRbP m/z 195, dRbP-H₂O m/z 175. Potwierdzenia identyfikacji fragmentów rybozofosforanowych (RbP i dRbP), ich odpowiedników pozbawionych cząsteczki wody (RbP-H₂O i dRbP-H₂O) oraz innych fragmentów rybozofosforanowych (m/z 151, 139) dokonałam poprzez analizę związków znakowanych izotopowo. Porównanie widm nukleotydów naturalnych jak i ich syntetycznych izotopologów pozwoliło mi zaobserwować przesunięcia sygnałów fosforanowych i rybozofosforanowych o odpowiednio 2 [¹⁸O] lub 4 jednostki [¹⁸O, ¹⁸O], w stronę większych wartości m/z . Ponadto każdy z pochodnych sygnałów RbP i dRbP zawierał początkową ilość tlenu 18, co oznacza, że proces odwodnienia zachodzi głównie w obrębie rybozy, a nie fosforanu (Rysunek 36, Panel B).

Porównałam również widma fragmentacyjne 5'-AMP i 3'-AMP. Widma te zawierały takie same sygnały fragmentacyjne jednak różniły się ich intensywnością, głównie intensywnością sygnału m/z 211. W przypadku izomeru 3' sygnał ten miał większą intensywność niż w przypadku izomeru 5', a sygnał RbP-H₂O m/z 193 był poniżej 1%. Obserwacje te pokazują, że fragmentacja 3'RbP zachodzi według tych samych ścieżek, które zaproponowałam dla izomeru 5' ponieważ obserwowane są te same jony fragmentacyjne, jednak udział tych ścieżek może być różny.

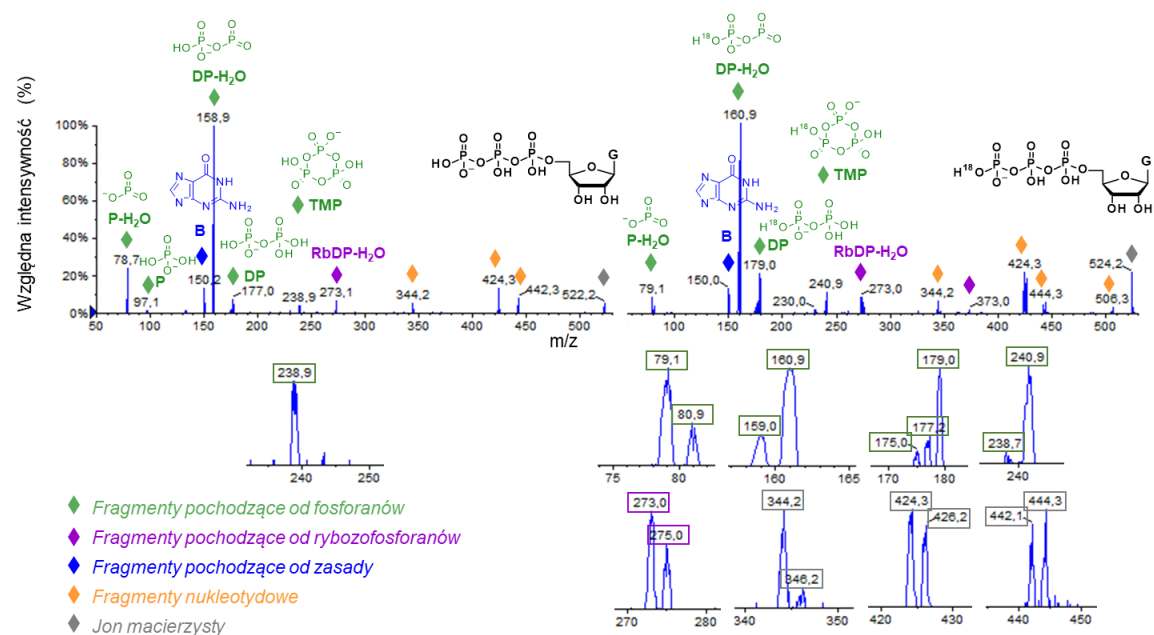
5.3.5. Widma fragmentacyjne niemodyfikowanych difosforanów i trifosforanów nukleozydów (NDP i NTP)

W kolejnym etapie zarejestrowałam i przeanalizowałam widma fragmentacyjne niemodyfikowanych difosforanów (deoksy)rybonukleozydów oraz trifosforanów (deoksy)rybonukleozydów. Ich ścieżki fragmentacji przebiegają podobnie jak dla monofosforanów (deoksy)rybonukleozydów. Oprócz fragmentów wcześniej zidentyfikowanych dla monofosforanów, w przypadku difosforanów zaobserwowałam pojawienie się fragmentów difosforanowych (DP) m/z 175 oraz odwodnionego odpowiednika m/z 159, który stanowił główny sygnał fragmentacyjny (Rysunek 37). Spośród sygnałów rybozofosforanowych największą intensywność miał m/z 273, który odpowiada odwodnionemu difosforanowi rybozy (RbDP-H₂O). W przypadku difosforanów deoksyrybonukleozydów sygnał ten miał wartość m/z 257. Uwodnione odpowiedniki tych sygnałów (m/z 291 i m/z 275) miały niską intensywność lub nie były w ogóle obserwowane. W celu potwierdzenia struktury jonów oraz zaproponowania ścieżek fragmentacji NDP, zsyntetyzowałam izotopolog GDP zawierający tlen 18 w pozycji β (GDPβ-[¹⁸O]).

A

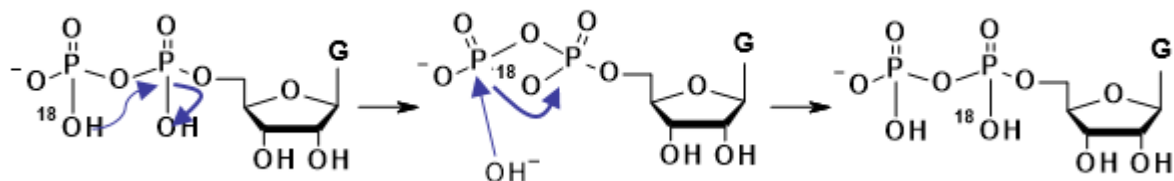


B



Rysunek 37. (A) widma fragmentacyjne GDP i jego izotopologu znakowanego tlenem ^{18}O , (B) widma fragmentacyjne GTP i jego izotopologu znakowanego tlenem ^{18}O . Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

Porównanie widm fragmentacyjnych nieznakowanych NDP i ich izotopologów pozwoliło mi zaobserwować, że w pierwszej kolejności cząsteczka wody jest usuwana z fosforanu, a następnie z rybozy (Rysunek 37, Panel A). Zaobserwowałam też częściową migrację tlenu [^{18}O] z pozycji β do α . Może to być spowodowane tworzeniem się cyklicznych jonów pośrednich czego mechanizm zaproponowałam na Rysunku 38.

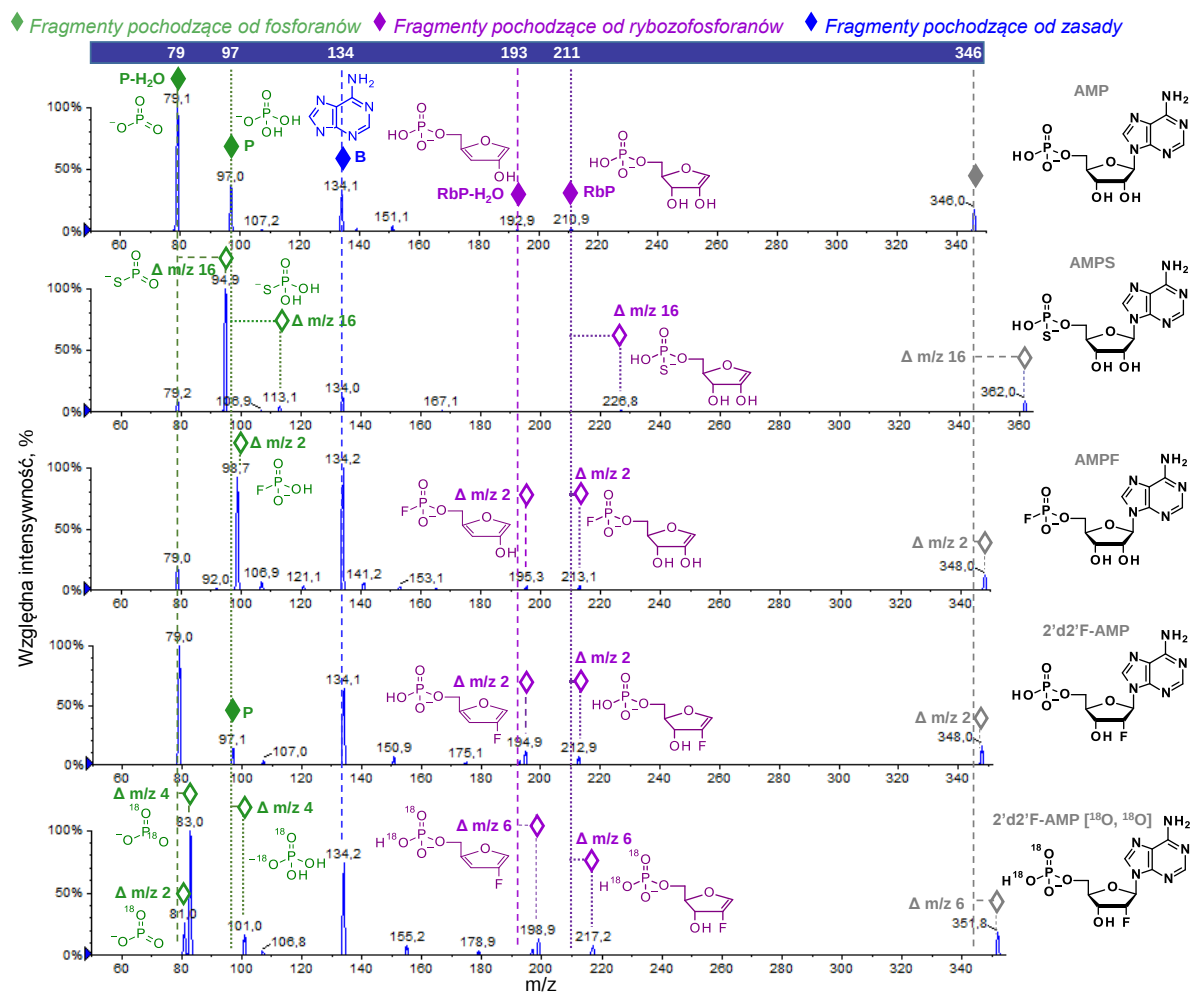


Rysunek 38. Hipotetyczny mechanizm tworzenia się cyklicznych jonów pośrednich podczas fragmentacji NDP na przykładzie GDP. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

Na widmach niemodyfikowanych trifosforanów nukleozydów również dominowały sygnały odpowiadające DP oraz RbDP-H₂O. Na widmach nie pojawiały się sygnały odpowiadające trifosforanom (TP), RbTP czy ich odwodnionym pochodnym. Na tej podstawie można wnioskować, że pierwszą grupą jaka zostaje odłączona w procesie fragmentacji jest γ -fosforan. Jest to zgodne z faktem, iż wiązanie pomiędzy γ - β fosforanem jest najbardziej labilne w tego typu cząsteczkach.²⁰⁴ Po odłączeniu terminalnego fosforanu fragmentacja NTP zachodzi podobnymi ścieżkami jak dla NDP. Co interesujące mimo wszystko na widmach NTP można wyróżnić charakterystyczny dla tych związków sygnał przy m/z 239. Jon ten najprawdopodobniej ma strukturę jonu metatrifosforanowego ([Rysunek 37](#), Panel B). Tworzenie takiego jonu związane jest z reaktywnością trifosforanów i zostało opisane w literaturze.²⁰⁴ Struktury jonów na widmach NTP potwierdziłam na podstawie porównania z izotopologiem znakowanym tlenem 18.

5.3.6. Wpływ modyfikacji fosforanu i rybozy na widma fragmentacyjne nukleotydów

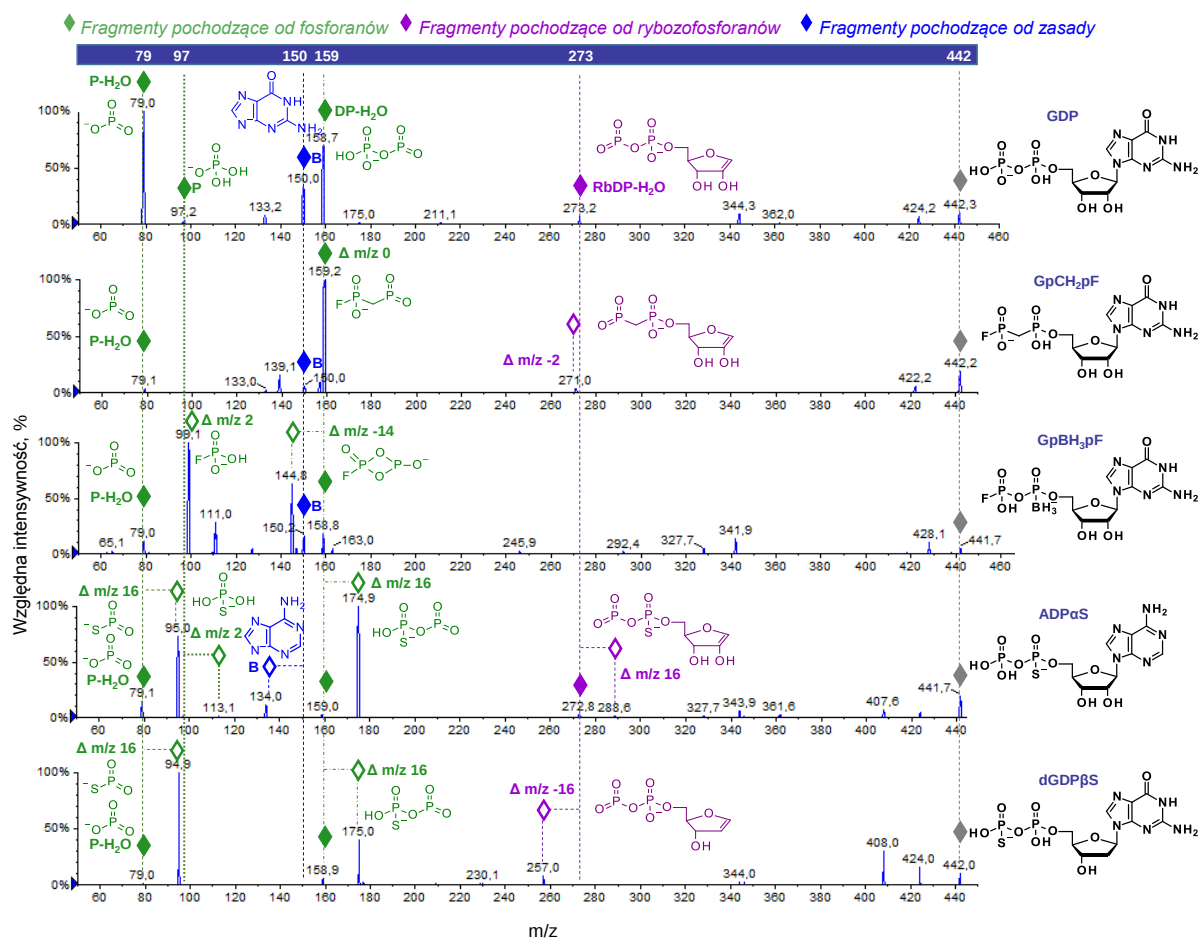
Następnym krokiem było zbadanie jak na strukturę widma fragmentacyjnego wpływa obecność pojedynczej modyfikacji w obrębie zasady azotowej, rybozy lub reszty fosforanowej oraz obecność kilku modyfikacji jednocześnie. Zastąpienie jednego z atomów (lub grupy atomów) w strukturze nukleotydu innym powoduje przesunięcie tylko określonych typów sygnałów, co pozwala na jednoznaczne wskazanie pozycji modyfikacji. Oznacza to, że jeśli modyfikacja występuje w obrębie zasady obserwuje się przesunięcie sygnałów pochodzących tylko od zasady zgodnie z różnicą mas wynikającą z obecności tej modyfikacji. Pozostałe fragmenty pozostają bez zmian. Następnie, jeśli modyfikacja występuje w obrębie fosforanu przesunięciu ulegają fragmenty fosforanowe i rybozofosforanów podczas, gdy fragmenty od zasady azotowej pozostają bez zmian. Jeśli modyfikacja jest obecna w strukturze rybozy, tylko sygnały rybozofosforanowe ulegają przesunięciu, a reszta pozostaje bez zmian ([Rysunek 39](#)). Zanalizowałam kilkadziesiąt nukleotydów zawierających różne modyfikacje w różnych pozycjach i w żadnym z badanych przypadków nie obserwowałam migracji atomów w obrębie cząsteczki, co jest bardzo ważną obserwacją i pozwala na jednoznaczne rozwiązanie struktury badanego związku. W przypadku modyfikacji w strukturze NDP i NTP widma mas najczęściej zmieniają się według wyżej opisanego schematu. Wyjątek stanowią jednak grupy labilne takie jak boranofosforany, selenofosforany czy reszty tiofosforanowe w pozycjach terminalnych. W tych przypadkach podczas fragmentacji w pierwszej kolejności modyfikacja jest eliminowana z cząsteczki lub zastępowana inną grupą atomów. W przypadku boranofosforanów na widmie MS/MS obserwujemy fragmenty odpowiadające H-fosfonianom. Dzieje się tak, ponieważ jedna z głównych ścieżek fragmentacji przebiega z zerwaniem wiązania P-B. W przypadku modyfikacji tiofosforanowych w terminalnej pozycji łańcucha fosforanowego często dochodzi do eliminacji tiofosforanu. Ponadto, może dochodzić do migracji atomów między poszczególnymi fosforanami α/β , β/γ , podobnie jak z zaobserwowano w kontekście związków znakowanych izotopowo (Rozdział 5.3.5).



Rysunek 39. Zmiany struktury widma fragmentacyjnego w zależności od wprowadzonej modyfikacji na przykładzie AMP. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

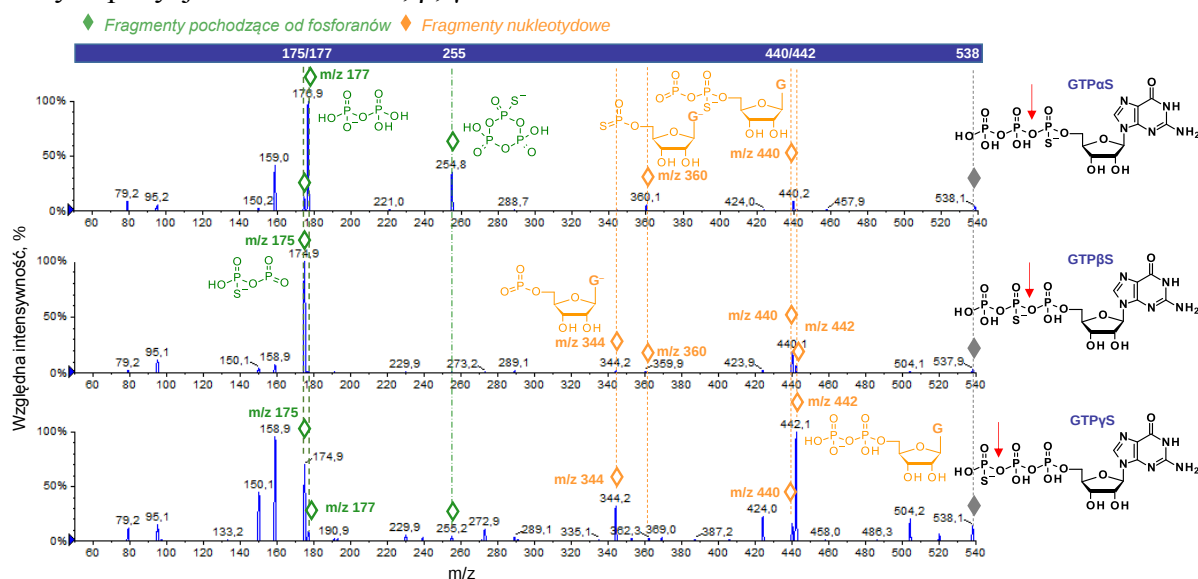
5.3.7. Rozróżnianie nukleotydów izobarycznych i izomerycznych na podstawie ich widm fragmentacyjnych

Izobary to związki, które mają taką samą masę nominalną jednak różnią się rodzajem atomów w cząsteczce. Związki te mogą mieć bardzo podobne właściwości i w wielu przypadkach wykazują podobne właściwości chromatograficzne, co czyni ich analizę w próbkach biologicznych znacznie trudniejszą w porównaniu do innych analitów. Na [Rysunku 40](#) zaprezentowałam zestawienie widm fragmentacyjnych kilku wybranych nukleotydów izobarycznych. Widać, że w każdym z prezentowanych przypadków można znaleźć charakterystyczne fragmenty, które jednoznacznie pozwalają na odróżnienie analizowanych związków. Rozróżnienie GDP i GpCH₂pF umożliwia brak sygnału RbDP-H₂O (m/z 273) w przypadku GpCH₂pF. Zamiast niego pojawia się sygnał m/z 271 odpowiadający Rb-pCH₂p-H₂O. Sygnały o wartości m/z 95 i 113 są charakterystyczne dla nukleotydu, zawierającego w obrębie fosforanu siarkę. Odpowiadają one tiofosforanowi i odwodnionemu tiofosforanowi. Dzięki tym sygnałom możemy odróżnić np. ADPαS od GDP. Co więcej, obecność sygnałów: m/z 134 i m/z 150, wskazuje, że w pierwszym przypadku zasadą azotową jest adenina, a w drugim guanina.



Rysunek 40. Zmiany struktury widma fragmentacyjnego związków izobarycznych na przykładzie difosforanów nukleozydów. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

Jeszcze trudniejsze może być odróżnienie związków izomerycznych, gdyż posiadają identyczny wzór sumaryczny i co za tym idzie, identyczną masę atomową. Jako przykład, na Rysunku 41 przedstawiłam analogi GTP zawierające atomy siarki zamiast tlenu w trzech różnych pozycjach fosforanu: α , β , γ .

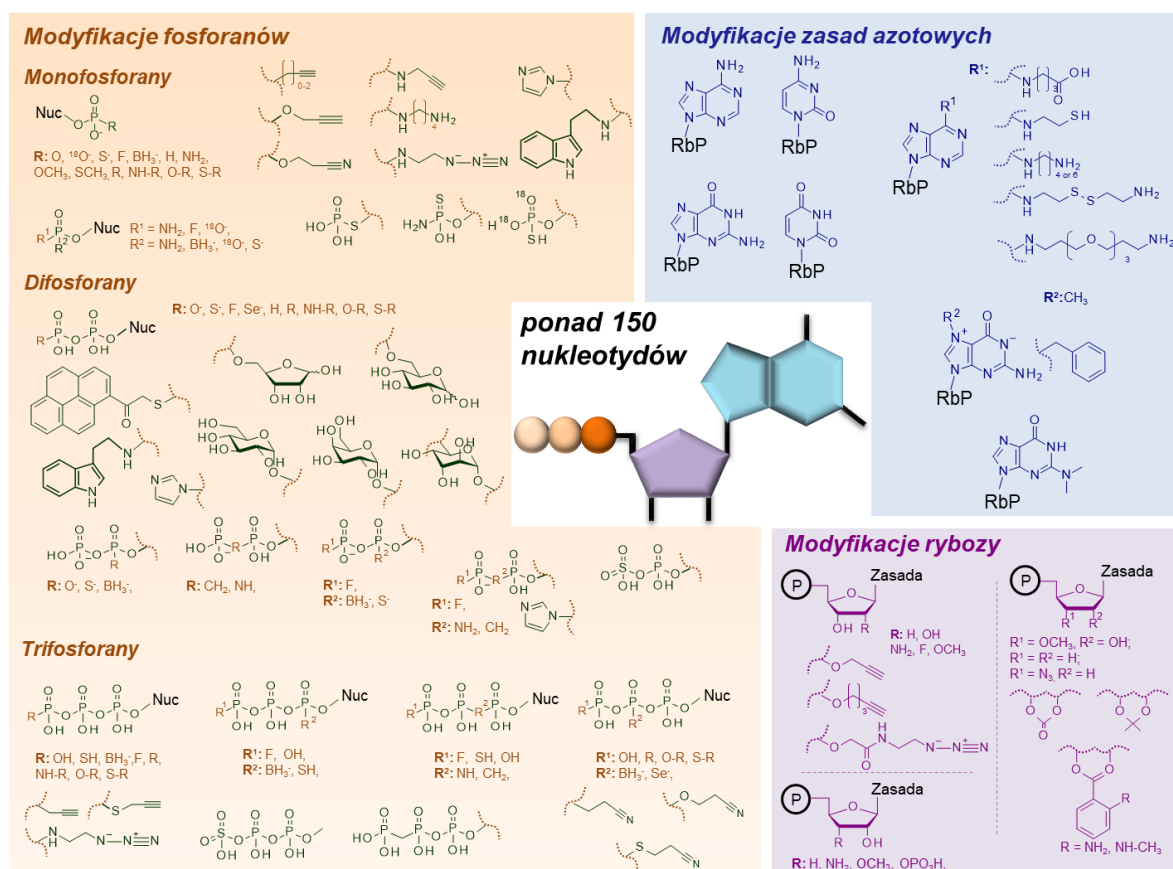


Rysunek 41. Zmiany struktury widma fragmentacyjnego związków izomerycznych na przykładzie pochodnej trifosforanu ganozyny. Strzałka wskazuje najsłabsze wiązanie w obrębie fosforanu. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

Mimo znacznego podobieństwa strukturalnego tych związków ich ścieżki fragmentacji są różne, co jest odzwierciedleniem chemicznej stabilności tych związków. Można zaobserwować, że wiązanie między fosforanem i tiofosforanem jest mniej stabilne i pęka znacznie łatwiej niż między dwiema grupami fosforanowymi. Na widmie GTP α S sygnał pochodzący od difosforanu m/z 177 ma największą intensywność. W przypadku dwóch pozostałych związków jest on praktycznie nieobserwowalny. Sygnał m/z 175 jest obecny zarówno na widmie GTP β S jak i GTP γ S. Wskazuje on na obecność siarki w obrębie terminalnego difosforanu. Jednak związki te między sobą można odróżnić na podstawie obecności lub braku sygnału m/z 442. Jest to sygnał odpowiadający GDP, obecny na widmie GTP γ S i praktycznie nie widoczny na widmie GTP β S. Można na tej podstawie wnioskować, że widmo, na którym obecny jest sygnał m/z 442 pochodzi od GTP γ S, gdyż najsłabsze wiązanie uległo zerwaniu z uwolnieniem GDP.

5.3.8. Biblioteka nukleotydów i baza danych

Wnioski i obserwacje zaprezentowane we wcześniejszych rozdziałach były możliwe do sformułowania dzięki przebadaniu biblioteki ponad 150 różnych nukleotydów, których zestawienie przedstawiłam na [Rysunku 42](#).



Rysunek 42. Zestawienie zbadanych nukleotydów. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

Związki te powstawały przez kilka lat istnienia zespołu profesora Jemielitego i zostały zsyntetyzowane przeze mnie i członków tego zespołu. Przeprowadzone badania mogą mieć lub już mają zastosowanie w wielu różnych dziedzinach nauki (przykłady podano w Rozdziale

5.3.9). Jednakże, żeby miały one realne zastosowanie konieczne było stworzenie uniwersalnego narzędzia, które będzie dostępne dla szerokiego grona odbiorców i łatwe w obsłudze. Dlatego też powstała baza danych *msTide*, zaprojektowana od strony technicznej przez mgr Sylwię Bednarek. Baza jest dostępna online (www.mstide-db.com). Zawiera ona ponad 150 widm MS/MS wraz z przyporządkowanymi strukturami jonów fragmentacyjnych. W *msTide* jest możliwych kilka sposobów przeszukiwania: wyszukiwanie po nazwie związku, po wartości m/z jonu macierzystego, po wybranych fragmentach i inne. Przykładowo, wpisując w wyszukiwarkę określony jon lub jony fragmentacyjne jako rezultat otrzymuje się wszystkie związki zdeponowane w bazie, które zawierają dany fragment. Jest to bardzo pomocne przy identyfikacji analitów w skomplikowanych, wieloskładnikowych mieszaninach.

5.3.9. Podsumowanie rozdziału i zastosowanie wiedzy dotyczącej fragmentacji nukleotydów

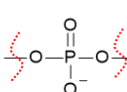
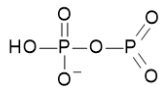
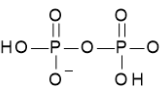
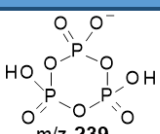
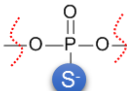
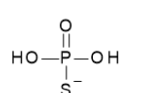
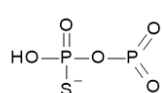
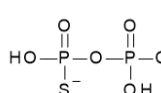
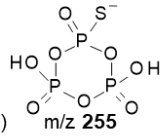
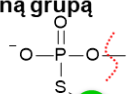
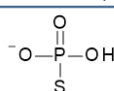
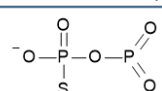
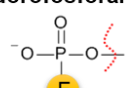
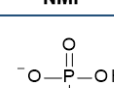
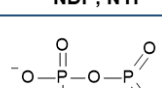
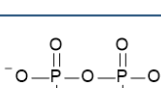
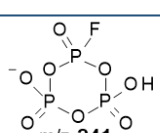
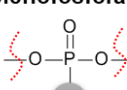
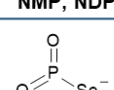
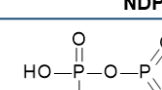
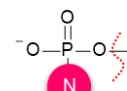
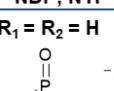
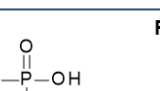
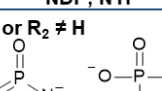
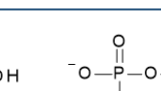
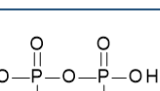
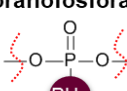
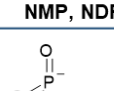
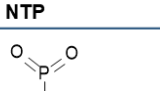
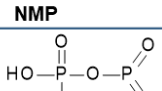
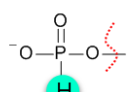
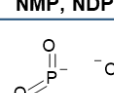
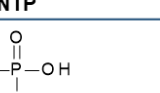
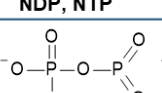
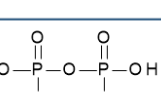
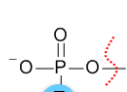
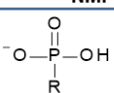
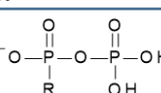
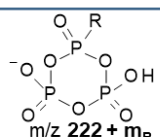
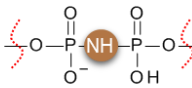
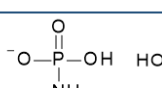
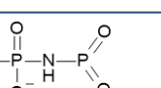
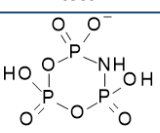
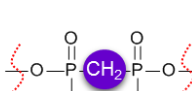
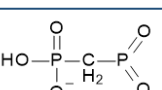
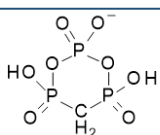
W tej części pracy zanalizowałam obszerną bibliotekę nukleotydów i ich analogów, a otrzymane widma MS/MS zdeponowałam w przygotowanej bazie danych *msTide*. Do najważniejszych wniosków tej części należą:

- widma MS/MS w trybie jonów ujemnych zawierają więcej sygnałów niż te zarejestrowane w trybie jonów dodatnich, przez co dostarczają więcej informacji strukturalnych,
- każde widmo ESI(-)/MS/MS zawiera trzy główne grupy sygnałów: sygnały pochodzące od zasady azotowej (średnia intensywność względem innych sygnałów), sygnały pochodzące od fosforanów (sygnały wykazujące najwyższą intensywność) i sygnały pochodzące od rybozofosforanów (sygnały o najmniejszej intensywności). Zestawienie charakterystycznych jonów fragmentacyjnych dla fosforanów jest przedstawione w Tabeli 1,
- intensywności poszczególnych sygnałów zależą od struktury nukleotydu, a nie zależą od warunków analizy, przy zastosowaniu tej samej metody jonizacji,
- ścieżki fragmentacji difosforanów nukleozydów są podobne do ścieżek fragmentacji dla monofosforanów z tą różnicą, że obserwuje się tutaj dodatkowe sygnały od DP i RbDP- H_2O , również proces odwodnienia zachodzi w nieco inny sposób,
- trifosforany nukleozydów charakteryzują się pojawieniem na widmie cyklicznego trifosforanu m/z 239. Jest to sygnał wyróżniający te związki. Przesunięcie tego sygnału świadczy o wprowadzeniu modyfikacji w obrębie fosforanu,
- wprowadzenie modyfikacji w obrębie nukleotydu powoduje przesunięcie tylko poszczególnych grup sygnałów, podczas gdy reszta pozostaje bez zmian,
- na podstawie widm fragmentacyjnych możliwe jest rozróżnienie związków strukturalnie podobnych takich jak izobary i izomery,
- obecność modyfikacji wpływa na ścieżki fragmentacji nukleotydów i zależy ona od labilności poszczególnych grup.

Prezentowane badania mogą być pomocne naukowcom zajmującym się analizą leków oraz proleków, oznaczaniem ilościowym naturalnie występujących modyfikacji w próbkach

biologicznych oraz odkrywaniem nowych modyfikowanych nukleotydów w organizmach żywych. Przygotowana baza danych została już wykorzystana do opracowania metod LC-MS/MS służących do badania metylowanych nukleozydów w próbkach moczu,²⁰⁵ identyfikacji produktów reakcji enzymatycznych zawierających grupy siarczanowe,²⁰⁶ identyfikacji produktów w procesie syntezy nukleotydów^{207, 208} oraz identyfikacji jonów podczas obrazowania za pomocą spektrometrii mas.²⁰⁹ Ponadto trwają prace w kierunku rozszerzenia bazy danych o dinukleotydy, zarówno naturalnie występujące jak i ich analogi.

Tabela 1. Modyfikacje tiofosforanu i charakterystyczne jony fragmentacyjne. Strzelecka et al., 2017.²⁰¹

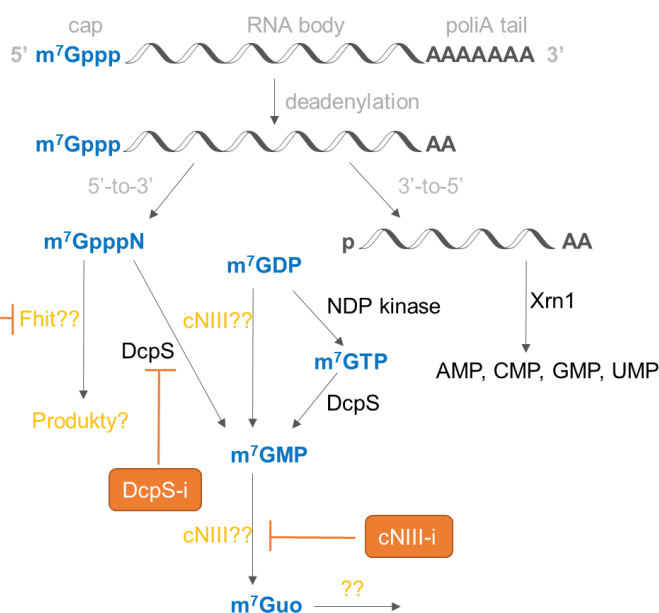
Fragment	Najbardziej charakterystyczne jony fragmentacyjne				
fosforan 	 m/z 79 NMP, NDP, NTP	 m/z 159 NDP, NTP	 m/z 177 NDP, NTP	 m/z 239 NTP	
tiofosforan 	 m/z 95 NMP, NDP, NTP	 m/z 113 NMP, NDP, NTP	 m/z 175 NDP, NTP	 m/z 193 (mała intensywność) NDP, NTP	 m/z 255 NTP
Tiofosforan z inną grupą 	 m/z 112 + mR NMP	 m/z 174 + mR NDP, NTP			
fluorofosforan 	 m/z 99 NMP, NDP, NTP	 m/z 161 NDP, NTP	 m/z 179 NDP, NTP	 m/z 241 NTP	
selenofosforan 	 m/z 143 NDP, NTP	 m/z 223 NDP, NTP			
amidofosforan 	$R_1 = R_2 = H$  m/z 78 NMP, NDP, NTP	$R_1 \text{ or } R_2 \neq H$  m/z 96 NMP, NDP, NTP	 m/z 77 + mR NMP	 m/z 95 + mR NDP, NTP	 m/z 157 + mR NDP, NTP
boranofosforan 	 m/z 63 NMP, NDP, NTP	 m/z 77 NMP, NDP, NTP	 m/z 157 NDP, NTP		
H-fosfonian 	 m/z 63 NMP	 m/z 81 NMP	 m/z 143 NDP	 m/z 161 NDP	
C-fosfonian 	 m/z 80 + mR NMP, NDP, NTP	 m/z 142 + mR NDP, NTP	 m/z 160 + mR NDP, NTP	 m/z 222 + mR NTP	
imidodifosforan 		 m/z 96 NDP, NTP	 m/z 158 NDP, NTP	 m/z 238 NTP	
metylenobisfosforan 		 m/z 157 NDP, NTP		 m/z 237 NTP	

5.4. Badanie degradacji końca 5' mRNA za pomocą spektrometrii mas

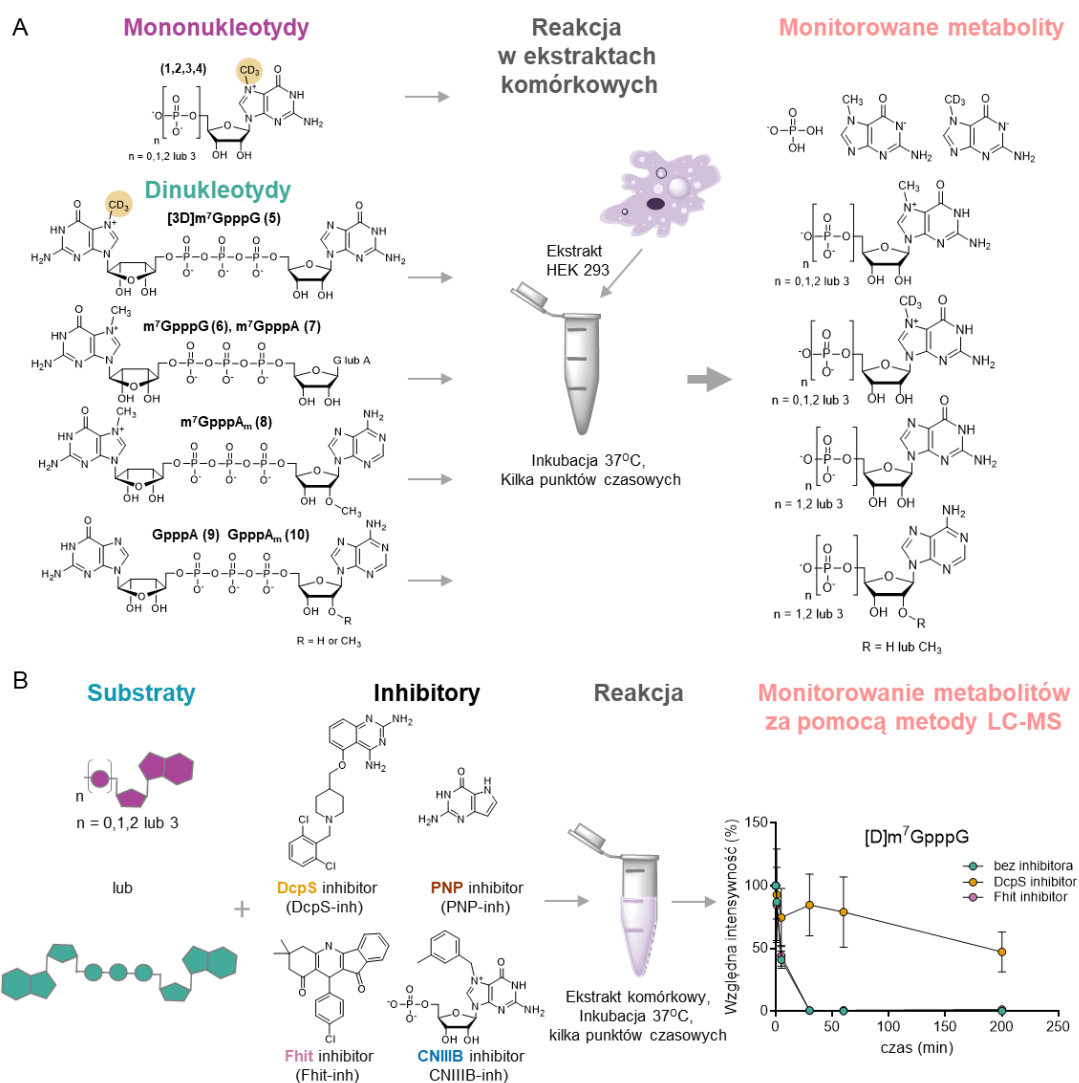
Oddziaływania białek wiążących kap są szeroko badane *in vitro*. Badane są zarówno kapy o strukturze występującej w naturze jak i syntetycznie, zmodyfikowane analogi kapu.²¹⁰ Prosty układ *in vitro* enzym-substrat nie odzwierciedla w pełni warunków panujących w komórkach, wpływu innych białek oraz czynników tam obecnych. Chociaż warunki eksperymentu *in vitro* są tak dobrane, żeby jak najbardziej odzwierciedlały warunki fizjologiczne, to jednak warunki panujące w komórce często są odmienne. Z kolei proces dostarczania nukleotydów do komórek nie jest zadaniem trywialnym. Biorąc pod uwagę powyższe trudności i ograniczenia eksperymentalne, optymalnym sposobem badania tych związków wydaje się być śledzenie ich metabolizmu w ekstraktach komórkowych, w których obecna jest większość składników komórki. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja metabolitów jak również sprawdzanie selektywności inhibitorów względem poszczególnych białek. Takie podejście wymaga jednak przygotowania metody pozwalającej na selektywne śledzenie takich procesów. W tej części projektu zaproponowałam metodę LC-MS/MS, która umożliwiła monitorowanie degradacji kapu i jego analogów w cytoplazmatycznym ekstrakcie z komórek HEK 293. Co więcej, możliwa była identyfikacja metabolitów badanych dinukleotydów. Użycie inhibitorów poszczególnych enzymów pozwoliło na zbadanie udziału w degradacji kapu białek takich jak DcpS, Fhit, cNIIIB oraz PNP.

5.4.1. Koncepcja badań i schemat eksperymentu

Proces degradacji kapu jest badany, ale wciąż pozostają pytania, na które należy znaleźć odpowiedź. Za degradację kapu odpowiedzialne są enzymy dekapujące w tym DcpS i Fhit^{72, 211} jednak względny udział tych enzymów w proces degradacji w komórkach nie jest znany. Co więcej, pojawia się pytanie jakie są metabolity tego procesu i jaki jest ich dalszy los. Wiadomo, że głównym produktem hydrolizy kapu przez DcpS jest m⁷GMP. W literaturze pokazano, że *in vitro* ulega on defosforylacji przez enzym cNIIIB, jednak fakt ten nie został jeszcze potwierdzony w komórkach. Nie wiadomo również, czy cNIIIB w komórkach jest zdolny do defosforylacji m⁷GDP (co również pokazano *in vitro*), a jeśli nie, to jakie są ścieżki jego degradacji. Na schemacie na [Rysunku 43](#) przedstawiono uproszczony schemat degradacji mRNA w szczególności kapu wraz z zaznaczonymi etapami, na które zwróciłam szczególną uwagę i starałam się je zbadać w niniejszym rozdziale. W celu odpowiedzi na pytania dotyczące degradacji kapu opracowałam metodę LC-MS/MS służącą do analizy końca 5' (kapu) mRNA w ekstraktach cytoplazmatycznych z komórek HEK. Opracowanie metody obejmowało syntezę kapu oraz potencjalnych metabolitów znakowanych stabilnymi izotopami wodoru w celu uniknięcia interferencji ze związkami naturalnie występującymi w ekstrakcie ([Rysunek 44](#)) oraz optymalizację warunków chromatograficznych, par MRM i parametrów źródła jonów. Metoda ta została użyta do śledzenia degradacji kapu i jego analogów, identyfikacji metabolitów i ich dalszej przemiany oraz wpływu inhibitorów białek zaangażowanych w degradację kapu (DcpS, PNP, Fhit, cNIIIB) na te procesy.



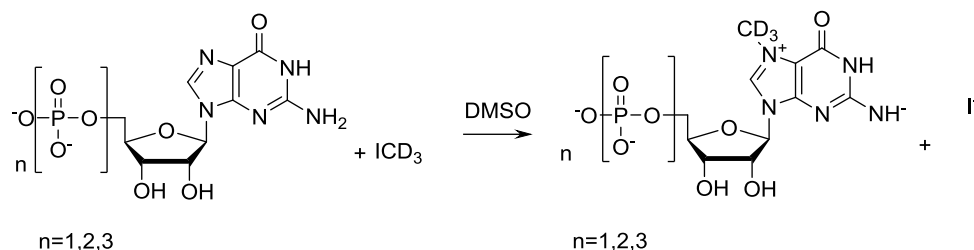
Rysunek 43. Uproszczony schemat degradacji mRNA ze szczególnym uwzględnieniem degradacji kapu. Na schemacie znakiem zapytania zostały zaznaczone kwestie badane w niniejszej pracy.



Rysunek 44. (A) Zestawienie związków, których metabolizm analizowany był w ekstraktach oraz poszukiwane potencjalne metabolity, (B) schemat eksperymentu.

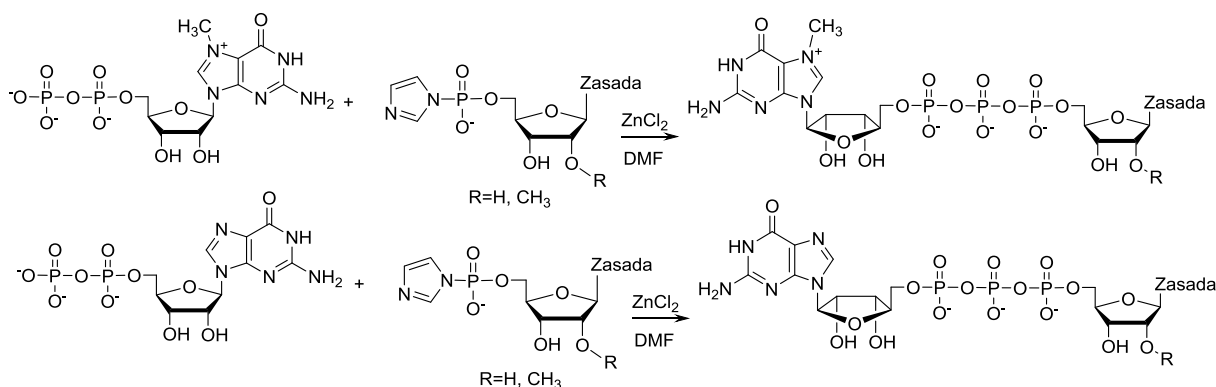
5.4.2. Synteza związków wzorcowych do analizy metabolizmu w ekstraktach

W celu uniknięcia interferencji z naturalnymi metabolitami mogącymi potencjalnie występować w ekstrakcie, zsyntetyzowałam związki znakowane deuterem. Pomogło to w selektywnym śledzeniu substratów i powstających metabolitów. Zestawienie związków otrzymanych w tym projekcie przedstawiłam na [Rysunku 44](#) w Panelu A. W celu otrzymania związku zawierającego deuter użyłam jodku metylu podstawionego trzema atomami deuteru zamiast wodoru. Reakcje prowadziłam w DMSO. Schemat syntezy dla mononukleotydów znajduje się na [Rysunku 45](#). Synteza przebiegała podobnie dla $[D_3]m^7GpppG$, jednak jako substrat do reakcji użyto GpppG.



Rysunek 45. Schemat syntezy otrzymywania mononukleotydów (2,3,4) znakowanych deuterem w pozycji N7-guaniny.

Po zbadaniu degradacji związków znakowanych deuterem okazało się, że w ekstrakcie można zaobserwować tylko metabolity tych związków, a metabolity nieznakowane nie pojawiają się w trakcie trwania reakcji. Co może oznaczać, że naturalnie występujących metabolitów jest zbyt mało i są one poniżej limitu detekcji stosowanej metody lub uległy one już całkowitej degradacji w komórkach. Dlatego też, nie było konieczności, aby pozostałe dinukleotydy, których degradację chciałam śledzić w ekstrakcie zawierały deuterowaną 7-metyloguaninę. Dinukleotydy otrzymałam w reakcji sprzęgania właściwych mononukleotydów w DMF w obecności ZnCl_2 . Reakcje przebiegały według schematu przedstawionego na [Rysunku 46](#). Szczegółowa synteza została opisana w Części eksperymentalnej.

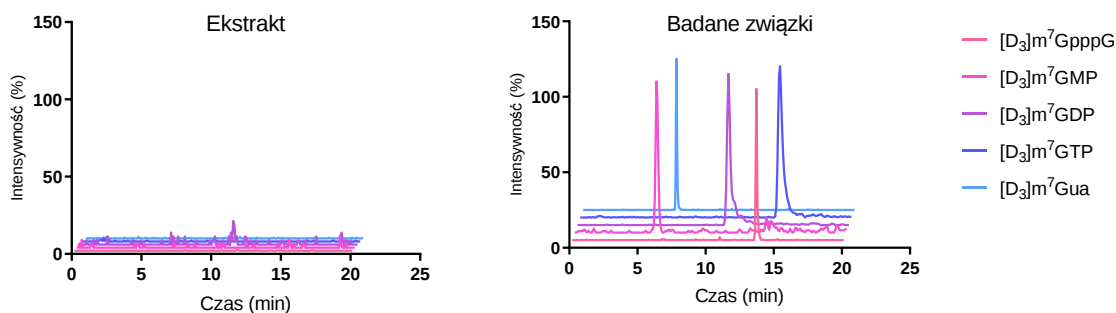


Rysunek 46. Schemat syntezy otrzymywania dinukleotydów (5-10) badanych w tej części projektu.

W kolejnej części projektu badałam metabolizm otrzymanych związków w ekstrakcie HEK 293, a także wpływ inhibitorów enzymów zaangażowanych w ich degradację.

5.4.3. Wybór warunków chromatograficznych, parametrów źródła jonów oraz par MRM

Budowa analogów kapu, a w szczególności ujemnie naładowane grupy fosforanowe i dodatnio naładowana reszta 7-metyloguaniny sprawiają, że rozdział tych analitów technikami chromatograficznymi, nie jest trywialny. Do analizy nukleotydów w tym projekcie próbowałam zastosować kilka różnych złóż między innymi *Porous Graphitic Carbon* (PGC),¹³⁵ *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC)²¹² oraz C-18 z użyciem buforów octanowych, metanolu lub acetonitrylu. Jednakże najlepszy kształt sygnału i rozdział analitów uzyskałam dzięki zastosowaniu kolumny *Eclipse XDB-C18* i par jonowych. Jako odczynnika do chromatografii par jonowych używałam dimetyloheksyloaminy (DMHA).³⁵ Rozdział badanych analitów został przedstawiony na [Rysunku 47](#), Panel B. W Panelu A przedstawiono poziom badanych analitów w czystym ekstrakcie. Widać, że w używanym ekstrakcie badane związki nie są obecne, dlatego można śledzić metabolizm wprowadzonych do ekstraktu związków bez interferencji z innymi. W pierwszej kolejności badałam metabolizm $[D_3]m^7GpppG$.

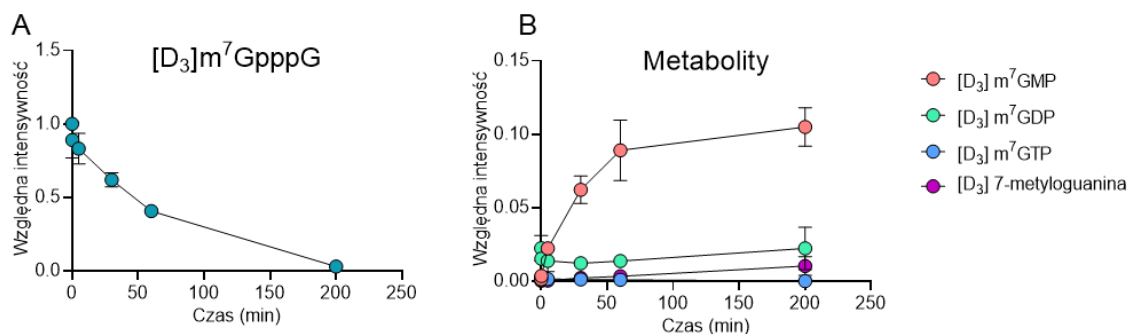


Rysunek 47. Chromatogramy wybranych analitów. (A) czysty ekstrakt oraz (B) po dodaniu badanych związków do ekstraktu.

5.4.4. Analiza metabolizmu $[D_3]m^7GpppG$ w ekstrakcie

Opracowane warunki wykorzystałam do śledzenia metabolizmu $[D_3]m^7GpppG$. Eksperyment polegał na dodaniu do ekstraktu $[D_3]m^7GpppG$, a następnie śledzeniu jego poziomu i poziomów jego potencjalnych metabolitów w różnych punktach czasowych. Podczas jednego eksperymentu monitorowałam zarówno zanik dodanego substratu jak i pojawianie się metabolitów. Wyniki zostały przedstawione na [Rysunku 48](#).

Wyniki uzyskane dla $[D_3]m^7GpppG$ wskazują, że w warunkach eksperymentu związek ten degradowe w ciągu 200 min, a jako główny produkt degradacji pojawia się m^7GMP , który początkowo się akumuluje. Poziom $[D_3]m^7GDP$ jest bardzo niski i praktycznie nie zmienia się podczas trwania reakcji. $[D_3]m^7GTP$ nie jest obserwowany. Natomiast sygnał od zasady – 7-metyloguaniny w początkowym etapie nie jest obserwowany, a po kilku minutach zaczyna się pojawiać. Z literatury wiadomo, że za degradację dinukleotydów odpowiada m.in. enzym DcpS, który hydrolizuje m^7GpppN między γ i β fosforanem uwalniając jako produkt m^7GMP .²¹¹



Rysunek 48. Analiza kapu i jego metabolitów w ekstrakcie HEK293 (stężenie ekstraktu 0,7 ml/ml). (A) degradacja $[D_3]m^7GpppG$, (B) przyrost wykrytych metabolitów. Pokazane dane są znormalizowane do najwyższego sygnału substratu, a pokazana wartość jest wartością średnią otrzymaną z trzech eksperymentów wraz z odchyleniem standardowym.

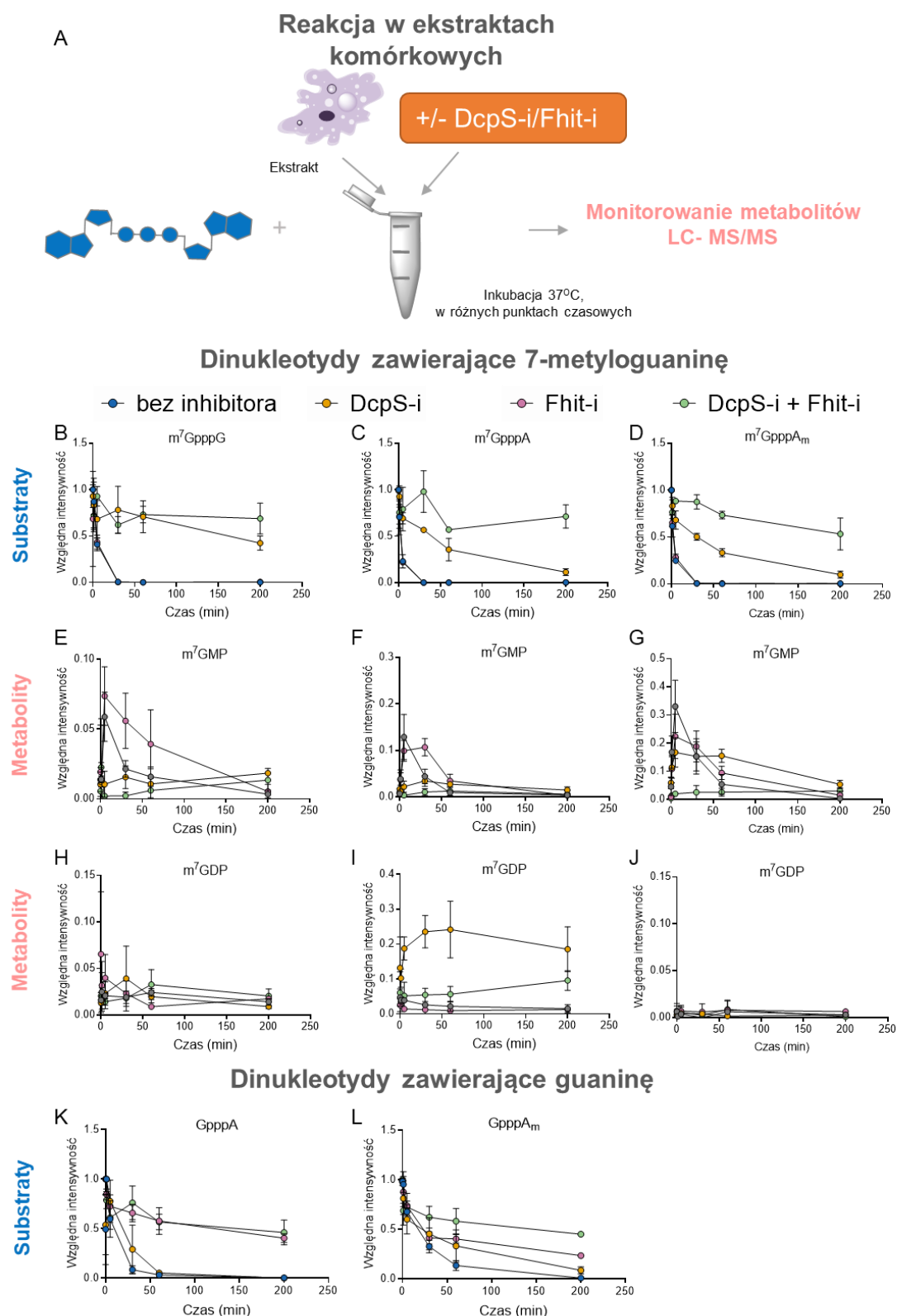
Dokładnie taki efekt udało mi się zaobserwować w wykonanym eksperymencie. Również enzym Fhit uważany jest za enzym dekapujący.⁷² Jednak wzajemny udział tych enzymów w degradacji kapu w komórkach nie został poznany. Pojawia się również pytanie, jaki wpływ na działanie tych enzymów, ma obecność pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Dlatego, też w kolejnej części projektu używając inhibitorów enzymów Fhit i DcpS i różnych analogów dinukleotydów, próbowałam zweryfikować zaangażowanie tych enzymów w degradację kapu. Następnie przyjrzałam się dalszym losom obserwowanych metabolitów.

5.4.5. Udział enzymów DcpS i Fhit w degradacji kapu

W celu ustalenia roli enzymów DcpS i Fhit, zaangażowanych w degradację kapu, przeprowadziłam eksperymenty z udziałem RG3039 - inhibitora DcpS, inhibitora Fhit oraz z mieszaniną tych inhibitorów. Do badania użyłam pięciu różnych dinukleotydów w celu zweryfikowania jak zasada pierwszego transkrybowanego nukleotydu wpływa na powinowactwo do enzymów oraz czy dinukleotydy nie zawierające 7-metyloguaniny mogą być substratami dla tych enzymów. Do badania wzięłam 10 razy bardziej stężony ekstrakt niż w przypadku eksperymentu z $[D_3]m^7GpppG$ (Rysunek 48), w celu zaobserwowania lepszego efektu inhibicji. Wyniki zostały przedstawione na Rysunku 49.

m^7GpppG dodany do ekstraktu ulega szybkiej degradacji. Dodanie inhibitora Fhit nie wpływa na przebieg reakcji. Głównym produktem w obydwu przypadkach jest m^7GMP , który początkowo się akumuluje, a następnie sam ulega degradacji. Po dodaniu inhibitora DcpS lub mieszaniny inhibitorów Fhit i DcpS widać znaczne spowolnienie reakcji. W tym przypadku poziom obserwowanych metabolitów jest mniejszy, co jest związane ze spowolnieniem reakcji.

W przypadku m^7GpppA użycie RG3039 ma mniejszy wpływ na szybkość reakcji niż w przypadku m^7GpppG . Reakcja zostaje zahamowana znacząco, kiedy użyta została mieszanina inhibitorów DcpS i Fhit, co może sugerować, że oprócz DcpS również Fhit bierze udział w degradacji tego związku. Uwagę przykuwa również fakt, że w reakcji z inhibitorem DcpS, pojawia się znacznie więcej m^7GDP niż w reakcji bez inhibitora lub w reakcji z mieszaniną inhibitorów. Sugeruje to, że hydroliza badanego związku zachodzi w innym miejscu niż w przypadku cięcia przez DcpS, co wskazuje na aktywność enzymu Fhit. Dodanie inhibitorów DcpS, Fhit lub mieszaniny tych inhibitorów do reakcji z m^7GpppA_m wpływa na jego metabolizm podobnie jak na m^7GpppA .



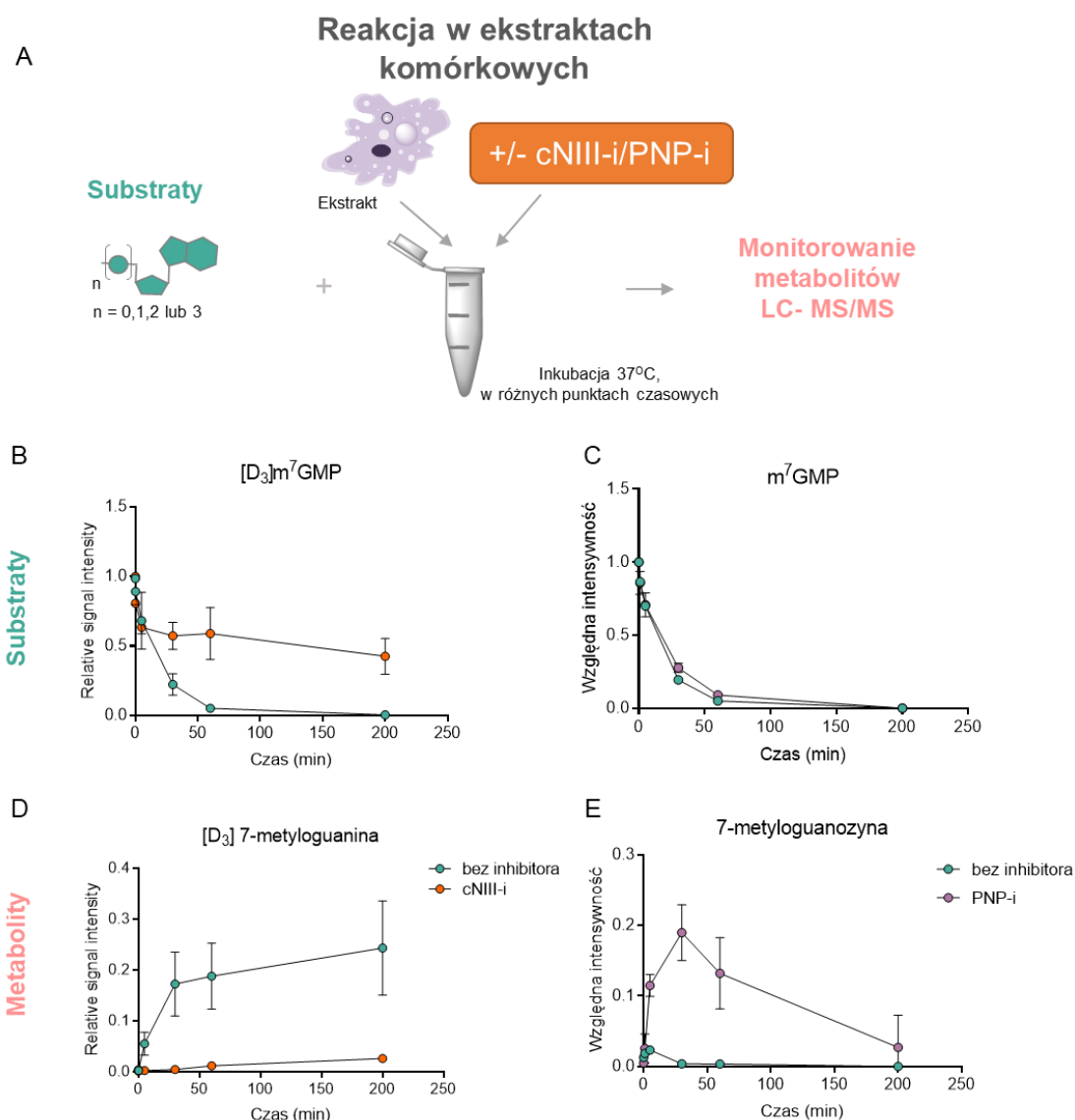
Rysunek 49. Degradacja dinukleotydów w cytoplazmatycznym ekstrakcie z komórek HEK293 (stężenie ekstraktu 7,0 ml/ml). (A) Schemat eksperymentu: wybrany dinukleotyd dodawany był do ekstraktu z inhibitorem lub bez. Reakcja była monitorowana w różnych punktach czasowych. Pokazane dane są znormalizowane do najwyższego sygnału substratu, a pokazana wartość jest wartością średnią otrzymaną z trzech eksperymentów wraz z odchyleniem standardowym. (B - J) Metabolizm dinukleotydów zawierających 7-metyloguaninę oraz wpływ inhibitorów DcpS i Fhit na ich metabolizm. (K,L) Metabolizm dinukleotydów zawierających guaninę oraz wpływ inhibitorów DcpS i Fhit na ich (metabolity nie zostały zaprezentowane, ponieważ ich poziom w ekstrakcie od początku jest bardzo wysoki i nie można zaobserwować zmian w ich stężeniu po dodaniu badanych nukleotydów).

Jednak w tym przypadku zawsze głównym produktem jaki obserwowałam był m^7GMP . Może to sugerować, że grupa metylowa blokuje hydrolizę od strony 2'-O-metyloadenozyny, dlatego m^7GDP nie jest obserwowany jako produkt. Otrzymane wyniki inhibicji oraz zwiększenie poziomu m^7GDP w przypadku degradacji m^7GpppA sugerują, że głównym enzymem zaangażowanym w degradację kapu jest DcpS. W przypadku, kiedy DcpS jest zahamowany rolę enzymu dekapującego przejmują Fhit. Nasuwa się pytanie dlaczego komórki mogły wykształcić taki mechanizm, dlatego następnie testowałam metabolizm dinukleotydów nie zawierających 7-metyloguaniny (K,L; [Rysunek 49](#)). Takie związki mogą pojawiać się w komórkach, jako efekt nieprawidłowego kapowania mRNA.²¹³ Zaobserwowałam, że inhibitor Fhit spowalnia degradację $GpppA$ oraz $GpppA_m$. Użycie inhibitora DcpS wpływa tylko na degradację $GpppA_m$. Wyniki sugerują, że $GpppA$ jest substratem tylko dla Fhit, a $GpppA_m$ może być substratem zarówno dla Fhit jak i DcpS.

Analiza dinukleotydów w ekstraktach cytoplazmatycznych z linii komórkowej HEK 293, pokazałam, że głównym enzymem zaangażowanym w degradację metylowanych dinukleotydów jest enzym DcpS. Enzym Fhit pełni rolę drugorzędną i działa jak enzym „zapasowy”, w szczególności, kiedy działanie DcpS jest niemożliwe. Dalsze badania prowadziłam w kierunku poznania ścieżek degradacji poszczególnych metabolitów kapu.

5.4.6. Wpływ inhibitorów cNIIIB na degradację $[D_3]m^7GMP$

W eksperymentach z dinukleotydami, jako główny produkt ich metabolizmu, obserwowałam m^7GMP . Związek ten początkowo akumulował się, a następnie sam ulegał degradacji, dlatego chciałam sprawdzić jaki enzym może za to odpowiadać. W literaturze został opisany enzym cNIIIB, który *in vitro* bierze udział w defosforylacji m^7GMP .^{97, 214} W celu zbadania czy enzym ten może fosforylować m^7GMP także w cytoplazmatycznych lizatach z komórek HEK293 do lizatu dodałam $[D_3]m^7GMP$ wraz z inhibitorem cNIIIB - 3-MeBn m^7GMP . Podczas eksperymentu obserwowałam znaczną inhibicję degradacji $[D_3]m^7GMP$ ([B; Rysunek 50](#)). Spodziewanym produktem defosforylacji jest nukleozyd 7-metyloguanozyna. Jednak w eksperymencie jako główny produkt degradacji $[D_3]m^7GMP$ obserwowałam $[D_3]7$ -metyloguaninę. Może to oznaczać, że (i) w ekstrakcie degradacja $[D_3]m^7GMP$ zachodzi inną ścieżką i nukleozyd nie powstaje lub (ii) nukleozyd powstaje, ale jest bardzo szybko degradowany do 7-metyloguaniny. W celu zweryfikowania tych hipotez do ekstraktu dodałam m^7GMP oraz inhibitor PNP. Enzym PNP katalizuje reakcje depurynacji nukleozydów w obecności fosforanu dając jako produkty zasadę azotową i rybozofosforan.²¹⁵ Inhibicja tego enzymu zahamowałaby reakcję depurynacji, przez co możliwa byłaby obserwacja 7-metyloguanozyny. Wyniki eksperymentu zostały przedstawione na [Rysunku 50](#). Degradacja m^7GMP przebiega z utworzeniem 7-metyloguanozyny, która jest następnie bardzo szybko degradowana z utworzeniem 7-metyloguaniny. Enzymem odpowiedzialnym za degradację 7-metyloguanozyny do 7-metyloguaniny jest prawdopodobnie PNP, co sugeruje, że drugim produktem degradacji 7-metyloguanozyny jest 1-rybozofosforan, jednak nie udało się zidentyfikować go podczas eksperymentu.



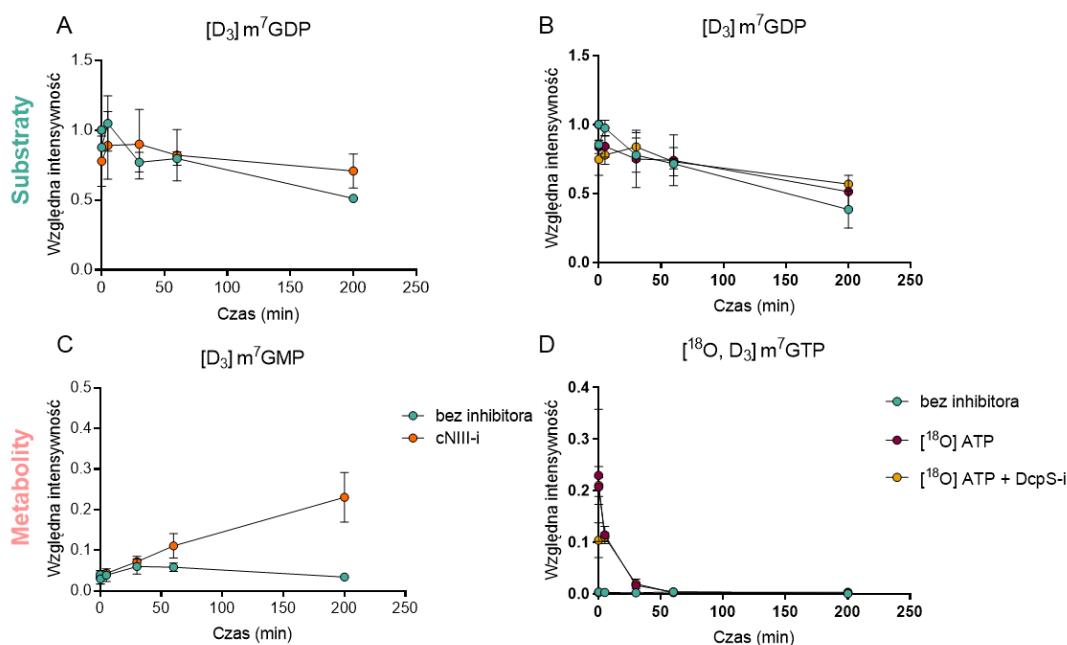
Rysunek 50. Wpływ inhibitorów cNIIIB na degradację m⁷GMP. (A) schemat eksperymentu, (B,D) degradację m⁷GMP oraz wpływ inhibitora cNIIIB na degradację m⁷GMP i pojawienie się metabolitów, (C,E) wpływ inhibitora PNP na degradację m⁷GMP i pojawienie się metabolitów. Stężenie ekstraktu HEK 293: 7,0 ml/ml.

5.4.7. Badanie metabolizmu m⁷GDP i m⁷GTP z użyciem potencjalnych inhibitorów białek zaangażowanych w ich degradację

cNIIIB in vitro może brać również udział w degradacji m⁷GDP.^{73, 214} Dlatego też postanowiłam zweryfikować, czy m⁷GDP jest podatny na hydrolizę przez cNIIIB w komórkowych ekstraktach cytoplazmatycznych. W tym celu do ekstraktu dodałam [D₃]m⁷GDP i inhibitor cNIIIB. Względną zawartość substratu oraz potencjalne produkty monitorowałam w czasie metodą LC-MS. Wyniki zostały przedstawione na Rysunku 51. W badanym ekstrakcie nie zaobserwowałam znaczącego wpływu inhibitora cNIIIB na metabolizm [D₃]m⁷GDP, a jedynie stabilizację powstającego w niewielkiej ilości m⁷GMP. Degradacja m⁷GDP przebiegała w analizowanych warunkach bardzo wolno i być może dlatego nie widać znaczącego wpływu inhibitora na jej przebieg lub enzym cNIIIB nie uczestniczy w ekstrakcie w metabolizmie m⁷GDP.

Degradacja m^7GDP może również przebiegać poprzez fosforylację do m^7GTP , a następnie hydrolizę przez DcpS z uwolnieniem m^7GMP .⁷² W warunkach eksperymentu praktycznie nie zidentyfikowałam m^7GTP jako produktu fosforylacji m^7GDP .

Może być to wynikiem tego, że m^7GTP jest bardzo szybko degradowany przez DcpS, gdyż DcpS jest również enzymem zaangażowanym w degradację m^7GTP .⁶⁹ Druga hipoteza zakładała, że w próbce nie ma wystarczającej ilości ATP do przeprowadzenia fosforylacji. W celu zweryfikowania tych hipotez przeprowadziłam następujące eksperymenty: inkubację m^7GDP w ekstrakcie z dodatkiem ATP znakowanego tlenem 18 na γ fosforanie oraz inkubację m^7GDP w ekstrakcie z dodatkiem ATP znakowanego tlenem 18 na γ fosforanie oraz inhibitorem DcpS. Wyniki zostały przedstawione na [Rysunku 51](#). Dodatek jakiegokolwiek z wyżej wymienionych składników nie wpłynął na szybkość degradacji m^7GDP . Jednak zaobserwowałam sygnał pochodzący od m^7GTP , którego para MRM odpowiadała analitowi zawierającemu deuter w grupie metylowej zasady azotowej oraz tlen 18 w obrębie fosforanu. Sugeruje to, że reszta fosforanowa znakowana tlenem 18 została przeniesiona na $[D_3]m^7GDP$ tworząc $[D_3, ^{18}O] m^7GTP$, prawdopodobnie z udziałem kinaz.^{70, 216} Poziom $[D_3, ^{18}O] m^7GTP$ spada wraz z upływem czasu i nawet po dodaniu inhibitora DcpS nie obserwowałam zahamowania degradacji. Może to świadczyć o tym, że DcpS nie jest głównym enzymem zaangażowanym w degradację m^7GTP , a w ekstrakcie obecny jest inny enzym, który powoduje rozkład tego nukleotydu. Zagadnienie to wymaga przeprowadzenia dalszych badań, które nie wchodzą w zakres niniejszej pracy.



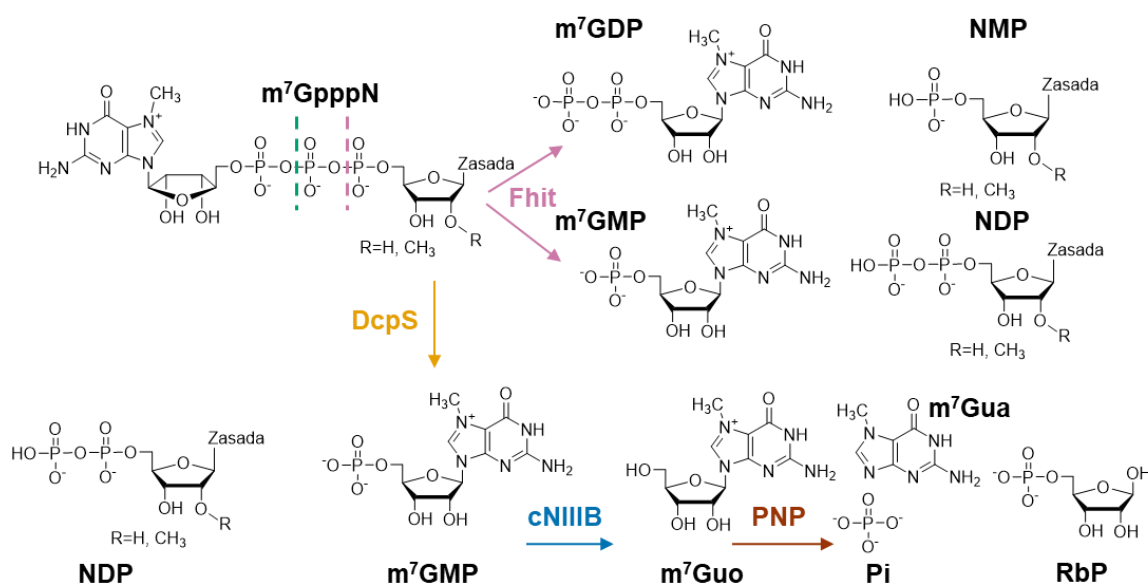
Rysunek 51. Analiza m^7GDP w ekstrakcie z dodatkiem różnych czynników. (A, C) wpływ inhibitora cNIIIB na degradację m^7GDP , (B, D) wpływ obecności $[^{18}O]$ ATP na pojawienie się metabolitów m^7GTP , jako metabolitu m^7GDP . Stężenie ekstraktu HEK 293: 7,0 ml/ml.

5.4.8. Podsumowanie rozdziału i najważniejsze wnioski

Zaprojektowana przeze mnie metoda LC-MS/MS pozwoliła na śledzenie degradacji kapu i jego analogów dodanych do ekstraktu komórkowego HEK 293. Zaobserwowałam, że

dinukleotydy w ekstrakcie ulegają szybkiej degradacji. W celu zweryfikowania udziału DcpS i Fhit w degradacji kapu użyłam inhibitorów tych enzymów. Wyniki pokazały, że DcpS jest głównym enzymem zaangażowanym w degradację kapu. Fhit również może katalizować degradację kapu, ale głównie wtedy, kiedy aktywność DcpS jest zahamowana. Głównym metabolitem powstającym wyniku degradacji kapu jaki obserwowałam był m^7 GMP, który początkowo ulegał akumulacji, a następnie degradacji. Enzymem zdolnym do defosforylacji m^7 GMP *in vitro* jest cNIIIB. W moich eksperymentach chciałam zweryfikować czy degradacja m^7 GMP przy udziale tego enzymu ma miejsce w ekstraktach komórkowych. W tym celu użyłam inhibitora cNIIIB i po jego dodaniu do ekstraktu obserwowałam zahamowanie degradacji m^7 GMP. Jednakże, nieoczekiwanie głównym metabolitem obserwowanym w procesie degradacji m^7 GMP była 7-metyloguanina, natomiast podczas degradacji w standardowych warunkach nie obserwowałam 7-metyloguanozyny, która jest postulowanym produktem reakcji katalizowanej przez cNIIIB. Powstawanie 7-metyloguanozyny jako produktu pośredniego zaobserwowałam jednak po dodaniu do ekstraktu 9-deazaguaniny, która jest inhibitorem enzymu PNP. Sugeruje to, że depurynacja 7-metyloguanozyny bardzo wydajnie katalizowana jest przez ten enzym, a dodanie inhibitora spowolniło reakcję depurynacji do tego stopnia, że możliwe stało się wykrycie tego związku.

Jako efekt projektu zaproponowałam ścieżkę degradacji kapu, gdzie głównym enzymem hydrolizującym m^7 GpppN jest DcpS. Jako produkt powstaje m^7 GMP, który jest dalej degradowany przez cNIIIB do 7-metyloguanozyny. Ta następnie ulega depurynacji i jako końcowy produkt degradacji kapu powstaje 7-metyloguanina, która może być wydala z organizmu ([Rysunek 52](#)). Badania wykonane w ekstrakcie HEK293 pokazują, że m^7 GDP może być w obecności ATP fosforylowane do m^7 GTP, ale degraduje on bardzo szybko, dlatego proces ten wymaga dalszej weryfikacji. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego poznania procesu degradacji mRNA, a tym samym do bardziej świadomego i racjonalnego projektowania analogów nukleotydów o znaczeniu biologicznym lub terapeutycznym.



Rysunek 52. Ścieżki degradacji kapu na podstawie otrzymanych wyników badań.

5.5. Analiza narzędzi molekularnych do badań komórkowych i zastosowań terapeutycznych

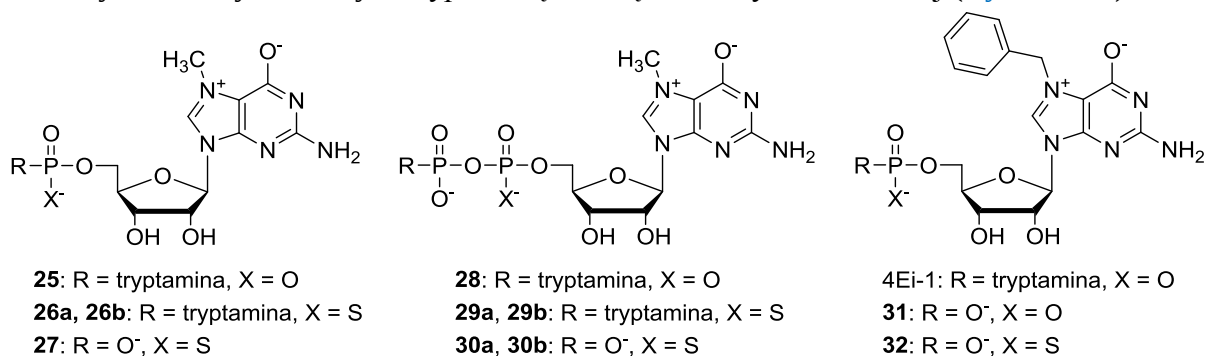
Wiedza zdobyta podczas analizy fragmentacji nukleotydów i metabolizmu kapu posłużyła do rozwiązania innych zagadnień związanych z analizą nukleotydów. W opisanym wyżej projekcie została opracowana metoda do badania naturalnych struktur kapu, następnie zaadaptowałam te metody do badania metabolizmu modyfikowanych analogów nukleotydów o znaczeniu terapeutycznym oraz nukleotydowych sond molekularnych. W kolejnych rozdziałach przedstawiłam monitorowanie w ekstrakcie komórkowym degradacji analogów nukleotydów z przyłączoną tryptaminą, które są potencjalnymi prolekami i mogą służyć jako inhibitory translacji. Co więcej, zweryfikowałam przebieg reakcji enzymatycznej z użyciem nukleotydowych sond fluorescencyjnych, które są potencjalnym narzędziem do śledzenia procesów komórkowych.

5.5.1. Analiza pronukleotydów w ekstraktach komórkowych

Chociaż nukleotydy i ich pochodne wykazują duży potencjał terapeutyczny to czynnikiem limitującym zastosowanie ich, jako leków jest problem niskiej przenikalności do komórek. Wynika to z wysokiej polarności tych związków oraz ujemnego ładunku w pH fizjologicznym. Obiecującym podejściem do rozwiązania tego problemu wydaje się być modyfikowanie aktywnej formy analogu nukleotydu i dostarczanie go do komórki w postaci pronukleotydu.²¹⁷ Przykładem takiej modyfikacji jest wprowadzenie tryptaminy w obręb fosforanu, która zmniejsza polarność nukleotydu i ułatwia dostanie się związku do komórki.

Jednym z pronukleotydów z przyłączoną tryptaminą w obrębie reszty fosforanowej, który opisany został w literaturze i z powodzeniem dostarczony do komórki jest monofosforan 7-benyloguanozyny (bn⁷GMP), który jest syntetycznym analogiem kapu.²¹⁷ Wprowadzanie do komórek syntetycznych analogów kapu może mieć działanie terapeutyczne, ponieważ mają one zdolność wiązania się z białkiem eIF4E. Nadekspresja tego białka jest obserwowana w komórkach nowotworowych, co powoduje zaburzenia w komórkowych mechanizmach kontroli translacji.²¹⁸ Małocząsteczkowe analogi kapu mogą przeciwdziałać nadekspresji eIF4E i przez to działać przeciwnowotworowo.

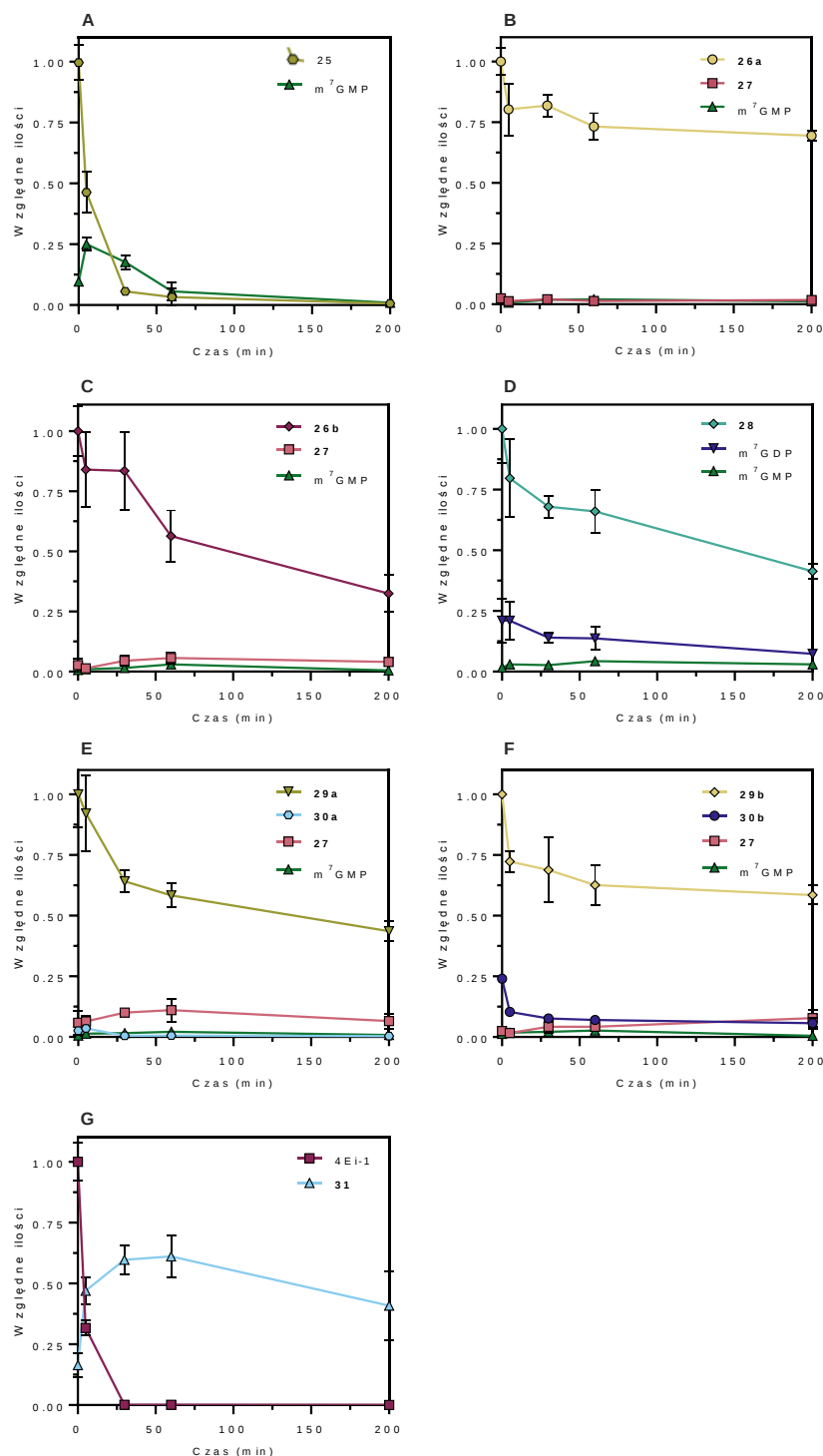
W pracy Gołojuch et al., 2020²¹⁹ otrzymano i badano właściwości 6 nowych nukleotydów modyfikowanych tryptaminą w obrębie reszty fosforanowej ([Rysunek 53](#)).



Rysunek 53. Struktury związków, których metabolizm badany był w opisywanym projekcie. Związki zostały zsyntetyzowane przez Sebastiana Gołojucha.²¹⁹

Nowe pronukleotydy oraz ich aktywne formy były charakteryzowane z użyciem szeregu metod biochemicznych i biofizycznych w celu wyznaczenia ich powinowactwa do białka eIF4E, ich zdolności inhibicji translacji, podatności na degradację enzymatyczną katalizowaną przez enzym DcpS. Natomiast opracowana przeze mnie metoda LC-MS/MS miała na celu umożliwienie monitorowania metabolizmu tych związków w ekstraktach komórkowych.

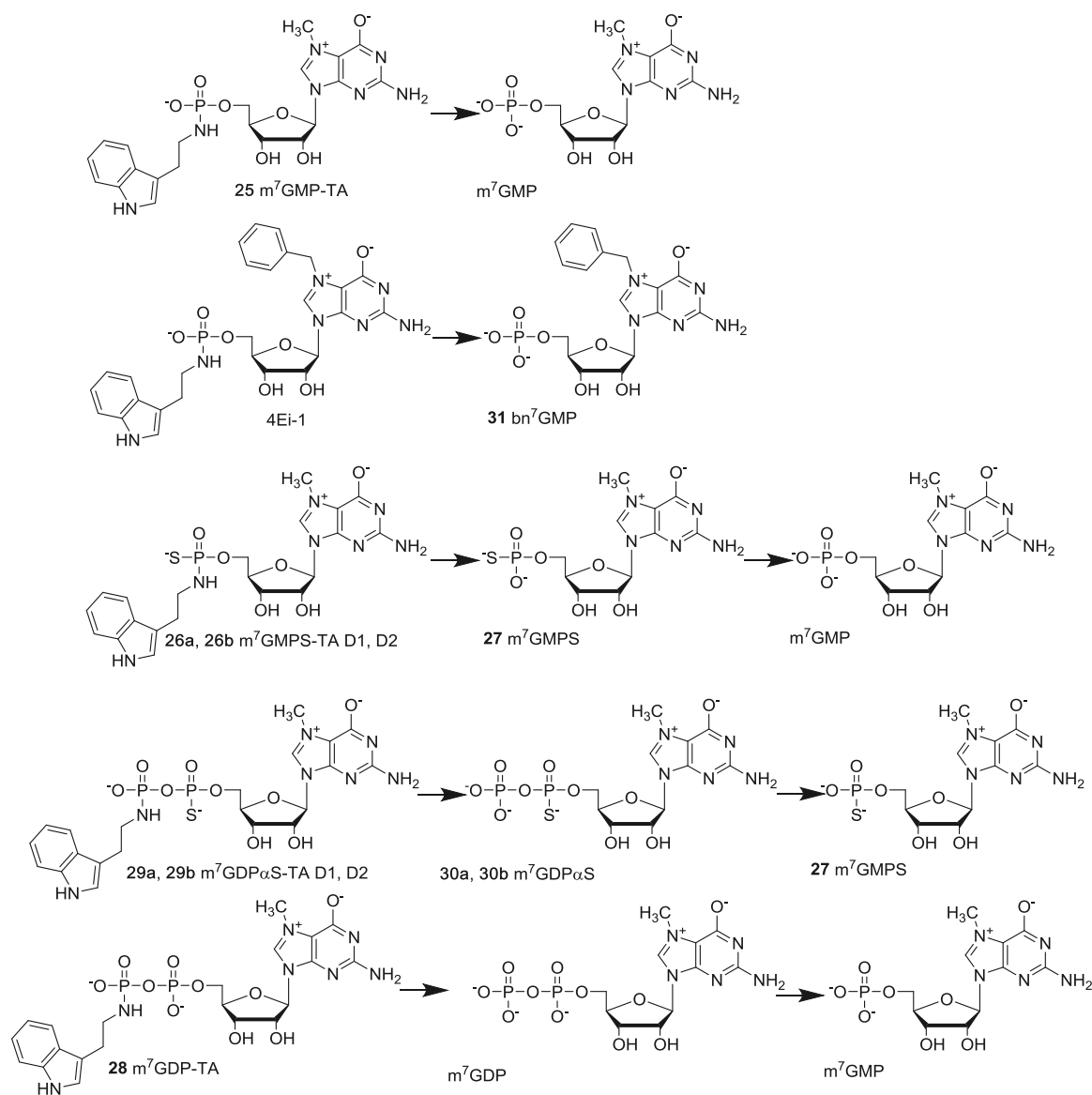
W celu analizy metabolizmu pronukleotydów **25, 26a, 26b, 28, 29a, 29b** i 4Ei-1 związki inkubowano w ekstrakcie komórkowym HEK 293 i analizowano próbki metodą LC-MS/MS w różnych punktach czasowych w celu wyznaczenia ilości przereagowanego substratu i zidentyfikowania powstających metabolitów. Związki te są pronukleotydami zawierającymi tryptaminę, dlatego też spodziewałam się, że po dodaniu do substratu zostaną one przekształcone do nukleotydów. W eksperymencie monitorowałam ilości substratów oraz metabolity takie jak: m⁷GMP, m⁷GDP oraz ich analogi zawierające tiofosforan. Degradacja poszczególnych pronukleotydów oraz pojawiające się metabolity znajdują się na wykresach na [Rysunku 54](#). Spektrometria mas nie pozwala bezpośrednio wyznaczyć ilości badanych metabolitów. Dlatego też, przygotowałam krzywe kalibracyjne, aby móc porównać ilości pojawiających się metabolitów dla różnych pronukleotydów. [Rysunek 54](#) przedstawia względne ilości substratów i metabolitów obliczone na podstawie krzywych kalibracyjnych.



Rysunek 54. Metabolizm pochodnych tryptaminowych nukleotydów (struktury - Rysunek 53) w ekstrakcie z komórek HEK 293 monitorowany metodą LC-MS/MS (A) Związek 25 i metabolity m^7 GMP; (B) Związek 26a i metabolity: 27 (m^7 GMPs) i m^7 GMP; (C) Związek 26b i metabolity: 27 i m^7 GMP; (D) Związek 28 i metabolity: m^7 GDP i m^7 GMP; (E) Związek 29a i metabolity: 30a (m^7 GDPaS D1), 27 i m^7 GMP; (F) Związek 29b i metabolity: 30b (m^7 GDPaS D2), 27 i m^7 GMP; (G) Związek referencyjny 4Ei-1 i metabolity – 31 (bn^7 GMP). Gołojuch *et al.*, 2020.²¹⁹

Zgodnie doniesieniami literaturowymi, wiązanie P-N w związku 4Ei-1 ulega szybkiej hydrolizie z uwolnieniem związku 31. Związek 31 jest stabilny i ulega akumulacji w czasie proporcjonalnie do zaniku 4Ei-1. Związek 25 także ulega szybkiej degradacji uwalniając m^7 GMP (Rysunek 55). Jednakże zgodnie z tym, co pokazałam wcześniej m^7 GMP jest w

ekstrakcie niestabilny i ulega dalszej degradacji. Związki **26a** i **26b** były degradowane dużo wolniej niż 4Ei-1 i związek **25** (Rysunek 55), jednakże **26b** metabolizuje szybciej niż **26a**. Początkowym produktem degradacji **26b** był związek **27** (m^7 GMPS), czyli oczekiwany metabolit, a jako produkt jego degradacji został wykryty m^7 GMP, który następnie ulegał dalszej degradacji. W literaturze opisano, że enzym HINT1, który odpowiada za hydrolizę wiązania fosforamidowego w nukleotydach jest także odpowiedzialny za wewnątrzkomórkową konwersję 5'-monotiofosforanów nukleozydów do 5'-monofosforanów.²²⁰



Rysunek 55. Ścieżki degradacji pronukleotydów w ekstraktach HEK 293. Gołojuch et al., 2020.²¹⁹

Dlatego też jest bardzo prawdopodobne, że enzym HINT1 jest odpowiedzialny za konwersję **27** do m^7 GMP jak również hydrolizę wiązania P-N w związku **26a**. Związek **28** ulegał degradacji podobnie do związku **26b** uwalniając m^7 GDP i m^7 GMP jako metabolity. m^7 GDP był też obserwowany w próbce kontrolnej - w czasie 0 min, co może wskazywać na to, że związek ten pochodzi z chemicznej degradacji **28**. Modyfikacja α -tiofosforanowa tylko nieznacznie stabilizuje związki **29a** i **29b**, ale różnią się metabolitami, które uwalniają. W przypadku związku **29a** obserwowanym metabolitem był **27**, a w przypadku związku **29b**

obecność **30** była także obserwowana. Prawdopodobnie jest to wynik degradacji chemicznej, podobnie jak dla związku **28**.

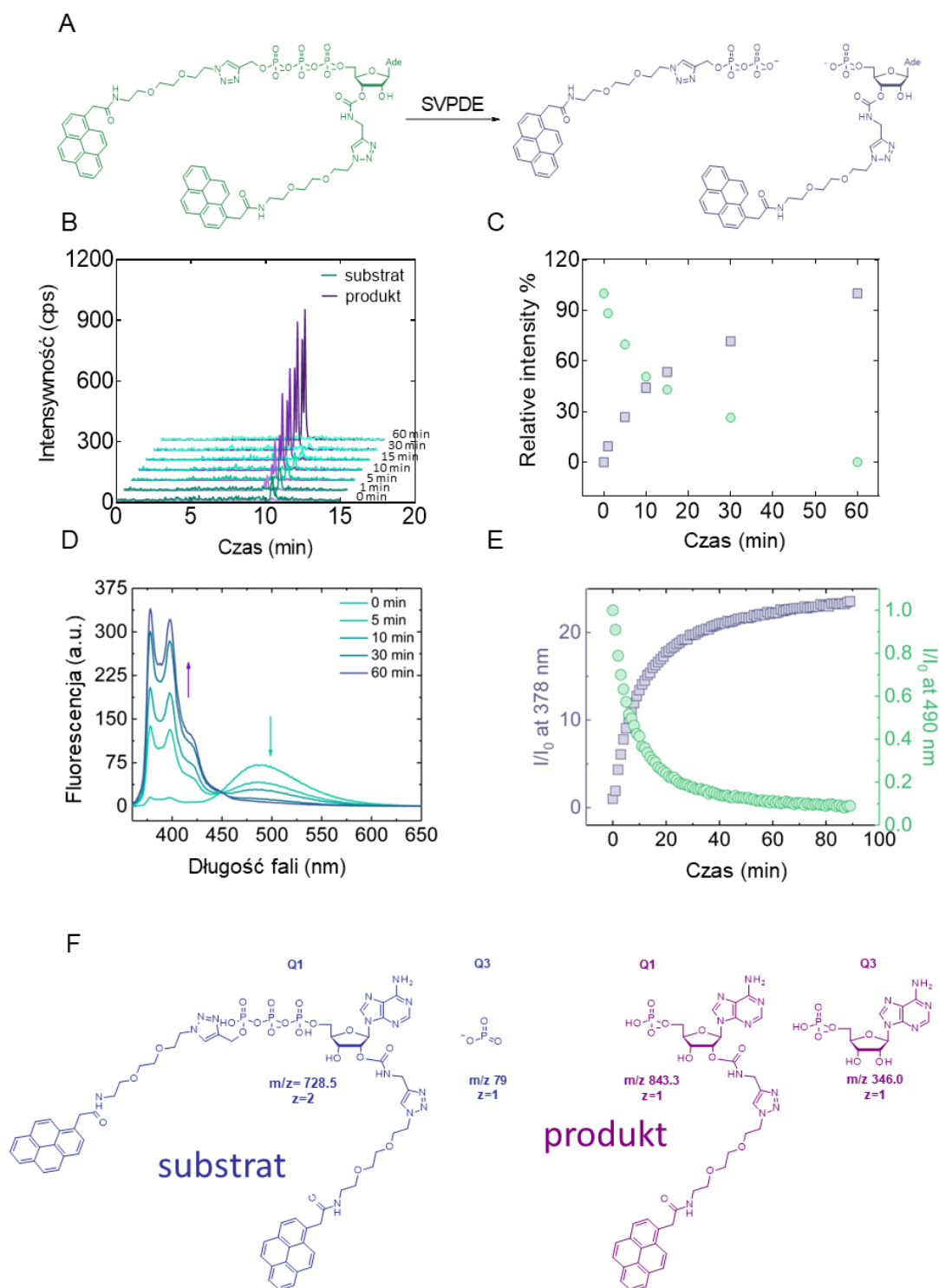
Otrzymane wyniki wskazują, że wszystkie badane związki metabolizują wolniej niż 4Ei-1, ale wykazują stały poziom m^7 GMPS jako głównego metabolitu. m^7 GMPS ma zdolność wiązania się do eIF4E, przez co może przyczyniać się do inhibicji translacji, a pronukleotydy go uwalniające mogą stać się potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi. Niemodyfikowane pronukleotydy uwalniają m^7 GMP, który ulega dalszej degradacji w przeciwieństwie do bn^7 GMP uwalnianego z 4Ei-1.

Otrzymane wyniki sugerują, że związki zawierające resztę tiofosforanową mogą działać jako pronukleotydy, które uwalniają m^7 GMPS. Badania biofizyczne oraz in vitro wykazały, że m^7 GMPS ma większą zdolność inhibicji translacji niż bn^7 GMP.⁸⁴ Testowane związki są więc obiecującymi kandydatami do dalszych badań.

5.5.2. Monitorowanie postępu degradacji fluorescencyjnych sond molekularnych

Wyniki badań analogów nukleotydów pomogły mi w zaprojektowaniu metod LC-MS/MS do analizy fluorescencyjnych sond nukleotydowych będących cennymi narzędziami biomolekularnymi. Struktura jednej z sond została przedstawiona na [Rysunku 56](#). Związek ten jest sondą fluorescencyjną, której właściwości emisyjne zmieniają się pod wpływem hydrolizy enzymatycznej (zanika fluorescencja ekscymerowa, pojawia się monomerowa) co można wykorzystać do śledzenia aktywności enzymatycznej.²²¹ Moim zadaniem w tym projekcie była niezależna weryfikacja, czy obserwowane zmiany fluorescencji sondy rzeczywiście wynikają z postępu degradacji enzymatycznej, a nie np. agregacji sondy, fotobłaknięcia znacznika fluorescencyjnego w warunkach eksperymentu, czy innych przypadkowych reakcji niespecyficznej (chemicznej) degradacji sondy. W tym celu zaprojektowałam metodę LC-MS/MS, która pozwoliła na monitorowanie w mieszaninie reakcyjnej substratu oraz oczekiwanych produktów specyficznej degradacji przez enzym SVPDE. Oczekiwany produktami był monofosforan adenozyne ze znacznikiem w obrębie rybozy oraz difosforan ze znacznikiem. Badane związki ze względu na obecności znaczników były mniej polarne niż dotychczas analizowane związki nukleotydowe. Dlatego też, musiałam zoptymalizować warunki chromatograficzne i jako buforów do fazy ruchomej użyłam buforów octanowych i acetonitrylu. Wybrałam pary MRM w taki sposób, aby efektywnie monitorować substrat i dwa oczekiwane produkty. Sygnał pochodzący od difosforanu ze znacznikiem był dość szeroki i rozmyty, dlatego w celu monitorowania postępu reakcji skupiłam się na analizie sygnału pochodzącego od monofosforanu adenozyne ze znacznikiem. Na [Rysunku 56](#) przedstawiono porównanie krzywych postępu reakcji uzyskanych poprzez zmianę fluorescencji ekscymerowej i monomerowej oraz opracowaną przeze mnie metodą LC-MS/MS. Wyniki uzyskane obiema metodami są zgodne, w szczególności, w obu przypadkach czas, po którym osiągnięty jest 50% spadek intensywności wyjściowego sygnału wynosi 15 min. Tym samym potwierdziłam, że obserwowane zmiany właściwości fluorescencyjnych sondy wynikają przede wszystkim ze specyficznej hydrolizy pomiędzy grupami α i β fosforanowymi, którą katalizuje enzym SVPDE. W projekcie tym zastosowałam również jakościową analizę LC-MS/MS do weryfikacji struktur różnorodnie znakowanych sond fluorescencyjnych, włączając w to związki

znakowanie dwoma różnymi znacznikami. Ze względu na złożoną strukturę oraz wysoki koszt znaczników fluorescencyjnych, syntezy tego typu związków prowadzone są w bardzo małej skali uniemożliwiającej analizę metodami NMR, dlatego też spektrometria mas była podstawową techniką do weryfikacji struktury tego typu produktów.



Rysunek 56. (A) – schemat reakcji enzymatycznej i struktura badanej sondy (synteza wykonana przez mgr Przemysława Wanata), (B) – chromatogramy z analizy LC-MS/MS – zmiany intensywności produktu i substratu, (C) – pole powierzchni sygnałów otrzymanych z analizy LC-MS/MS, (D), (E) – wyniki analizy metodami fluorescencyjnymi (badania wykonane przez mgr Renatę Kasprzyk), (F) – wartości MRM dla substratu i produktu. Wanat et al., 2018.²²¹

5.6. Analiza składu końca 3'mRNA za pomocą spektrometrii mas

Modyfikacje chemiczne umożliwiają otrzymanie mRNA o zwiększonej stabilności i wydajności translacyjnej. W zależności od tego, w którym obszarze mRNA dana modyfikacja się znajduje można uzyskać mRNA o różnej stabilności i właściwościach translacyjnych. Niniejsza część pracy dotyczy weryfikacji tego jak chemiczne modyfikacje wiązań 5', 3'-fosfodiesterowych w całym mRNA lub tylko w obrębie ogona poli(A) wpływają na właściwości biologiczne eukariotycznego mRNA. Celem było otrzymanie mRNA, które dzięki zwiększonej stabilności i wydajności translacji stanie się obiecującym narzędziem biologicznym i terapeutycznym.

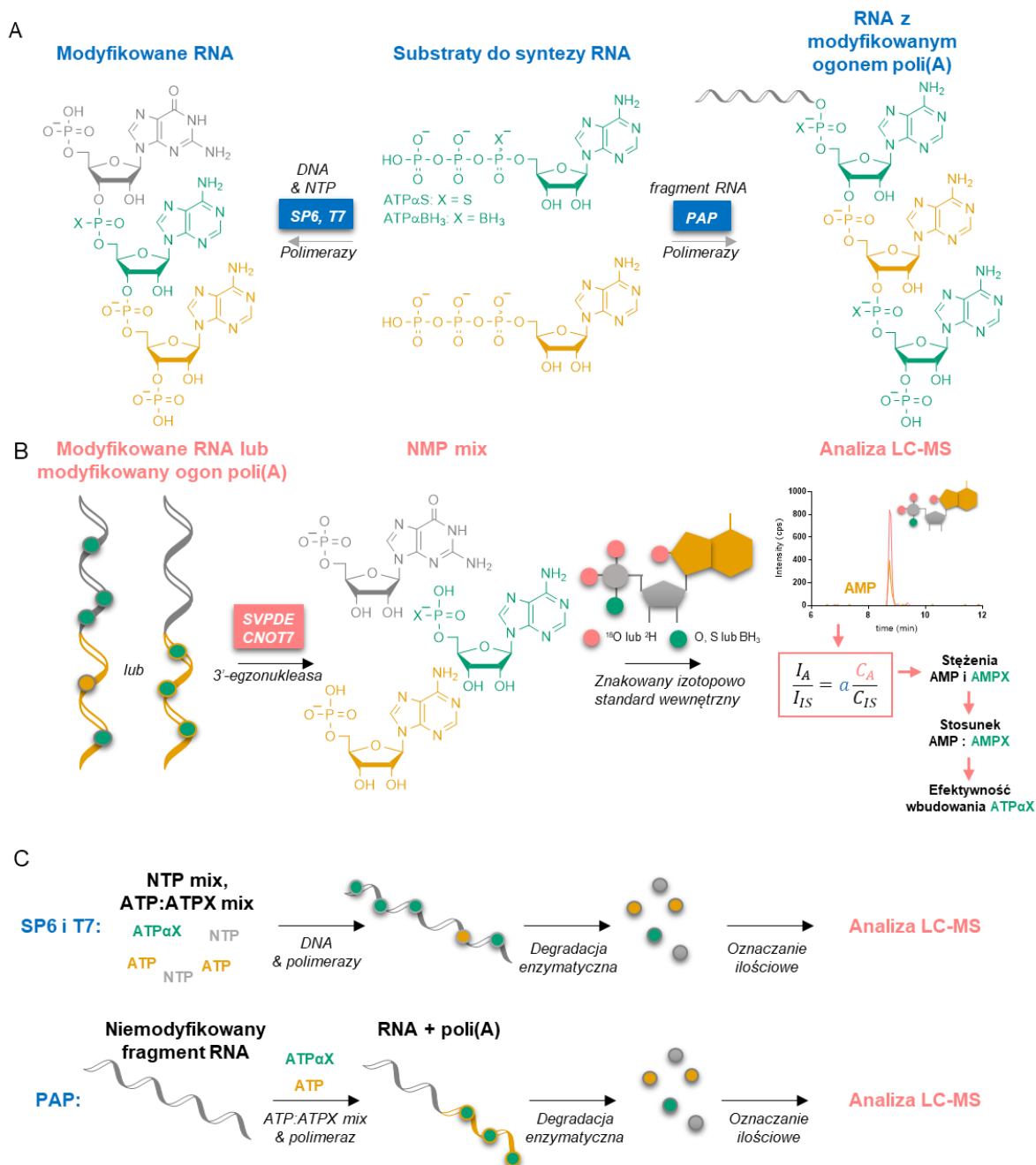
Co więcej, analiza składu modyfikowanego mRNA jest kluczowym elementem w procesie charakterystyki mRNA oraz umożliwia powiązanie struktury z funkcją mRNA. W niniejszym rozdziale zostanie opisany sposób otrzymania modyfikowanego RNA oraz metoda oparta o LC-MS/MS, która posłużyła do analizy składu modyfikowanego mRNA.

5.6.1. Koncepcja badań i schemat eksperymentu

Celem nadrzędnym niniejszego projektu było otrzymanie mRNA o zwiększonej stabilności i wydajności translacji. Do badań wybrano modyfikacje wiązań 5', 3'-fosfodiesterowych poprzez zastąpienie reszt fosforanowych tiofosforanowymi lub boranofosforanowymi. Na wybór modyfikacji miały wpływ wcześniejsze wyniki badań, dotyczące modyfikacji końca 5'mRNA. mRNA, w których reszta fosforanowa w obrębie końca 5' została zastąpiona tiofosforanową lub boranofosforanową charakteryzowały się większą stabilnością i wydajnością translacji.^{85, 90} Takie modyfikacje całego mRNA lub ogona poli(A) nie były jeszcze badane w tym kontekście. Ta część projektu dotyczyła systematycznego zbadania wpływu modyfikacji reszt fosforanowych na stabilność mRNA i jego właściwości translacyjne. Co więcej, zaprojektowałam metodę LC-MS/MS w celu powiązania struktury i funkcji mRNA.

Pierwszym krokiem w przedstawianej części projektu było otrzymanie 35-nukleotydowych, modelowych fragmentów RNA, które posłużyły do weryfikacji specyficzności substratowej polimeraz oraz do zaprojektowania metody LC-MS/MS. Takie RNA otrzymałam ko-transkrypcyjnie. RNA było syntetyzowane na matrycy DNA z udziałem polimeraz SP6 lub T7. Jako substratów do reakcji użyłam mieszaniny NTP, w tym modyfikowanych analogów ATP. W ten sam sposób otrzymano mRNA pełnej długości. Badania właściwości takiego mRNA, zrealizowane przez innych wykonawców projektu, wykazały, że losowa modyfikacja całej sekwencji mRNA resztami tiofosforanowymi zmniejsza zarówno wydajność transkrypcji, jak i aktywność translacyjną mRNA. Dlatego też w kolejnym etapie zajęłam się modyfikowaniem RNA tylko w obrębie ogona poli(A). Takie mRNA otrzymywałam post-transkrypcyjnie w reakcji poliadenylacji, czyli syntezy łańcucha poli(A) do fragmentu RNA. Otrzymałam kilkanaście rodzajów RNA, o różnej zawartości modyfikacji w celu zweryfikowania jaka zawartość modyfikacji daje najlepsze właściwości. Otrzymanym RNA nadałam skrócone nazwy, których dokładny opis znajduje się w [Tabeli 4](#). Schemat otrzymywania RNA został przedstawiony na [Rysunku 57](#). RNA o różnej zawartości

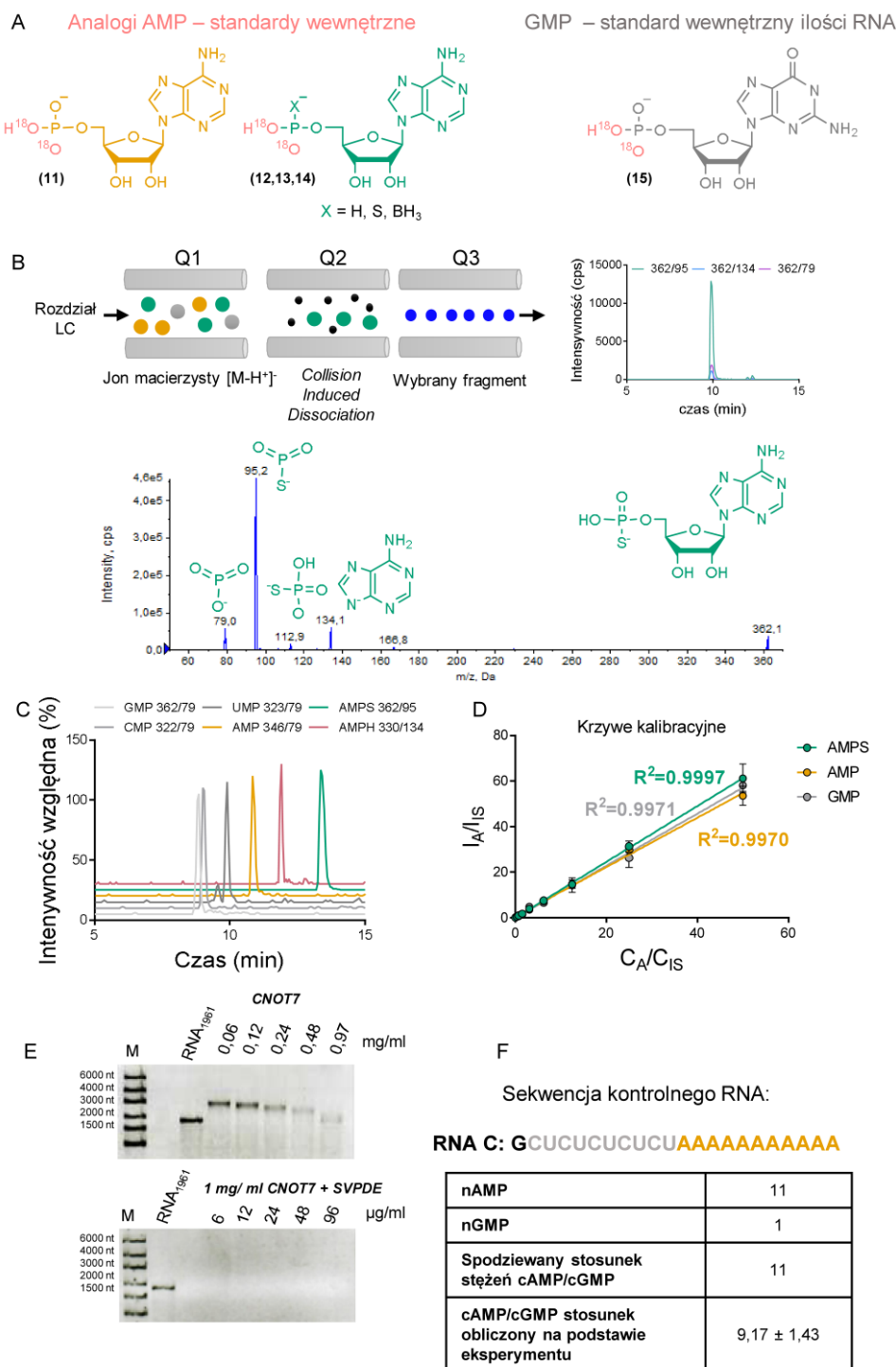
modyfikacji otrzymane były w wyniku dodania do reakcji analogów ATP: ATP α S (stereoizomer D1 lub D2) bądź ATP α BH $_3$ (D1 lub D2) w różnym stosunku do ATP, co umożliwiło modulowanie częstości wbudowywania modyfikacji. W celu ustalenia zależności między właściwościami biologicznymi RNA i zawartością modyfikacji zaprojektowałam metodę LC-MS/MS, która zakładała analizę jakościową i ilościową monofosforanów nukleozydów otrzymanych po enzymatycznym cięciu RNA.



Rysunek 57. Synteza i analiza modyfikowanego RNA – schemat eksperymentu. (A) Synteza RNA - transkrypcja in vitro i poliadenylacja (B) metoda analizy RNA – LC-MS/MS, (C) ogólny schemat otrzymywania modyfikowanego RNA i jego analizy. Strzelecka et al., 2020. ²²²

5.6.2. Zaprojektowanie i walidacja metody LC-MS/MS

W celu ustalenia zależności między strukturą, a funkcją modyfikowanego mRNA, zaprojektowałam metodę opartą o LC-MS/MS do ilościowego oznaczania wydajności wbudowywania do mRNA analogów ATP modyfikowanych w obrębie fosforanu (Rysunek 58).

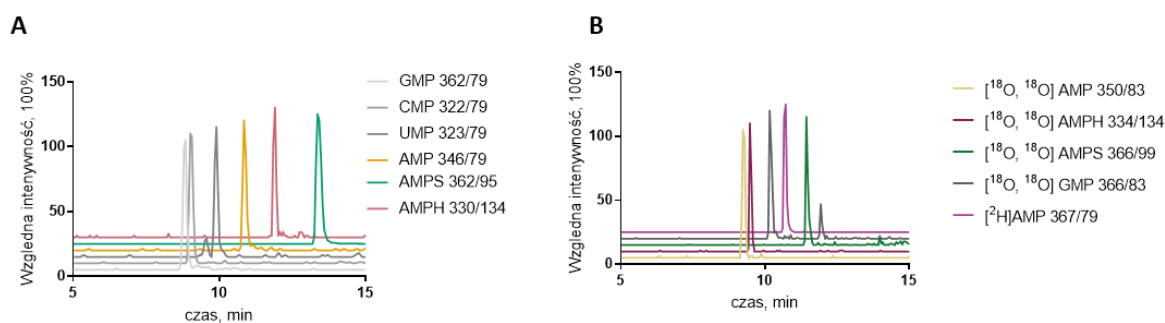


Rysunek 58. Opracowanie metody ilościowego oznaczenia modyfikacji w ogonie poli A: (A) struktura znakowanych izotopowo wzorców ([¹⁸O, ¹⁸O]AMP (11), [¹⁸O, ¹⁸O]AMPH (12), [¹⁸O, ¹⁸O]AMPS (13), [¹⁸O, ¹⁸O]AMP (14), [18O, 18O]GMP (15), (B) określenie par MRM, (C) opracowanie warunków rozdzielania chromatograficznego, (D) wyznaczenie krzywych kalibracyjnych, (E) optymalizacja warunków trawienia enzymatycznego, (F) walidacja metody – pomiar próbki kontrolnej. Strzelecka et al., 2020.²²²

Na początku zajęłam się analogami tiofosforanowymi. Jeżeli ATPαS był akceptowany przez polimerazy jako substrat to otrzymywałam produkt w postaci modyfikowanego RNA. Analogi ATP takie jak ATPαX występują w postaci dwóch stereoizomerów S_P (D1) i R_P (D1). Dotychczas badane polimerazy akceptują tylko jeden izomer - S_P^{93} , a reakcja zachodzi z odwróceniem konfiguracji przy atomie fosforu. Z kolei izomer R_P (D2) nie jest ani substratem ani inhibitorem dla tego enzymu. Pojawia się pytanie jak zachowują się w stosunku do tiofosforanowych analogów ATP pozostałe polimerazy takie jak PAP. Co więcej, ciekawym zagadnieniem wydaje się być, czy substraty z modyfikacją boranofosforanową również będą rozpoznawane przez polimerazy i wbudowywane do RNA. Aby ocenić skuteczność wbudowania ATPαS, modyfikowane RNA zostało enzymatycznie zdegradowane do pojedynczych NMP i 5'-tiofosforanu adenozy (AMPS). Do reakcji trawienia użyłam fosfodiesterazy SVPDE (*snake venom phosphodiesterase* – fosfodiesteraza z jadu węża), która jako produkty reakcji daje 5'-monofosforany nukleotydów. W celu opracowania metody ilościowego oznaczania pojedynczych nukleotydów zsyntetyzowałam izotopologię produktów degradacji RNA znakowane tlenem 18 w obrębie fosforanu i zastosowałam je jako wzorce wewnętrzne, aby ułatwić oznaczenie ilościowe. Synteza była opisana w Rozdziale 5.3.3. Następnie wybrałam pary MRM, ustaliłam warunki chromatograficzne w celu uzyskania dobrego rozdzielania i kształtu sygnału oraz wyznaczyłam krzywe kalibracyjne dla badanych metabolitów. Kluczowym czynnikiem podczas opracowywania metody była optymalizacja procedury degradacji RNA w celu zapewnienia całkowitej jego degradacji do (zmodyfikowanych) monofosforanów, bez dalszego rozkładu uwolnionych nukleotydów. Na koniec zweryfikowałam rzetelność opracowanej metody.

5.6.2.1. Wybór warunków chromatograficznych, ustalenie parametrów źródła jonów i par MRM

Do rozdzielania nukleotydów powstałych po degradacji RNA zastosowano chromatografię par jonowych z użyciem buforu zawierającego dimetyloheksyloaminę (DMHA). W tych warunkach uzyskano odpowiedni kształt sygnału i satysfakcjonujący rozdział monitorowanych analitów (Rysunek 59).



Rysunek 59. Analiza nukleotydów wzorcowych metodą RP HPLC. (A) – chromatogramy nieznakowanych nukleotydów, (B) – chromatogramy nukleotydów znakowanych izotopowo, użytych jako wzorce bądź powstałych po degradacji RNA. Warunki analizy: eluent A - 20 mM DMH (pH 4,8, kwas mrówkowy); eluent B - acetonitryl:20 mM DMH (pH 4,8, kwas mrówkowy) 1:1, przepływ 0,7 ml/min, 0-100% w 15 min. Strzelecka et al., 2020.²²²

Na podstawie wyników uzyskanych podczas realizacji pierwszej części projektu, gdzie analizowałam ścieżki fragmentacji nukleotydów, wiadomo było, że w trybie jonów ujemnych

pojawia się więcej jonów fragmentacyjnych - głównie tych związanych z resztami fosforanowymi (Rozdział 5.3.1).²⁰¹ Ponieważ badane RNA zmodyfikowane zostały w obrębie fosforanów, więc jako najbardziej odpowiedni sposób analizy wybrałam tryb jonów ujemnych. Detekcja związków odbywała się w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM) (Rozdział 4.1.6). Dla każdego analitu wybrałam co najmniej dwie pary MRM. Do obliczenia stężenia analitu brane pod uwagę było przejście MRM o największej intensywności. Druga para służyła do potwierdzenia identyfikacji związku. Zestawienie par MRM znajduje się w Tabeli 2.

Tabela 2. Zestawienie par MRM wybranych do analizy nukleotydów.

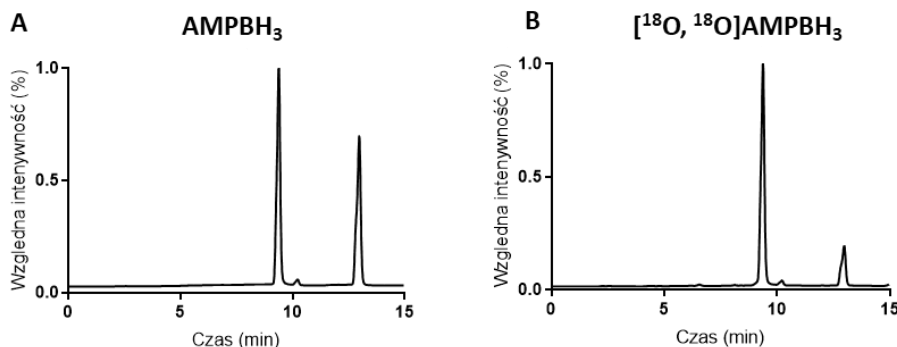
Nukleotyd	I para najbardziej intensywna	II para
AMP	346/79	346/134
[¹⁸ O, ¹⁸ O] AMP	350/83	350/134
[² H] AMP	347/79	347/135
AMPS	362/95	362/134
[¹⁸ O, ¹⁸ O] AMPS	366/99	366/134
AMPH	330/134	330/63
[¹⁸ O, ¹⁸ O] AMPH	334/134	330/67
GMP	362/79	362/150
[¹⁸ O, ¹⁸ O] GMP	366/83	366/101

Parametry źródła jonów dobierałam indywidualnie dla każdego analitu i dla każdej pary jon pierwotny-jon potomny. Zestawienie tych parametrów znajduje się w części eksperymentalnej (Rozdział 7.4.4).

5.6.2.2. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych

W celu oznaczenia ilości poszczególnych analitów konieczne jest przygotowanie krzywych kalibracyjnych, wyznaczenie parametrów funkcji opisujących te krzywe w zakresie liniowym, a następnie, na podstawie wyznaczonych zależności, obliczenie stężeń związków w badanych próbkach. Do przygotowania krzywych kalibracyjnych stosowałam anality w zakresie stężeń od 0,01 do 50 μM i odpowiadające im izotopologi znakowane tlenem ¹⁸O w stężeniu 1 μM . Przykładowe krzywe kalibracyjne uzyskane w wyniku eksperymentów znajdują się w Panelu D, na Rysunku 58. Na osi x (Panel D, Rysunek 58) umieszczono stosunek intensywności analitu do wzorca (I_A/I_{IS}) a na osi y stosunek stężenia analitu do stężenia wzorca (C_A/C_{IS}). Dla każdego z badanych analitów: AMP, AMPS, AMPH, GMP, wzorec wewnątrz stanowił jego izotopolog. Wyjątek stanowił AMPBH₃. Związek ten jak i jego analog znakowany izotopowo są bardzo nietrwałe – rozkład ~40% już po jednej dobie (Rysunek 60). Z racji tego, że AMPBH₃ jest niestabilny i jego stosowanie jako wzorca wewnętrznego okazało się niemożliwe zaproponowałam, że wzorcem dla AMPBH₃ będzie [¹⁸O, ¹⁸O] AMPH. Jest to

związek zbliżony strukturalnie i wykazujący podobne ścieżki fragmentacji²⁰¹, jednak są dużo bardziej stabilne chemicznie.



Rysunek 60. (A) – chromatogram próbki AMPBH₃, (B) – chromatogram próbki [¹⁸O,¹⁸O]AMPBH₃

Przygotowanie krzywych kalibracyjnych umożliwiło wyznaczenie parametrów liniowych funkcji kalibracyjnych oraz limitu oznaczalności. Parametry dla każdego analitu zostały zestawione w Tabeli 3. Parametr *b* został określony jako 0 ponieważ jego wartość była znacznie mniejsza niż błąd wyznaczony przy dopasowaniu.

Tabela 3. Zestawienie uzyskanych współczynników kierunkowych używanych do dalszych obliczeń. Wzór ogólny funkcji to $y=ax+b$.

Analit	a	u _a	R ²	LOQ (μM)
AMP	1.087	0.0243	0.9970	0,12
GMP	1.145	0.0253	0.9971	0,10
AMPS	1.227	0.0065	0.9997	0,03
AMPH	2.157	0.0289	0.9999	0,20
AMPBH ₃	1.118	0.0131	0.9992	0,22

Stężenia analitów (*C_A*) były wyznaczone na podstawie parametru *a* prostej kalibracyjnej, dodawanego stężenia wzorca, (*C_{IS}*) oraz stosunku intensywności sygnałów wzorca i analitu (*I*) zgodnie z Równaniem 9:

$$C_A = \frac{I_A}{I_{IS}} * C_{IS} \quad (9)$$

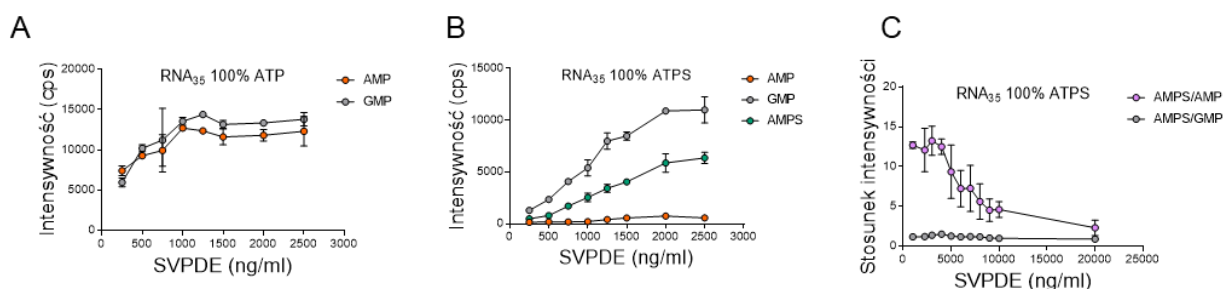
Badane RNA nie zawierały modyfikowanego GMP, dlatego pomiar ilości GMP zastosowany jako standard wewnętrzny umożliwiający weryfikację stężenia RNA w wyjściowej próbce. Spektrofotometryczne pomiary ilości RNA były obciążone dużym błędem ze względu na heterogenność próbki. Dlatego też również dla GMP wyznaczono krzywe kalibracyjne i oznaczano jego ilość, co umożliwiło weryfikację kompletności trawienia enzymatycznego oraz

wyznaczenie czynnika normalizującego różnice ilości RNA w poszczególnych próbkach, dzięki czemu można było wyznaczyć długość ogona poli(A), (Rozdział 5.6.2.6).

5.6.2.3. Optymalizacja warunków wyczerpującej degradacji enzymatycznej RNA

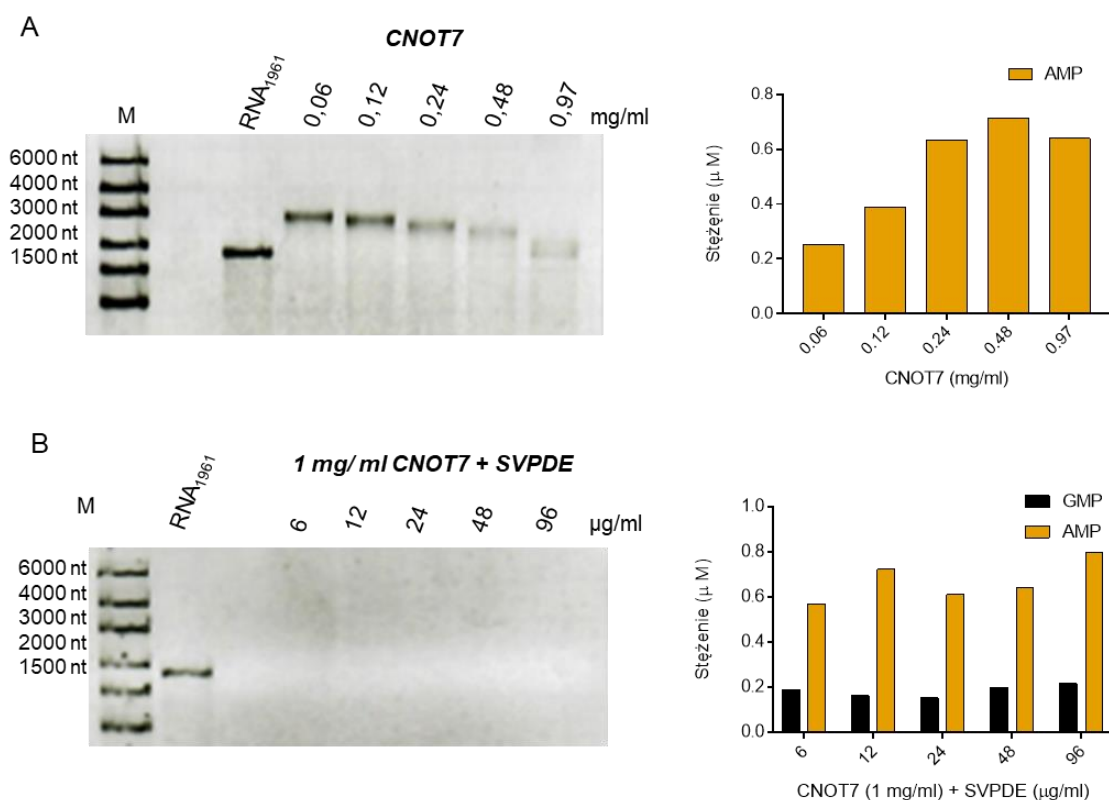
Wiarygodne oznaczenie ilościowe nukleotydów powstałych po degradacji modyfikowanego RNA i na tej podstawie odtworzenie jego składu, wymagało ustalenia powtarzalnych warunków wyczerpującej degradacji RNA, niezależnych od ich stopnia modyfikacji. Dlatego też, ważnym i czasochłonnym etapem moich badań była optymalizacja warunków trawienia. Jako enzymy degradujące RNA zastosowałam dwa enzymy: fosfodiesterazę I z jadu węża (SVPDE) oraz CNOT7. Na wybór enzymu SVPDE do trawienia RNA wpłynęło kilka czynników. Produktem reakcji z użyciem enzymu SVPDE są 5'-monofosforany nukleozydów. Dla tych związków stosunkowo prosto jest otrzymać ich znakowane tlenem izotopologię. SVPDE jest 3'→5' egzonukleazą o szerokiej specyficzności substratowej i wysokiej procesywności, co zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania wyczerpującej degradacji RNA (czyli do 5'-monofosforanów nukleotydów, a np. nie do fragmentów oligonukleotydowych). Enzym ten katalizuje również degradację modyfikowanych nukleotydów,^{223, 224} jest on komercyjnie dostępny, tani i charakteryzuje się dużą aktywnością.

Ilość SVPDE w reakcji trawienia RNA była optymalizowana z użyciem 35 nukleotydowego RNA A bez ogona poli(A) w wersji niemodyfikowanej (Rysunek 61; A) oraz zawierającej tylko modyfikację tiofosforanową (Rysunek 61; B, C). Na wykresach zaprezentowanych na Rysunku 61 pokazałam, że RNA niemodyfikowane zostało wyczerpująco zhydrolizowane w 37 °C ciągu 1 h już przy stężeniu 1,5 µM/ml enzymu, ponieważ ilości GMP i AMP nie zmieniały się przy zastosowaniu większych stężeń enzymu. Jednakże modyfikowane RNA ulegały wyczerpującej degradacji dopiero przy stężeniu SVPDE wynoszącym 2,5 µM/ml. W przypadku trawienia RNA modyfikowanego okazało się, że stosowanie zbyt dużego stężenia enzymu może powodować niepożądaną reakcję uboczną desulfurylacji AMPS do AMP. Dlatego podczas optymalizacji warunków trawienia szczególną uwagę zwróciłam na to, aby ilość powstającego AMP była znikoma przy jednoczesnym zachowaniu wyczerpującej degradacji RNA. Osiągnęłam to poprzez pomiar stężeń obu nukleotydów w próbkach oraz pomiar stosunku AMPS do AMP (Rysunek 61; C). Na tej podstawie ustaliłam, że optymalne stężenie SVPDE to 3 µg/ml.



Rysunek 61. Optymalizacja ilości enzymu SVPDE do trawienia krótkiego RNA. (A) 35-nukleotydowe RNA niemodyfikowane, (B,C) 35-nukleotydowe RNA zawierające 100% tiofosforanów adenozyliny – pozostałe reszty fosforanowe nie były modyfikowane.

Drugi z zastosowanych enzymów, CNOT 7 (*transcription complex subunit 7*), ma aktywność 3' → 5' poli(A) egzorybonukleazy. Jest on podjednostką kompleksu egzonukleolitycznego odpowiedzialnego za skracanie łańcucha poli(A) w komórkach.⁶⁵ Został on użyty w eksperymencie ze względu na to, że jest bardziej specyficzny do powtarzającej się sekwencji poli(A) i w mniejszym stopniu usuwa modyfikację z fosforanu. Aby umożliwić analizę RNA w sposób niezależny od składu i sekwencji, do trawienia RNA z ogonem poli(A) używałam koktajlu enzymatycznego składającego się z SVPDE i CNOT7. Szczególnie istotne było to w przypadku RNA poliadenylowanych potencjalnie różniących się długością ogona poli(A). W reakcjach tego typu stosowałam stężenia CNOT 7 i SVPDE wynoszące odpowiednio 1mg/ml i 9µM/ml. RNA każdego rodzaju poddawałam niezależnie analizie elektroforetycznej w celu sprawdzenia kompletności degradacji. W przypadku stwierdzenia oligonukleotydowych fragmentów RNA, co miało miejsce w szczególności przy długich, w dużym stopniu modyfikowanych RNA, ilości enzymów wziętych do trawienia były optymalizowane indywidualnie. Przykładowa optymalizacja mieszaniny enzymów przedstawiona jest na [Rysunku 62](#).



Rysunek 62. Optymalizacja ilości enzymu CNOT7 oraz SVPDE do trawienia RNA z poli(A). (A) Badanie wpływu różnych stężeń CNOT7 na kompletność degradacji RNA – wyniki z elektroforezy i LC-MS, (B) testowanie różnych stężeń SVPDE przy ustalonym stężeniu CNOT7 – wyniki z elektroforezy i LC-MS. Strzelecka et al., 2020.²²²

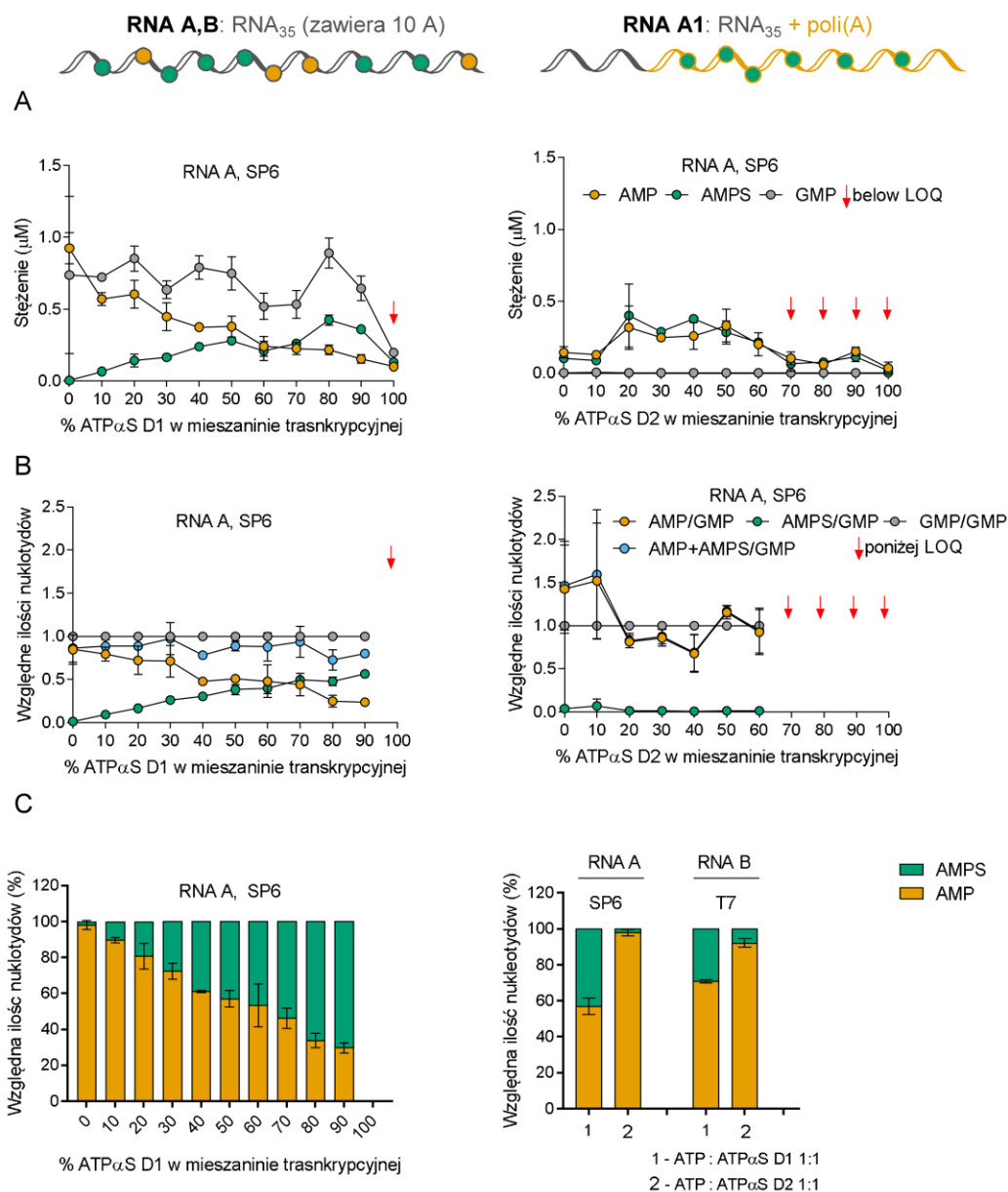
5.6.2.4. Analiza fragmentu RNA o ściśle zdefiniowanej strukturze

W celu weryfikacji możliwości analizy składu RNA proponowaną metodą LC-MS/MS, przeprowadziłam najpierw analizę cząsteczki niemodyfikowanego RNA o ściśle zdefiniowanej strukturze, otrzymanego metodą syntezy na podłożu stałym (fragment RNA C o sekwencji: GCUCUCUCUCUAAAAAAAAAAAA) ([Rysunek 58](#); F). Fragment ten poddałam trawieniu SVPDE i zanalizowano metodą LC-MS. Z danych eksperymentalnych obliczyłam stężenia

AMP i GMP, a następnie stosunek tych stężeń. Teoretyczny stosunek A do G w tej sekwencji wynosi 11. Stosunek A do G jaki otrzymano z eksperymentu to $9,17 \pm 1,43$, co akceptowalnie pokrywa się z przewidywaniami teoretycznymi. Metodę wykorzystałam do analizy różnego rodzaju RNA co jest zaprezentowane w kolejnych rozdziałach.

5.6.2.5. Analiza krótkich fragmentów RNA zawierających modyfikacje tiofosforanową

Najpierw przeprowadziłam eksperyment kontrolny analizując RNA otrzymane z użyciem polimerazy T7, do którego syntezy użyłam 100% ATP α S D1 lub D2. W Panelu C na [Rysunku 63](#) widać, że polimeraza T7 preferuje tylko stereoizomer ATP α S D1 i wynik ten zgodny jest ze wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi.⁹³



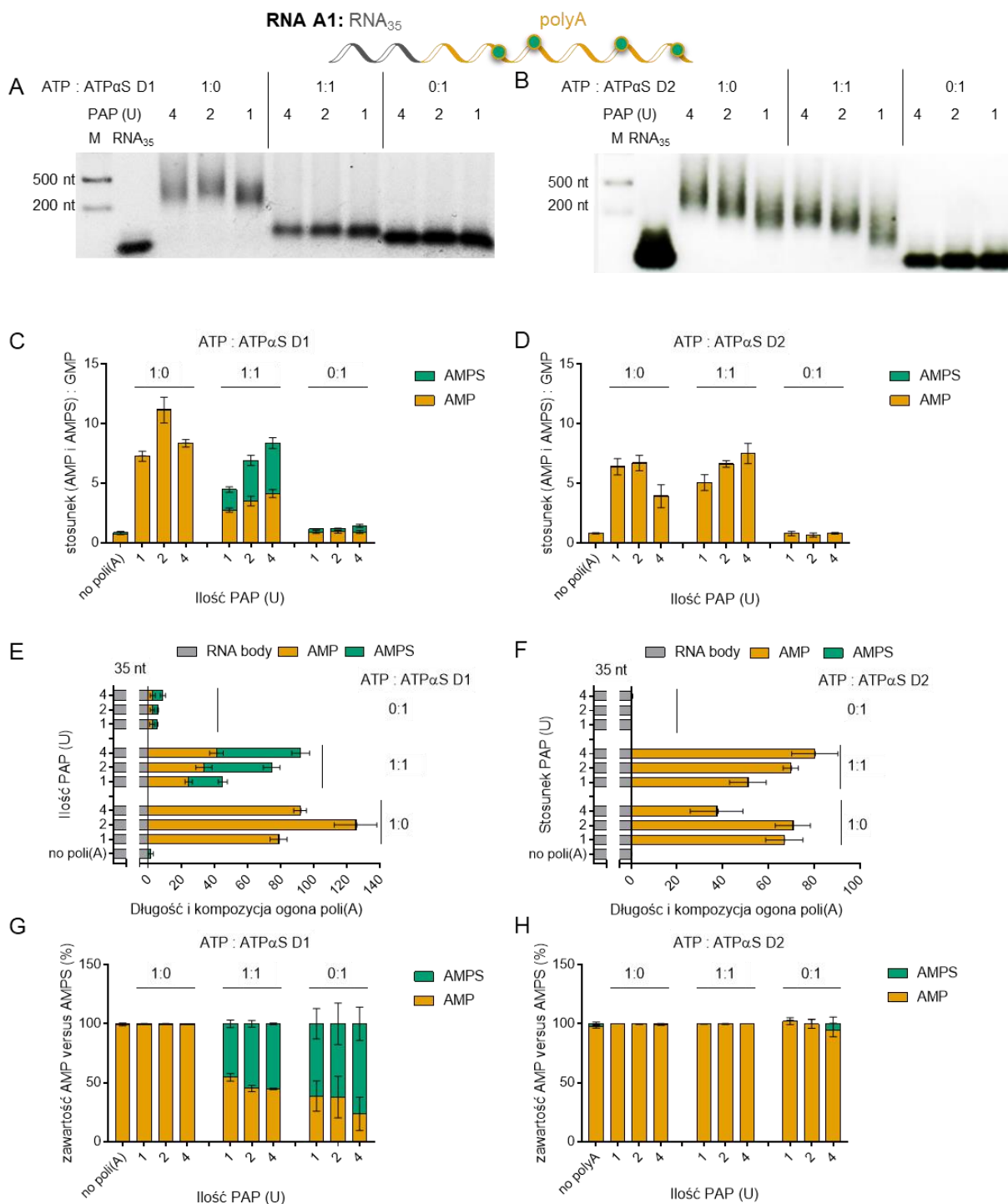
Rysunek 63. Polimerazy SP6, T7 i PAP akceptują izomer ATP α S D1 jako substrat. Rysunek przedstawia analizę krótkich RNA₃₅ otrzymanych w transkrypcji in vitro używając polimerazy SP6 lub T7 oraz różnych stosunków ATP : ATP α S (RNA A) i krótkich RNA z ogonem poli(A) dodanym za pomocą polimerazy PAP (RNA A1). (A) RNA było poddane trawieniu z użyciem enzymu SVPDE. Wykres przedstawia stężenia nukleotydów otrzymane z RNA po trawieniu i wyznaczone za pomocą metody

Następnie analizie poddałam 21 różnych 35-nukleotydowych RNA (Tabela 4), do syntezy, których użyłam polimerazy SP6 oraz różne stosunki ATP do ATPαS D1 lub D2. W przypadku drugiego izomeru przy większych jego ilościach w stosunku do ATP produkt w żelu praktycznie nie był widoczny. Stężenia poszczególnych analitów (Rysunek 63, Panel A) oraz stosunki stężeń AMP i AMPαS do GMP (ilość w próbce powinna być stała) (Rysunek 63, Panel B) wyznaczyłam na podstawie krzywych kalibracyjnych korzystając ze wzoru 9. Pozwoliło to ustalić powinowactwo polimerazy SP6 względem analogu ATP oraz jej stereospecyficzność. Wykresy na Rysunku 63 pokazują zależność stosunków AMP/GMP i AMPS/GMP w funkcji wzrastającego stężenia ATPαS użytego do transkrypcji. Wyniki sugerują, że polimeraza SP6 ma podobne powinowactwo względem ATP jak i jego analogu zawierającego siarkę, jednakże akceptuje tylko jeden stereoizomer.

5.6.2.6. Analiza fragmentów RNA zawierających ogon poli(A) z modyfikacją tiofosforanową

Kolejnym krokiem moich badań była weryfikacja czy przy użyciu polimerazy PAP możliwe jest uzyskanie cząsteczek RNA zawierających modyfikowany resztami tiofosforanowymi ogon poli(A). W tym celu testowej reakcji poliadenylacji poddałam niemodyfikowane RNA A1 o długości 35 nt otrzymane metodą transkrypcji *in vitro* z zastosowaniem polimerazy SP6. W ramach eksperymentu przetestowałam 3 różne stężenia polimerazy PAP oraz stosunki ATP i ATPαS D1 lub D2 wynoszące 1:0, 1:1, 0:1 (Rysunek 64). Otrzymane RNA poddałam trawieniu enzymatycznemu z wykorzystaniem SVPDE i CNOT7 w ustalonych wcześniej warunkach oraz (niezależnie) analizie elektroforetycznej w celu oszacowania ich długości oraz homogenności. Otrzymane produkty degradacji zostały oznaczone za pomocą LC-MS/MS. Wyniki przedstawiono na Rysunku 64. Panel A i B na Rysunku 64 przedstawia wyniki otrzymane dla różnych wariantów RNA A1 zsyntetyzowanych przy użyciu czystego ATP, ATP w stosunku 1:1 z ATPαS D1 lub D2 oraz czystego ATPαS D1 lub D2. Na wykresach C i D pokazano stosunek AMP lub AMPS do GMP. W wypadku kiedy w reakcji poliadenylacji jest obecny tylko ATP jako substrat nie obserwuje się dużych różnic w ilości AMP otrzymanego po trawieniu, co oznacza, że średnia długość łańcucha jest podobna. Wyniki dla RNA otrzymanych w obecności ATP i ATPαS w stosunku 1:1 wraz ze wzrostem ilości polimerazy wzrasta ilość oznaczonych nukleotydów, co wskazuje na to, że średnia długość łańcucha się zwiększa. Obecność AMPS wykrywalna jest jedynie w próbce RNA otrzymanych z ATPαS D1. Kiedy do reakcji wzięto 100% analogu ATPαS D1, a ATP nie było obecne, ogon poli(A) praktycznie nie powstaje. Może świadczyć to o tym, że polimeraza PAP potrafi syntetyzować ogon poli(A), kiedy w reakcji obecne jest niemodyfikowane ATP. Na kolejnych wykresach przedstawiono długość i kompozycje ogonów poli(A) (Rysunek 64; E, F) oraz ilości nukleotydów AMP i AMPS znormalizowane do 100% (Rysunek 64; G i H). W przypadku izomeru D1 w obecności ATP efektywność wbudowywania tego analogu jest zbliżona do ATP. Znormalizowany wynik dla RNA, do którego syntezy użyto tylko ATPαS D1 sugeruje, że w strukturze otrzymanego RNA jest około 30% niemodyfikowanego nukleotydu.

Jednak wynika to z tego, że ogon jest bardzo, krótki (~10 nukleotydów) i wynik obarczony jest dużym błędem.



Rysunek 64. Polimeraza PAP rozpoznaje ATP α S D1, jeżeli w reakcji jest obecne ATP. Produktem reakcji jest modyfikowany ogon poli(A). Długości RNA obliczone są na podstawie wzorów podanych w Rozdziale 5.6.2.6. (A, C, E, G) RNA i jego analiza otrzymane z użyciem ATP i ATP α S D1 jako substratów reakcji, (B, D, F, H) RNA i jego analiza otrzymane z użyciem ATP i ATP α S D2 jako substratów reakcji. (C, D) ilości AMP i AMPS znormalizowane do GMP, (E, F) długość i kompozycja ogona poli(A), (G, H) względna zawartość AMP i AMPS w ogonie poli(A). Strzelecka et al., 2020.²²²

Na podstawie omówionych wykresów możemy stwierdzić, że polimeraza PAP rozpoznaje ATP α S D1, jeżeli w reakcji jest obecne ATP. W żadnym z RNA, do którego syntezy użyte było ATP α S D2, nie obserwowaliśmy modyfikowanego AMPS. Świadczy to o tym, że

izomer D2 nie jest substratem dla polimerazy i nie jest również inhibitorem, ponieważ w reakcji ATP: ATPaS D2 1:1 średnia długość ogona podobna jest do tej otrzymanej z RNA, do którego syntezy użyłam tylko ATP. Ogony poli(A) powstające w reakcji katalizowanej przez PAP mogą mieć różną długość, co zależy od czasu i warunków reakcji. Obecny w żelu prążek o największej intensywności wskazuje RNA o dominującej długości w próbce. Jednak widać, że nie jest to homogeny prążek, a raczej ciągnie się przez fragment żelu. Sugeruje to, że otrzymana próbka jest heterogenna. Wyniki analizy LC-MS/MS pozwalają na niezależne oszacowanie średniej długości ogona poli(A), co może być informacją komplementarną do otrzymanej z żelu.

W celu umożliwienia wyznaczenia długości ogona poli(A) analizie poddałam najpierw próbkę kontrolną, którą stanowił fragment RNA bez poli(A). Dla próbki tej wyznaczyłam parametr r_{ref} , który odpowiada stosunkowi AMP do GMP ($r_{ref} = \frac{C_{AMP}}{C_{GMP}}$). Znając parametr r_{ref} możliwe jest obliczenie liczby nukleotydów adeninowych (niemodyfikowanych) w ogonie poli(A) ($n_{AMPtail}$) dla dowolnego analizowanego RNA o tej samej sekwencji (z wyłączeniem poli(A)). Można tego dokonać na podstawie równania 10:

$$n_{AMPtail} = \left(\frac{C_{AMP}}{C_{GMP}} - r_{ref} \right) * n_{GMP} \quad (10)$$

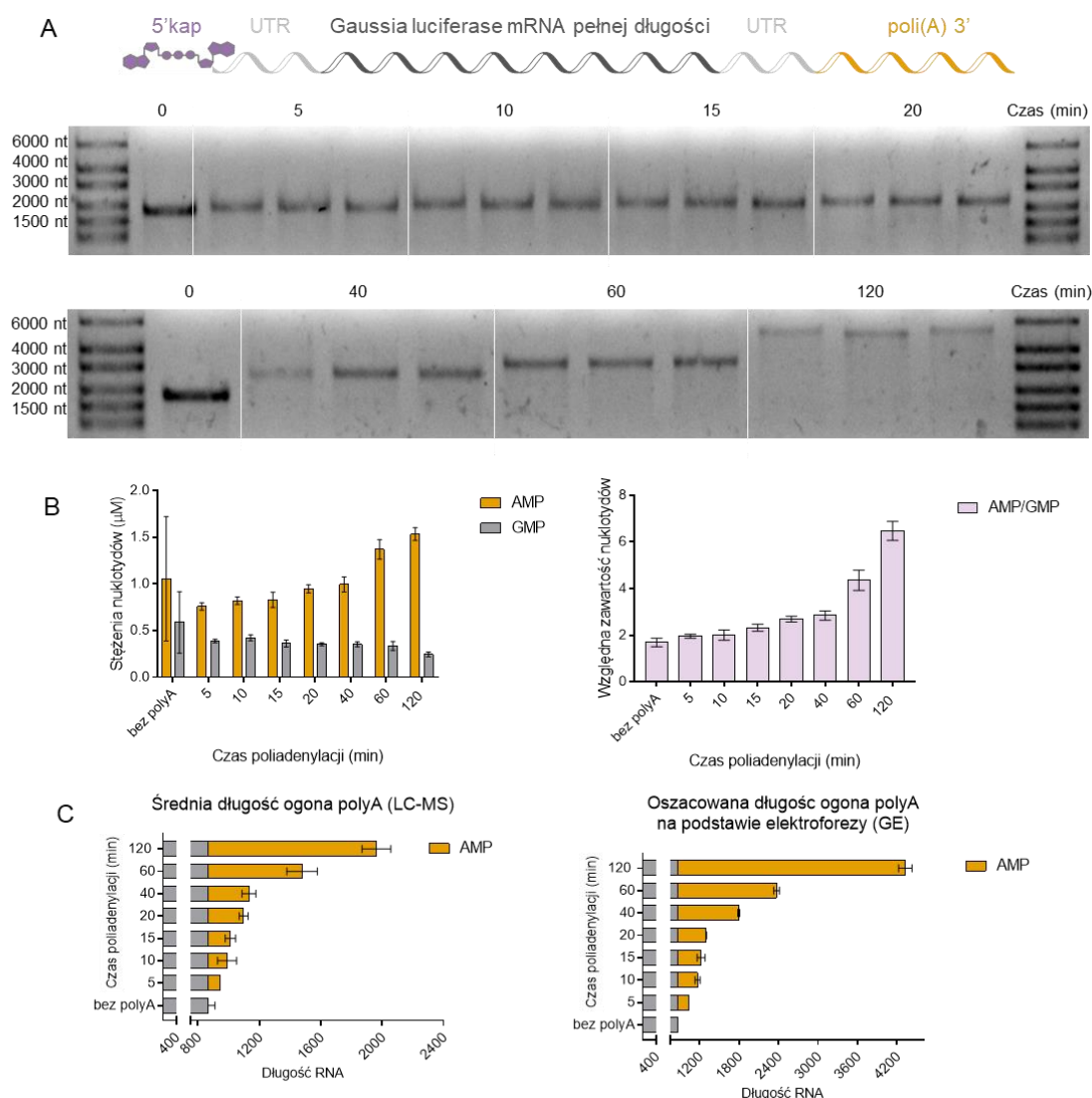
gdzie n_{GMP} to liczba guanin w sekwencji RNA, C_{AMP} – stężenie AMP w RNA, C_{GMP} – stężenie GMP. Ilość modyfikowanych nukleotydów adeninowych ($n_{AMPXtail}$) można natomiast wyznaczyć z równania 11:

$$n_{AMPXtail} = \frac{C_{AMPX}}{C_{GMP}} * n_{GMP} \quad (11).$$

Wyniki obliczeń dla krótkich RNA z ogonem poli(A) zaprezentowano na wykresach E i F na [Rysunku 64](#). Metoda i sposób analizy składu RNA opracowana, na krótkich RNA z ogonem poli(A) została następnie zaadoptowana do analizy pełnej długości mRNA.

5.6.3. Analiza pełnej długości niemodyfikowanego mRNA

Sposób wyznaczania średniej długości ogona poli(A) na podstawie metody LC-MS/MS wykorzystałam do badania elongacji ogona poli(A) w zależności od czasu prowadzenia reakcji poliadenylacji. Analizie poddałam mRNA otrzymane w 7 różnych warunkach, które różniły się czasem prowadzenia reakcji poliadenylacji. Wyniki elektroforezy i analizy LC-MS/MS przedstawia [Rysunek 65](#). Wykresy w Panelu B, [Rysunek 65](#), pokazują, że wraz ze wzrostem czasu reakcji poliadenylacji, wzrasta stężenie AMP w próbce. Tak więc, stosunek AMP do GMP rośnie wraz z wydłużaniem czasu reakcji poliadenylacji, co jest zgodnie z oczekiwaniami. Długości łańcucha poli(A) obliczyłam na podstawie wyznaczonych stężeń AMP i GMP i wzorów zaprezentowanych w Rozdziale 5.6.2.6. Dane obliczone jak i odczytane z żelu agarozowego zestawiałam w Panelu C na [Rysunku 65](#).

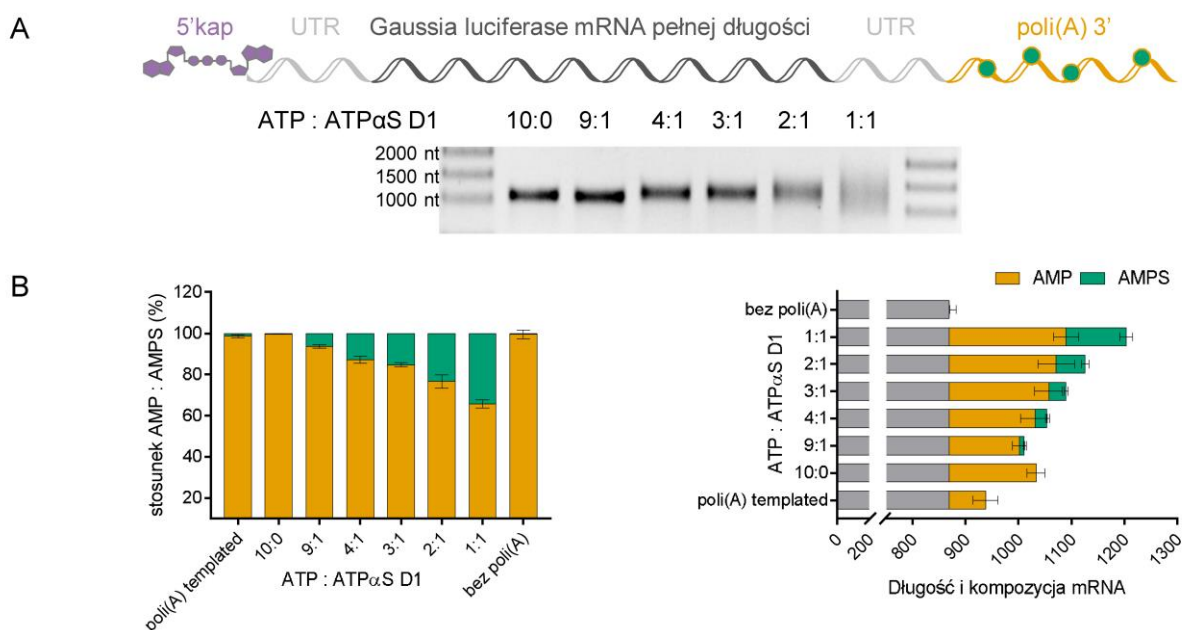


Rysunek 65. Analiza długości ogonów poli(A) w mRNA otrzymanych przy użyciu PAP w reakcji poliadenyacji prowadzonych przez różne okresy czasu. (A) Analizy otrzymanych RNA wykonane na żelu agarozowym wykonane przez dr Mirosława Śmietanińskiego (B) Dane uzyskane z analizy LC-MS. Stężenia GMP i AMP po trawieniu RNA. Stosunek AMP/GMP jest większy z powodu wydłużania łańcucha poli(A). (C) Średnia długość łańcucha poli(A) otrzymana z analizy LC-MS oraz oszacowana na podstawie elektroforezy maksymalna długość łańcucha poli(A). Strzelecka et al., 2020.²²²

Wyniki analizy LC-MS/MS i elektroforezy są zbliżone dla krótszych ogonów natomiast widać znaczne różnice dla długich ogonów. Najdłuższy badany ogon poli(A) na podstawie elektroforezy ma około 3,4 tys. nukleotydów natomiast wartość obliczona na podstawie analizy LC-MS/MS wynosi 1,3 tys. Wynika to prawdopodobnie z tego, że im dłuższy czas poliadenyacji tym próbka jest bardziej heterogenna, co też potwierdza żel – intensywność prążka jest mniejsza oraz widać znaczne jego rozmycie. Różnice wynikają z tego, że z analizy LC-MS/MS otrzymuje się średnią długość ogona, a z analizy elektroforetycznej dominującą długość ogona. Ponadto z doniesień literaturowych wynika, że wydłużenie czasu reakcji poliadenyacji powoduje powstawanie większej ilości krótszych ogonów poli(A). Wpływa to na wartość średnią długości ogona poli(A) obliczoną z eksperymentu LC-MS/MS.^{225, 226}

5.6.4. Analiza pełnej długości mRNA zawierających modyfikacje tiofosforanową

Zaprojektowaną metodę LC-MS/MS użyłam następnie do analizy składu modyfikowanego ogona poli(A) wprowadzonego do mRNA zawierającego modyfikację tiofosforanową w celu ustalenia zależności między ich strukturą i funkcją. Zbadałam mRNA, do przygotowania których użyto 6 różnych stosunków ATP do ATP α S D1 (Rysunek 66).



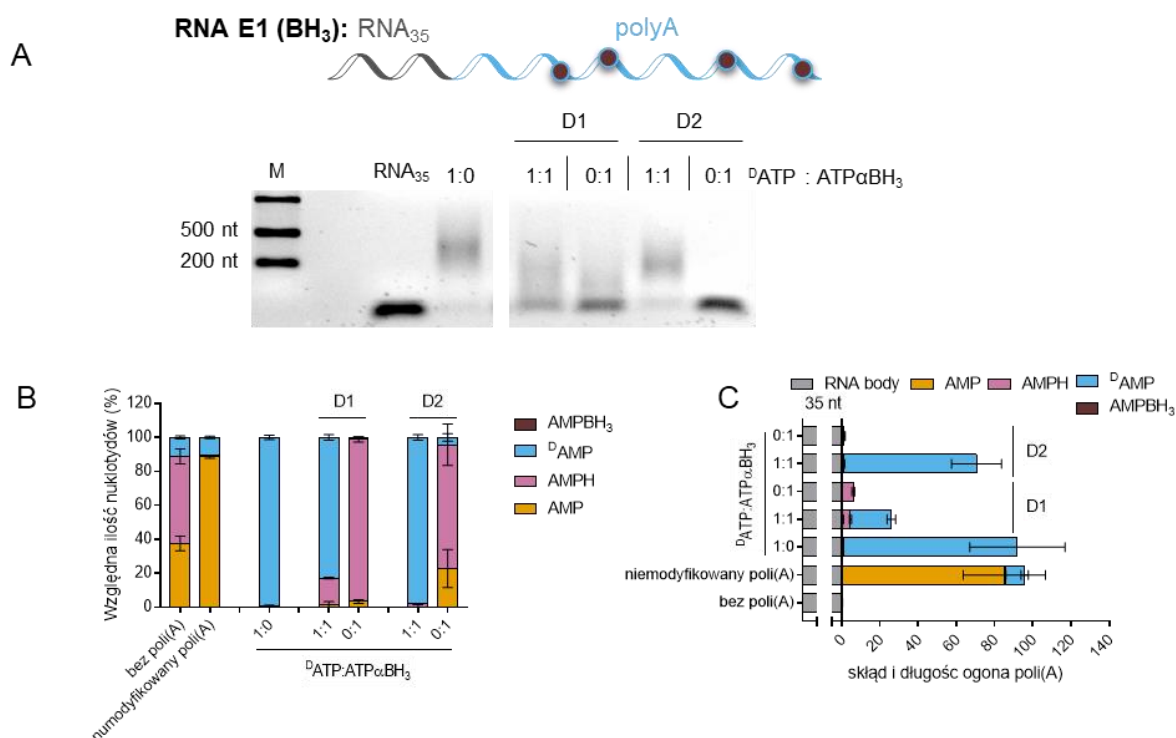
Rysunek 66. Analiza mRNA do syntezy, którego użyty był różny stosunek ATP do ATP α S. (A) Żele agarozowe przedstawiające produkty reakcji przygotowane przez Mirosława Śmietańskiego (B) Dane uzyskane z analizy LC-MS. Zawartość procentowa nukleotydów adeninowych oraz średnia długość łańcucha poli(A) otrzymana z analizy LC-MS. Strzelecka et al., 2020.²²²

Te mRNA zostały otrzymane przez dr Mirosława Śmietańskiego. Zaobserwowałam, że wraz ze wzrostem ilości analogu ATP α S D1 użytego do reakcji poliadenylacji, ilość AMPS otrzymanego po trawieniu mRNA wzrasta proporcjonalnie. Takie mRNA poddano badaniom biologicznym w celu charakteryzowania ich właściwości (Rozdział 5.6.6). Jak pokazały dotychczasowe eksperymenty z sukcesem można otrzymać mRNA zawierające modyfikacje tiofosforanową w obrębie ogona poli(A). W następnym kroku zadałam sobie pytanie czy również analog ATP zawierający boranofosforan może być substratem dla polimerazy PAP.

5.6.5. RNA zawierające boranofosforan uwalniają AMPH jako produkt degradacji

Po sprawdzeniu, że zaprezentowana metoda otrzymywania i analizy RNA z modyfikacją tiofosforanową działa, następnym krokiem było zbadanie modyfikacji boranofosforanowej. Reszta boranofosforanowa ma podobne właściwości strukturalne oraz ładunek jak tiofosforan oraz charakteryzuje się odpornością na nukleazy.²²⁷ Jak wspomniałam w jednym z wcześniejszych rozdziałów podczas optymalizacji metody okazało się, że związek znakowany tlenem 18 AMPBH₃ był niestabilny chemicznie, a zatem nie mógł być stosowany jako wzorzec. Ponadto zaobserwowałam, że głównym produktem trawienia enzymatycznego RNA nie był AMPBH₃ ale H-fosfoanien adenozyiny (AMPH), dlatego jego znakowany tlenem

18 odpowiednik użyty był jako wzorzec wewnętrzny do oznaczania ilościowego AMPH i AMPBH₃. W celu zbadania specyficzności substratowej polimerazy PAP względem ATPαBH₃ D1 i D2 zsyntetyzowałam RNA E1. Ze względu na niestabilność chemiczną boranofosforanów i możliwość uwalniania AMP, modelowe RNA zostało zsyntetyzowane w nieco inny sposób. RNA E1 zawierało fragment RNA (RNA E) bez A w sekwencji oraz ogon poli(A), do którego syntezy użyto 8-deutero-ATP ([D]ATP) lub mieszaninę [D]ATP i odpowiedniego analogu ATPαBH₃ D1 lub D2. RNA E1 poddałam trawieniu mieszaniną SVPDE i CNOT7, a otrzymane produkty analizowałam za pomocą metody LC-MS/MS (Rysunek 67).

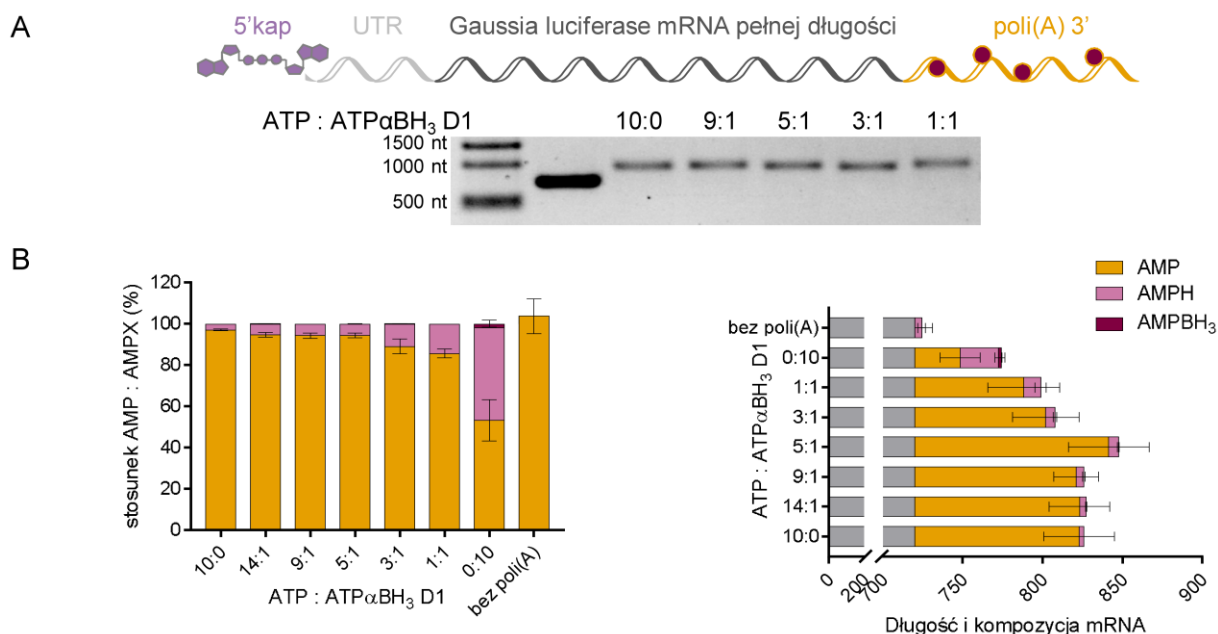


Rysunek 67. Produktem degradacji RNA z modyfikacją boranofosforanową jest AMPH. Na Rysunku przedstawiono wynik analizy RNA E1, które zawierało w sekwencji U zamiast A z ogonem poli(A), do którego syntezy użyto deuterowanego ATP oraz analogów ATP w różnych stosunkach ilościowych. (A) żel agarozowy przedstawiający produkty reakcji. (B) Ilości nukleotydów po trawieniu RNA wyznaczone metodą LC-MS znormalizowane do GMP. (C) średnia długość ogona poli(A) wyznaczona z eksperymentu. Strzelecka et al., 2020.²²²

Jako główny produkt degradacji obserwowałam AMPH, podczas gdy AMPBH₃ był ledwo obserwowany. AMPH otrzymywałam wtedy, kiedy do reakcji użyłam [D]ATP i analog ATPαBH₃ D1 w stosunku 1:1 lub 100% ATPαBH₃ D1. W przypadku RNA, do którego syntezy użyłam ATP i ATPαBH₃ D1 w stosunku 1:1, ilość zidentyfikowanego AMPH wynosi około 20%, co sugeruje, że boranofosforan jest wbudowywany przez PAP w mniejszym stopniu niż tiofosforan. Wyniki na wykresie B sugerują, że AMPH pojawia się również po trawieniu RNA, do którego syntezy użyłam 100% ATPαBH₃ D2, jednak wyniki obarczone są bardzo dużym błędem ze względu na bardzo krótki ogon poli(A) (~0-5 nukleotydów). Wyniki pokazują, że polimeraza PAP akceptuje ATPαBH₃ D1, jednak częstość wbudowywania jest niższa w porównaniu do ATPαS D1.

Zoptymalizowaną metodę użyłam następnie do analizy mRNA pełnej długości, które zawierało modyfikację boranofosforanową. To mRNA zostało otrzymane przez dr Mirosława

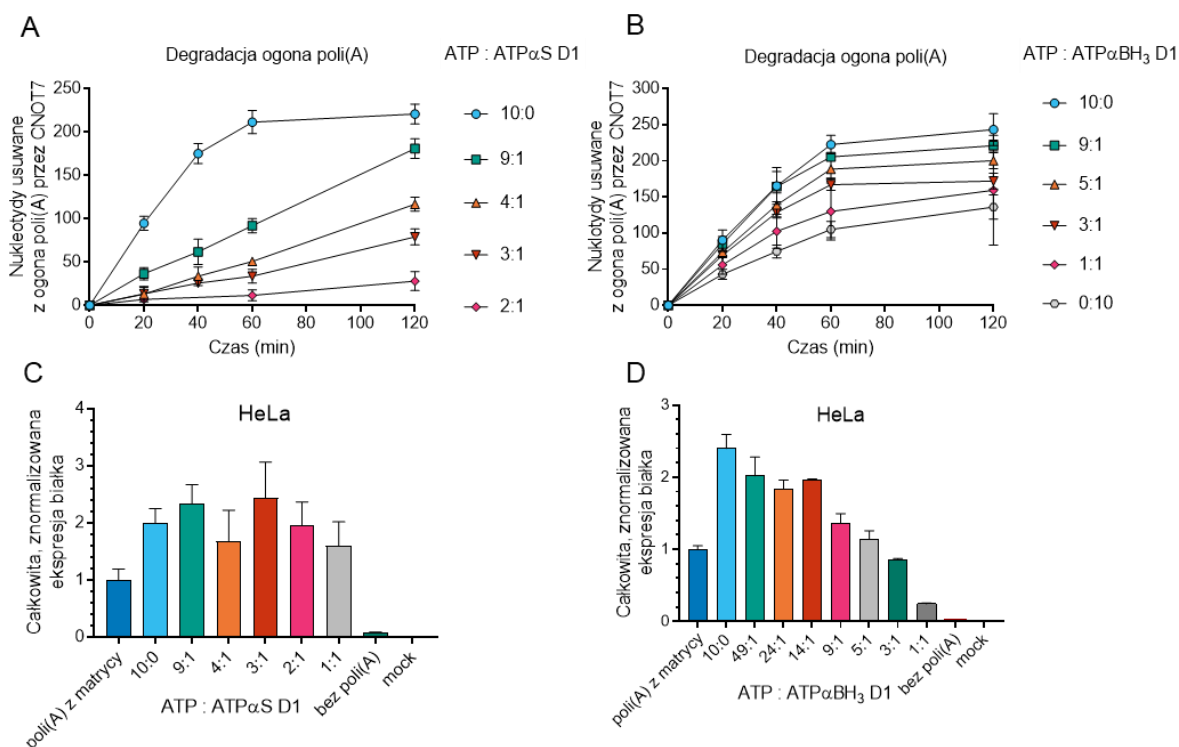
Śmietańskiego. Głównym produktem degradacji mRNA z modyfikacją boranofosforanową w tym przypadku był również AMPH. W tym eksperymencie również zidentyfikowałam nieznaczną ilość AMPBH₃. W tym przypadku nie zaobserwowałam wyraźnej tendencji elongacji ogona poli(A) wraz ze wzrostem zawartości modyfikacji, co więcej im większa zawartość modyfikacji tym ogon jest krótszy (Rysunek 68). mRNA następnie zostały poddane badaniom biologicznym w celu ustalenia zależności między zawartością modyfikacji, a funkcją.



Rysunek 68. Analiza mRNA do syntezy, którego użyty był różny stosunek ATP do ATPαBH₃. (A) Żele agarozowe przedstawiające produkty reakcji przygotowane przez Mirosława Śmietańskiego (B) Dane uzyskane z analizy LC-MS. Zawartość procentowa nukleotydów adeninowych oraz średnia długość łańcucha poli(A) otrzymana z analizy LC-MS. Strzelecka et al., 2020.²²²

5.6.6. Związek między składem mRNA, a jego właściwościami biologicznymi

mRNA, zawierające modyfikacje tiofosforanową i boranofosforanową, scharakteryzowane za pomocą LC-MS/MS były następnie poddane badaniom biologicznym w kierunku odporności na degradację przez deadenylazy oraz wpływu na wydajność translacji. Badania te wykonywali dr Paweł Sikorski i dr Mirosław Śmietański. Eksperyment odporności mRNA na degradację polegał na obserwacji skracania przez enzym CNOT7 długości ogona poli(A) w różnych punktach czasowych (Rysunek 69). Zaobserwowano, że skracanie łańcucha poli(A) jest wolniejsze wraz ze wzrostem zawartości modyfikacji. Zarówno w przypadku modyfikacji tiofosforanowej jak i boranofosforanowej. Z tym, że efekt ten w przypadku mRNA z modyfikacją boranofosforanową jest mniejszy. Następnie zbadano wpływ modyfikacji obecnych w poli(A) na ekspresję białka w komórkach. W eksperymencie zliczana była ilość lucyferazy Gaussia, produkowana przez modyfikowane mRNA w komórkach. Na wykresach C i D na Rysunku 69 została przedstawiona znormalizowana, całkowita ilość lucyferazy, która powstała w komórkach. Nie widać różnic istotnych statystycznie między mRNA niemodyfikowanym i zawierającym modyfikacje.



Rysunek 69. Analiza mRNA zawierających modyfikacje tiofosforanową (A,C) i boranofosforanową (B,D). Podatność na deadenylację mRNA z modyfikacją tiofosforanową (A) i boranofosforanową (B) oszacowane jako liczba nukleotydów usunięta przez CNOT7 w określonych punktach czasowych. Wyniki otrzymane przez dr Mirosława Śmiałeńskiego. (C i D) całkowita ekspresja białka zliczona przez 4 dni. Wyniki otrzymane przez dr Pawła Sikorskiego. Strzelecka et al., 2020.

Dotychczasowe eksperymenty biologiczne pokazały zatem, że obecność modyfikacji, w szczególności tiofosforanowej w obrębie ogona poli(A) znacząco poprawia stabilność mRNA w stosunku do niemodyfikowanego mRNA, a co więcej takie mRNA ulegają w komórkach ekspresji podobnie jak niemodyfikowane. Te obserwacje czynią z otrzymanych mRNA użyteczne narzędzia biologiczne oraz potencjalnych kandydatów do przyszłego rozwoju terapii opartych na mRNA.

5.6.7. Podsumowanie rozdziału

Zaproponowana przeze mnie metoda umożliwiła zbadanie efektywności działania trzech polimeraz RNA oraz ich użyteczności w syntezie eukariotycznych mRNA modyfikowanych w obrębie wiązań fosfodiesterowych. Wyniki sugerują, że polimerazy mają podobne powinowactwo względem ATP jak i izomeru D1 ATP α S, jednak polimeraza PAP akceptuje analog ATP tylko wtedy, kiedy w reakcji obecne jest niemodyfikowane ATP. Analogi zawierające grupę BH₃ są wbudowywane przez PAP z nieco mniejszą efektywnością. Polimeraza PAP była po raz pierwszy badana w tym kontekście. Opracowana metoda została zastosowana do analizy efektywności wprowadzania modyfikacji tiofosforanowych oraz boranofosforanowych w obrębie krótkich RNA oraz dłuższych zawierających ogon poli(A) oraz pełnej długości mRNA. Ponadto otrzymane dane umożliwiają wyznaczenie średniej długości ogona poli(A).

Opracowana metoda umożliwia w sposób pośredni ustalenie częstotliwości wbudowywania modyfikowanych nukleotydów przez polimerazy, przez co pozwala na badanie zależności pomiędzy składem, a funkcją RNA. mRNA modyfikowane w obrębie ogona poli(A), których skład ustaliłam za pomocą metody LC-MS/MS zostały poddane badaniom biologicznym w celu scharakteryzowania ich podatności na degradację enzymatyczną oraz wydajność translacji. Dotychczasowe wyniki pokazały, że mRNA zawierające modyfikacje tiofosforanową w obrębie ogona poli(A) są mniej podatne na degradację enzymatyczną, przez co stabilizują mRNA. Podatność na degradację maleje wraz ze zwiększającą się zawartością modyfikacji w ogonie poli(A). Warto zauważyć, że osiągnięcie niemal całkowitej odporności na degradację możliwe jest już przy zawartości modyfikacji wynoszącej jedynie 6%. Dzięki temu, takie mRNA ma wysoki potencjał do zastosowania w terapii genowej jako szczepionki.

6. PODSUMOWANIE

Badania realizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej w założeniu były interdyscyplinarne i łączyły w sobie takie dziedziny nauki jak biofizyka, chemia oraz biologia strukturalna. Związki otrzymane w wyniku syntezy chemicznej stanowiły narzędzie do badania obiektów biologicznych oraz procesów z nimi związanych. W całej pracy kluczowym elementem była technika spektrometrii mas, stąd też na zastosowanie i rozwój tej metody został postawiony największy nacisk. Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie metod w oparciu o technikę LC-MS/MS, do badania nukleotydów i RNA oraz stworzenia narzędzi do analizy procesów, w które te cząsteczki są zaangażowane. Uzyskane wyniki pozwoliły m. in. na głębsze zrozumienie procesów fragmentacji nukleotydów za pomocą spektrometrii mas, badanie metabolizmu nukleotydów w ekstraktach komórkowych, w szczególności śledzenie procesu degradacji kapu i identyfikację jego metabolitów oraz badanie wpływu inhibitorów enzymów zaangażowanych w ten proces. Ponadto niniejszy projekt doktorski obejmował zaprojektowanie metody służącej do analizy składu RNA w szczególności ogona poli(A).

Omawiany projekt składał się z dwóch głównych części – badania jakościowe nukleotydów obejmujące analizę fragmentacji oraz badania LC-MS/MS obejmujące projektowanie metod i wykorzystanie ich do analizy nukleotydów i RNA.

Do głównych wyzwań badań jakościowych należało zbadanie szerokiej bazy nukleotydów zarówno odpowiedników naturalnie występujących nukleotydów jak i ich syntetycznych analogów, które dotąd nie zostały zidentyfikowane w organizmach żywych. W sumie z badałam ponad 150 różnych nukleotydów. Na podstawie prostych przykładów sformułowałam wstępne hipotezy dotyczące propozycji ścieżek fragmentacji i struktury jonów fragmentacyjnych, które następnie weryfikowałam poprzez analizę nukleotydów znakowanych izotopowo oraz o bardziej skomplikowanej strukturze. Badania pozwoliły na zrozumienie ścieżek fragmentacji nukleotydów oraz sformułowanie ogólnych reguł rządzących procesem fragmentacji. Ponadto pokazałam, że możliwe jest wskazanie rodzaju i pozycji modyfikacji, stwierdzenie czy badany nukleotyd jest mono-, di- czy trifosforanem, rozróżnienie związków izobarycznych, czyli takich, które posiadają tą samą masę nominalną, ale inny skład atomowy. Co więcej, dogłębna analiza widm fragmentacyjnych pokazała, że możliwe jest rozróżnianie strukturalnie zbliżonych izomerów, co nie jest możliwe przy wykonaniu tylko widma MS nawet wysokiej rozdzielczości, gdyż związki izomeryczne mają ten sam skład atomowy. Pokazałam również, że względne stosunki intensywności jonów fragmentacyjnych nie są zależne od warunków prowadzenia analizy takich jak: szybkość przepływu, rodzaj rozpuszczalnika, stężenie analizatora oraz rodzaj analizatora. Otrzymane widma MS/MS mononukleotydów wraz ze strukturą jonów fragmentacyjnych zostały zdeponowane w bazie *msTide* dostępnej online (www.mstide-db.com). Trwają prace nad dalszym rozwojem tego narzędzia w kierunku rozszerzenia je o widma MS/MS dinukleotydów. Wyniki otrzymane w tej części projektu mogą służyć identyfikacji metabolitów nukleotydów, w tym leków i proleków pochodzenia nukleotydowego poszukiwaniu nowych naturalnych modyfikacji nukleotydów, identyfikacji nukleotydów w próbkach biologicznych, które mogą być biomarkerami chorób oraz w szybkiej identyfikacji produktów syntezy chemicznej.

Poznanie ścieżek fragmentacji było bardzo pomocne w kolejnej części niniejszego projektu doktorskiego, który obejmował projektowanie metody LC-MS/MS do analizy metabolizmu kapu i jego metabolitów w ekstraktach z komórek HEK 293. Do głównych elementów tego projektu należały synteza związków będących analogami kapu i jego potencjalnych produktów degradacji, w tym związków znakowanych deuterem (w sumie otrzymałam 18 związków wzorcowych). Do głównych wyzwań tego projektu należało odpowiednie dobranie warunków rozdziału badanych analitów oraz zoptymalizowanie parametrów MS. Opracowana metoda posłużyła do monitorowania degradacji analogów kapu w ekstrakcie komórkowym, a następnie do analizy wpływu 4 inhibitorów wybranych enzymów na procesy degradacji (oraz około 10 innych potencjalnych inhibitorów, które nie zostały włączone w zakres rozprawy). Badania potwierdziły, że głównym enzymem zaangażowanym w proces degradacji kapu jest enzym DcpS, a ostatecznym produktem degradacji mono- i dinukleotydowych pochodnych kapu jest 7-metyloguanina. Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowałam ścieżki degradacji kapu z uwzględnieniem głównych metabolitów i enzymów biorących udział w każdym z etapów. Rezultaty te umożliwiają lepsze zrozumienie procesu degradacji kapu, identyfikację kluczowych jej etapów i najważniejszych enzymów, a tym samym wskazują potencjalne cele molekularne, na które można wpływać, aby selektywnie hamować wybrane procesy degradacji kapu w celach badawczych i terapeutycznych. Badania te mogą przyczynić się do bardziej racjonalnego projektowania analogów kapu odpornych na degradację oraz syntezy inhibitorów enzymów zaangażowanych w proces degradacji w celu poprawy ich selektywności i efektywności.

W niniejszej pracy oprócz właściwości końca 5' mRNA badałam właściwości mRNA modyfikowanych na końcu 3', czyli w obrębie ogona poli(A). Celem tej części było otrzymanie modelowych RNA (ponad 30 różnych 35-nukleotydowych RNA oraz kilkadziesiąt fragmentów RNA z ogonem poli(A)), na podstawie których zaprojektowałam metodę LC-MS/MS do analizy składu pełnej długości mRNA. Opracowana metoda polegała na otrzymaniu RNA bez modyfikacji oraz zawierającego modyfikacje tiofosforanową lub boranofosforanową w obrębie całego RNA lub tylko ogona poli(A). Takie RNA otrzymane w procesie transkrypcji *in vitro* i enzymatycznej poliadenylacji następnie trawiłam enzymatycznie w celu otrzymania pojedynczych monofosforanów nukleozydów, których ilość analizowałam za pomocą opracowanej metody LC-MS/MS. Stosunek ilości nukleotydów niemodyfikowanych i modyfikowanych pozwolił na określenie efektywności wbudowywania analogów ATP do RNA lub ogona poli(A), a tym samym pozwolił scharakteryzować specyficzność substratową używanych polimeraz. Scharakteryzowane za pomocą metody LC-MS/MS mRNA były następnie poddane badaniom biologicznym w kierunku zweryfikowania ich odporności na degradację enzymatyczną i zbadania poziomu translacji. Okazało się, że mRNA zawierające modyfikacje tiofosforanową są bardziej odporne na degradację niż mRNA nieposiadające modyfikacji w obrębie ogona poli(A), co może stabilizować strukturę całego mRNA. Tym samym odpowiednio zaprojektowane mRNA modyfikowane resztami tiofosforanowymi są kandydatami do zastosowań w terapii genowej, w tym opartych na mRNA szczepionek przeciwwirusowych lub przeciwnowotworowych. Dotychczas obawiano się, że analogi zawierające siarkę są nienaturalne, dlatego ryzyko nietolerancji ze strony układów biologicznych było znaczne. Jednak ostatnio pojawiła się praca,¹⁸⁶ w której zidentyfikowano, że zarówno w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych modyfikacja ta występuje

naturalnie. Fakt ten stwarza jeszcze większe możliwości aplikacyjne dla otrzymanych analogów RNA.

Efektem projektu jest zestaw uniwersalnych metod opartych na spektrometrii mas, które rozszerzyły repertuar narzędzi do badania nukleotydów i kwasów nukleinowych i umożliwiły dogłębne poznawanie ich właściwości, potencjału biologicznego oraz terapeutycznego. Efekty projektu mogą mieć istotne znaczenie dla dalszego pogłębiania wiedzy o procesach degradacji mRNA (a w szczególności roli końców 3' i 5' w tych procesach) oraz rozwoju terapii genowej opartej o RNA, w tym efektywniejszych szczepionek przeciwnowotworowych. Przygotowane metody umożliwiają badanie struktury potencjalnych leków jak również identyfikację ich metabolitów, co może służyć lepszemu poznaniu procesów związanych z metabolizmem RNA, które znajdują się aktualnie w głównym nurcie badań nad regulacją ekspresji informacji genetycznej w organizmach żywych, a tym samym przyczynią się do projektowania nowych związków, które mają szansę w przyszłości stać się skutecznymi lekami. Wyniki otrzymane w pracy przyczyniły się nie tylko do poszerzenia wiedzy w zakresie nukleotydów i kwasów nukleinowych, ale również do rozwoju metodologii spektrometrii mas, która jest obecnie kluczową techniką w badaniu biomolekuł.

7. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

7.1. Informacje ogólne

7.1.1. Reagenty i odczynniki

Rozpuszczalniki oraz odczynniki o wysokiej czystości (MS-grade) takie jak metanol, acetonitryl, octan amonu, reagenty wyjściowe (modyfikowane nukleozydy, ATP itp.) i inne reagenty chemiczne np. N,N-dimetylkoheksyloamina (DMH), 97% H_2^{18}O zostały zakupione z Sigma Aldrich. W eksperymentach biologicznych stosowano handlowo dostępne odczynniki dedykowane badaniom biologicznym. Enzymy takie jak polimerazy SP6i T7 były zakupione z Thermo Fisher Scientific, a polimeraza PAP została zakupiona z Lucigen, enzym SVPDE z Sigma Aldrich, a CNOT7 był dostarczony przez dr Mirosława Śmiałńskiego. Wszystkie badania prowadzone były z wykorzystaniem wody ultraczystej miliQ.

7.1.2. Chromatografia kolumnowa na złożu jonowymiennym

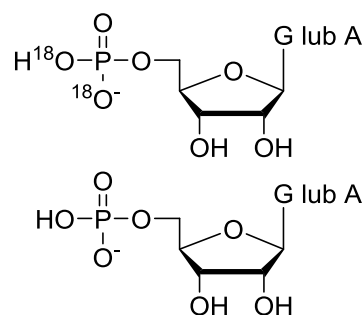
Wybrane nukleotydy były oczyszczane za pomocą jonowymiennej chromatografii na złożu DEAE-Sephadex A-25 (w formie HCO_3^-). Po nałożeniu mieszaniny poreakcyjnej na kolumnę i przemyciu wodą, pożądaný produkt eluowano w liniowym gradiencie buforu TEAB w wodzie dejonizowanej. Używano buforu TEAB (wodnego roztworu wodorowęglanu trietyloamoniowego) o odpowiednim stężeniu, uzyskiwanym po rozcieńczeniu przechowywanego w temp. 4°C buforu wyjściowego o stężeniu 1,2 M: 0 – 0,6 M dla monofosforanów nukleozydów, 0 – 0,8 M dla difosforanów nukleozydów, 0 – 1,0 M dla trifosforanów nukleozydów lub 0 – 1,2 M dla tetrafosforanów nukleozydów. Frakcje zawierające pożądaný analizowano spektrofotometrycznie ($\lambda = 260 \text{ nm}$) oraz technikami HPLC i MS. Frakcje zawierające produkt były łączone i odparowywane pod zmniejszonym ciśnieniem, a pod koniec z kilkoma porcjami etanolu w celu rozłożenia buforu TEAB, a następnie acetonitrylu w celu wytrącenia osadu produktu w postaci soli trietyloamoniowej. Związki przechowywano w temp. -20°C.

7.2. Syntezy chemiczne

7.2.1. Nukleotydy

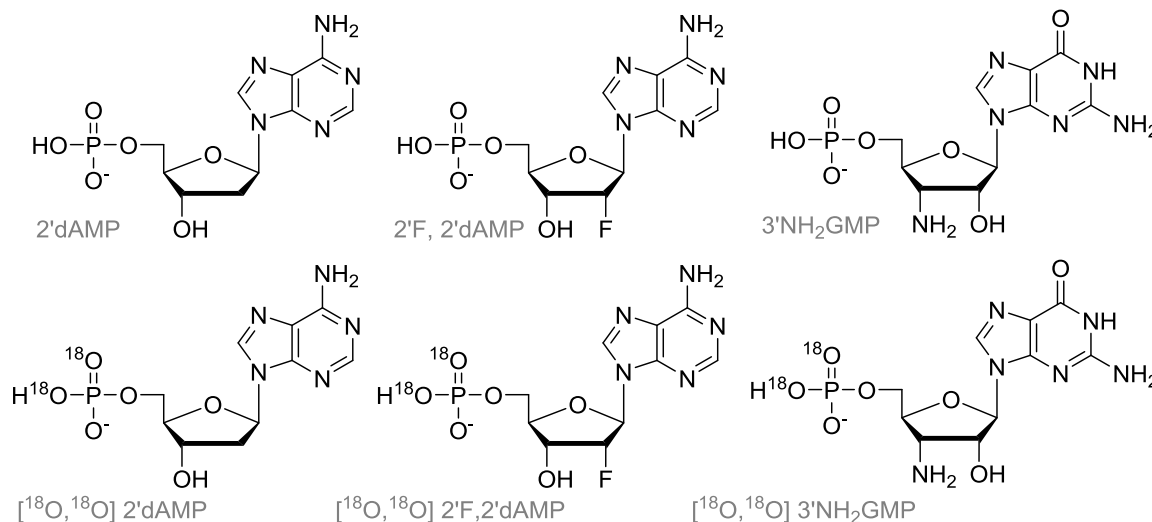
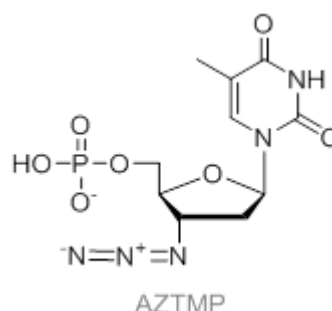
7.2.1.1. 5'-monofosforany nukleozydów: AMP (16), [^{18}O , ^{18}O]AMP (11), GMP (17), [^{18}O , ^{18}O]GMP (15) i inne.

Proces 5'fosforylacji nukleozydów był wykonany metodą Yoshikawy jak opisano wcześniej.²⁰³ Odpowiedni nukleozyd (0,01 mmol) był rozpuszczony w fosforanie trimetylu (0,5 ml). Reakcja była prowadzona w 0 °C. Następnie do reakcji dodano POCl_3 (0,03 mmol). Reakcja była monitorowana za pomocą HPLC korzystając z warunków opisanych w Tabeli 5. Reakcję kończono dodając 97% H_2^{18}O lub H_2O , kiedy analiza wykazała 60 do 90% zawartości produktów w mieszaninie reakcyjnej. Produkty były oczyszczane metodą HPLC (Tabela 5). Strukturę



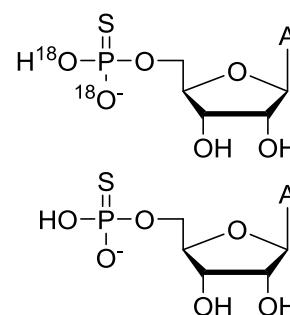
produktu potwierdzano poprzez pomiar masy i wykonanie widma fragmentacyjnego MS/MS. Czystości i zawartość poszczególnych izotopów była analizowana za pomocą MS. Analiza potwierdziła, że produkty otrzymane w wyniku hydrolizy wodą znakowana zawierały przynajmniej 87% spodziewanego podwójnie znakowanego produktu [^{18}O , ^{18}O], 12% pojedynczo znakowanego [^{18}O] i mniej niż 1% nieznakowanego.

Powyższą procedurę zastosowano również do otrzymania następujących nukleotydów: 2'-dAMP; [^{18}O , ^{18}O]2'-dAMP; AZTMP; 2'-F, 2'-dAMP; [^{18}O , ^{18}O]2'-F, 2'-dAMP; 3'-NH₂GMP; [^{18}O , ^{18}O]3'-NH₂GMP.



7.2.1.2. 5'- monotiofosforan adenozyzny: AMPS (18), [^{18}O , ^{18}O]AMPS (13)

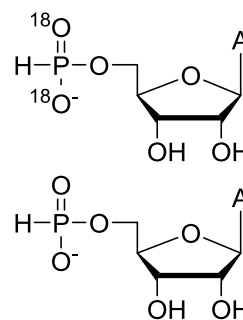
Proces 5'tiofosforylacji adenozyzny był wykonany metodą jak opisano wcześniej.²²⁸ Adenozyzna (0,01 mmol) była rozpuszczona w fosforanie trimetylu (5 ml). Reakcja była prowadzona w 0°C. po 5 min do reakcji dodano 2,6-lutydynę (0,04 mmol) oraz PSCl₃ (0,03 mmol). Reakcja była monitorowana za pomocą HPLC (Tabela 5) i zakończona po 6 h przez dodatek 97% H₂¹⁸O lub H₂O, kiedy analiza wykazała 60 do 90% zawartości produktów w mieszaninie reakcyjnej. Produkty były oczyszczane za pomocą HPLC (Tabela 5). Strukturę produktu potwierdzano



poprzez pomiar masy i wykonanie widma fragmentacyjnego MS/MS. Czystość i zawartość poszczególnych izotopów była analizowana za pomocą MS. Analiza potwierdziła, że produkty otrzymane w wyniku hydrolizy wodą znakowaną zawierały przynajmniej 87% spodziewanego podwójnie znakowanego produktu [^{18}O , ^{18}O], 11% pojedynczo znakowanego [^{18}O] i mniej niż 2% nieznakowanego.

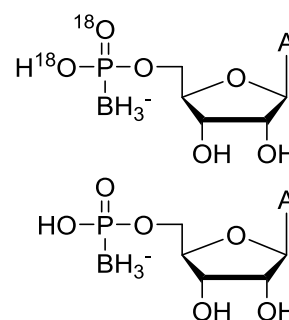
7.2.1.3. 5'-O-H-fosfonian adenozy: AMPH (19), [^{18}O , ^{18}O] AMPH (12)

5'-O-H-fosfoniany adenozy były syntetyzowane jak opisano wcześniej.⁸⁵ 2',3'-O-izopropylideno adenozy (0.65 mmol) była rozpuszczona w fosforanie trimetylu (3 ml). Reakcja była prowadzona w 0°C. Następnie dodano PCl_3 (1.95 mmol). Reakcja była monitorowana za pomocą HPLC (Tabela 5). Po 0,5 h reakcja była zakończona przez dodatek 97% H_2^{18}O lub H_2O . Następnie dodano NaHCO_3 w celu zneutralizowania pH reakcji. Reakcja była prowadzona przez 6 h w temperaturze pokojowej w celu usunięcia zabezpieczających grup izopropylidenowych. Produkt reakcji oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5). Otrzymany produkt potwierdzony był poprzez pomiar masy i wykonanie widma fragmentacyjnego MS/MS. Czystości i zawartość poszczególnych izotopów były analizowane za pomocą MS. Analiza potwierdziła, że produkty otrzymane w wyniku hydrolizy wodą znakowaną zawierały przynajmniej 84% spodziewanego podwójnie znakowanego produktu [^{18}O , ^{18}O], 10% pojedynczo znakowanego [^{18}O] i mniej niż 6% nieznakowanego.



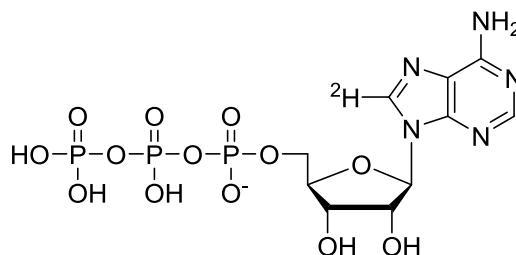
7.2.1.4. 5'-O-monoboranofosforany adenozy: AMPBH₃ (20), [^{18}O , ^{18}O] AMPBH₃ (14)

5'-O-monoboranofosforany adenozy były otrzymane jak opisano wcześniej.⁸⁵ 5'-O-H-fosforian adenozy lub [^{18}O , ^{18}O] 5'-O-H-fosforian adenozy (0,06 mmol) był rozpuszczony w acetonitrylu (1ml). Reakcja była prowadzona w warunkach beztlenowych w atmosferze argonu. Następnie za pomocą strzykawki dodany był N,O-bis(trimetylosilylo) acetamid (BSA, 1,2 mmol), a po 30 minutach prowadzenia reakcji dodano $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ (0,12 mmol) i mieszano przez 30 min. Pożądany produkt był uwalniany po dodaniu mieszaniny TEA/metanol. Roztwór był odparowany do sucha i 3 razy odparowywany z metanolem. Produkt reakcji oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5). Strukturę produktu potwierdzano poprzez pomiar masy i wykonanie widma fragmentacyjnego MS/MS. Czystości i zawartość poszczególnych izotopów była analizowana za pomocą MS. Analiza potwierdziła, że produkty otrzymane w wyniku hydrolizy wodą znakowaną zawierały przynajmniej 99% spodziewanego podwójnie znakowanego produktu [^{18}O , ^{18}O].



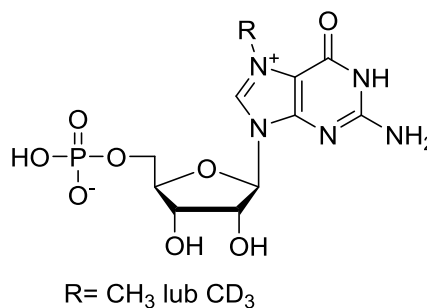
7.2.1.5. 5'-O-trifosforan- 8-deuteroadenozyny: [D]ATP (21)

Sól sodowa 5'-trifosforanu adenozy (3 mg) była rozpuszczona w 1 ml D₂O. TEA była dodana do pH 10. Mieszanina była trzymana w 60°C. Postęp wymiany wodoru na deuter był kontrolowany za pomocą MS. Po 6 dniach i trzykrotnej liofilizacji i wymianie rozpuszczalnika - D₂O (pH 10), wydajność wymiany wynosiła 94%. Produkt był oczyszczany za pomocą HPLC (Tabela 5).

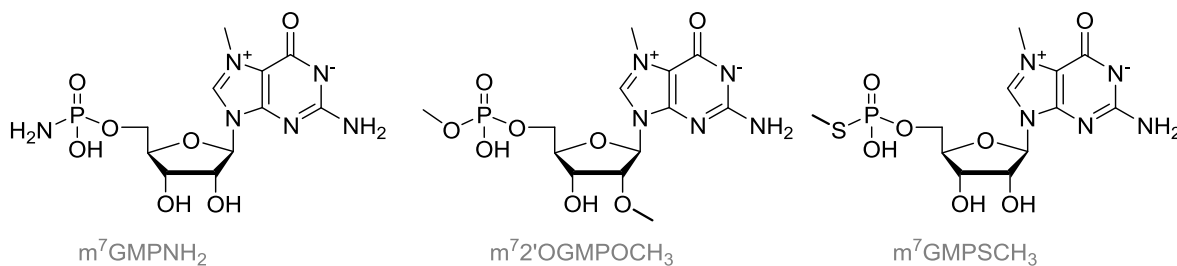


7.2.1.6. 5-monofosforan-7-metyloguanozyny: [D₃]m⁷GMP (2), m⁷GMP (22)

5-monofosforan-7-metyloguanozyny był otrzymany jak opisano wcześniej.²²⁹ 5 mg nukleotydu (GMP+TEA, M=463,4 g/mol) rozpuszczono w 1,5 ml DMSO. Po około 5 min mieszanina dodano 8 eq (5,4 µl) jodku metylu zawierającego 3 atomy deuteru lub jodku metylu nieznakowanego. Reakcje zakończono po 3 h dodając 25 ml wody MQ. Następnie wykonano przemycie eterem po czym dodano odrobinę NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5).

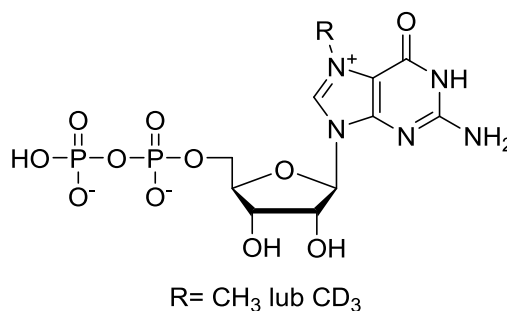


Podobnie były otrzymane następujące związki: m⁷GMPNH₂, m^{7,2'-O}GMPOCH₃, m⁷GMPSCH₃.



7.2.1.7. 5-difosforan-7-metyloguanozyny: [D₃]m⁷GDP (3), m⁷GDP (23)

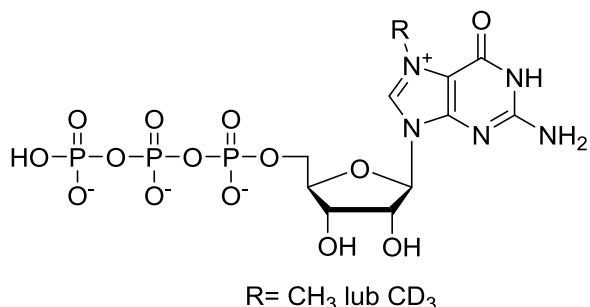
5-difosforan-7-metyloguanozyny był otrzymany jak opisano wcześniej.²²⁹ 5 mg nukleotydu (GDP+TEA, M=645,6 g/mol) rozpuszczono w 2,5 ml DMSO. Po około 5 min mieszanina dodano 8 eq (3,9 µl) jodku metylu zawierającego 3 atomy deuteru lub jodku metylu nieznakowanego. Reakcje zakończono po 3 h dodając 25 ml wody MQ. Następnie wykonano



przemycie eterem po czym dodano odrobinę NaHCO_3 . Otrzymany produkt oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5).

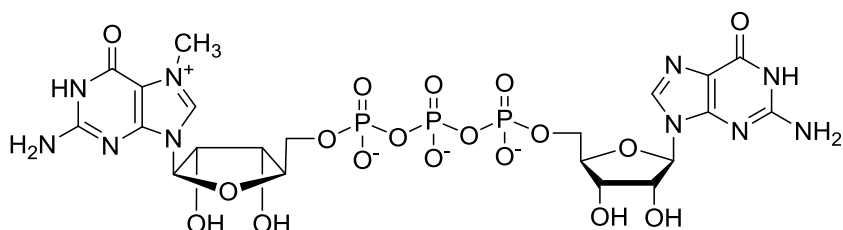
7.2.1.8. 5-trifosforan-7-metyloguanozyny: $[\text{D}_3]\text{m}^7\text{GTP}$ (4), m^7GTP (24)

5-trifosforan-7-metyloguanozyny był otrzymany jak opisano wcześniej.²²⁹ 5 mg nukleotydu ($\text{GTP} + \text{TEA}$, $M = 826,7$ g/mol) rozpuszczono w 2,5 ml DMSO. Po około 5 min mieszanina dodano 8 eq (3,0 μl) jodku metylu zawierającego 3 atomy deuteru lub jodku metylu nieznakowanego. Reakcje zakończono po 3 h dodając 25 ml wody MQ. Następnie wykonano przemycie eterem po czym dodano odrobinę NaHCO_3 . Otrzymany produkt oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5).



7.2.1.9. P1-(N7-metyloguanozyn-5'-yno)-P3-guanozyn-5'-yno trifosforan: $[\text{D}_3]\text{m}^7\text{GpppG}$ (5), m^7GpppG (6)

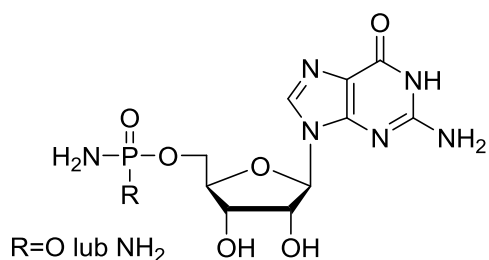
m^7GpppG był otrzymany na podstawie procedury opisanej wcześniej.²²⁹ 4,4 mg nukleotydu ($\text{GpppG} + \text{TEA}$,



$M = 1091,4$ g/mol) rozpuszczono w 2,5 ml DMSO. Po około 5 min dodano 16 eq (4,0 μl) jodku metylu zawierającego 3 atomy deuteru lub jodku metylu nieznakowanego. Reakcje zakończono po 2h dodając 9 ml wody MQ. Następnie wykonano przemycie eterem po czym dodano odrobinę NaHCO_3 . Otrzymany produkt oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5).

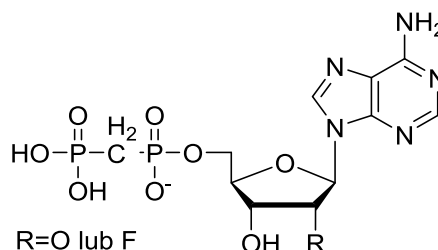
7.2.1.10. 5'amidofosforan guanozyny: $\text{GMP}(\text{NH}_2)_2$, GMPNH_2

5'amidofosforylacja guanozyny była wykonana według procedury opisanej w punkcie 7.2.1.1 z wyjątkiem tego, że reakcja była zakończona 25% roztworem amoniaku i zneutralizowana do pH 7 kwasem octowym.



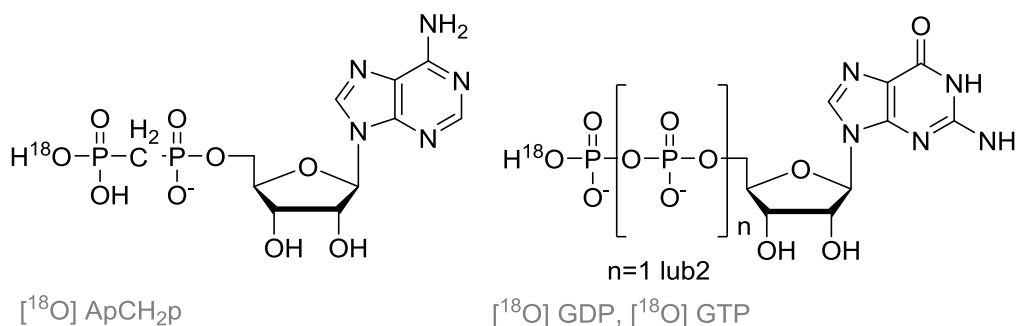
7.2.1.11. 5'-bisfosforany nukleozydów: ApCH₂p, 2'-F,2'-dApCH₂p

Synteza 5'-bisfosforanów nukleozydów była wykonana jak opisano wcześniej.²³⁰ Syntezę wykonano według procedury opisanej w punkcie 7.2.1.1 z tą różnicą, że do reakcji wzięto CH₂(POCl₂)₂ (0.015 mmol) zamiast POCl₃.



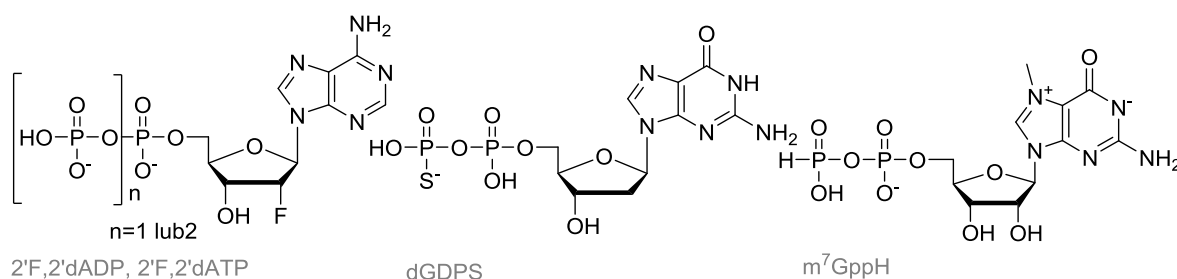
7.2.1.12. Hydroliza P-imidazolidów

Odpowiednia pochodna imidazolowa nukleotydu była rozpuszczona w 97% H₂¹⁸O. Reakcja była doprowadzona do pH 2 za pomocą HCl. Kiedy hydroliza zaszła całkowicie, pH reakcji było doprowadzone do 5-6 używając NaOH. Oczekiwany produkt β-[¹⁸O]-znakowany nukleotyd był oczyszczany używając HPLC (Tabela 5).



7.2.1.13. Sprzęganie P-imidazolidu w obecności jonów metalu dwuwartościowego: 2'F, 2'dADP; 2'F,2'dATP; dGDPS; m⁷GppH

Sprzęganie P-imidazolidu w obecności metalu dwuwartościowego wykonano jak wcześniej opisano. P-imidazolowa pochodna nukleotydu (0,1 mmol) była rozpuszczona w

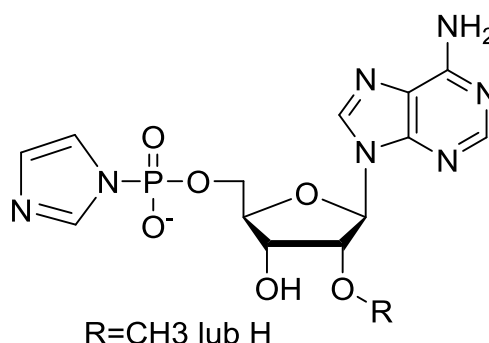
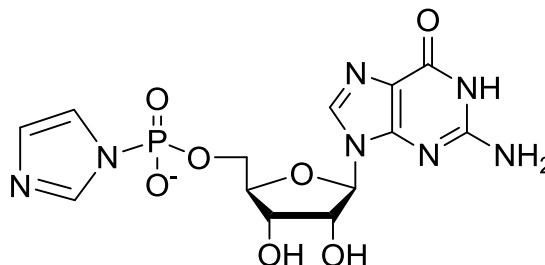


DMF. Następnie dodany był właściwy nukleofil: fosforan w postaci soli trietyloamoniowej, tiofosforan, H-fosfonian (0,2–0,4 mmol) oraz bezwodny ZnCl₂ (0.8 mmol). Postęp reakcji monitorowany był za pomocą HPLC. Reakcja była zakończona wodnym roztworem EDTA (0.8 mmol), a pH było doprowadzone do 6 używając NaHCO₃. Otrzymane produkty były oczyszczane z użyciem HPLC (Tabela 5).

7.2.1.14. Substraty do otrzymywania dinukleotydów

7.2.1.14.1. P-imidazolid 5' monofosforanu guanozyny, adenozyny i 2'O-metyloadenozyny: GMP-Im, AMP-Im, mAMP-Im

Sól trietyloamoniowa GMP (1,57 mmol) została rozpuszczona w DMF (10 ml). Następnie dodano imidazol (10eq, 15,7 mmol), 2,2'ditiopirydynę (3 eq, 4,7 mmol) i trietyloaminę (3 eq, 4,7 mmol). Po 5 minutach mieszania dodano trifenylofosfonę (3 eq, 4,7 mmol). Reakcję prowadzono 5 h, monitorując jej przebieg za pomocą HPLC. Reakcję zakończono, kiedy obserwowano konwersję substratu do produktu około 90%, dodając NaClO₄ (3 eq, 4,7 mmol) rozpuszczone w acetonie (obj. 10 razy większa niż DMF użytego do reakcji). Otrzymano osad przechowywano 1h w 4°C, a następnie odwirowano przez 6 min przy 6000 rpm. Osad przemywano acetonem i wirowano do momentu, kiedy uzyskał on barwę białą. Podobną procedurę zastosowano do otrzymania mAMP-Im, AMP-Im, z tą różnicą, że do reakcji wzięto AMP lub mAMP.

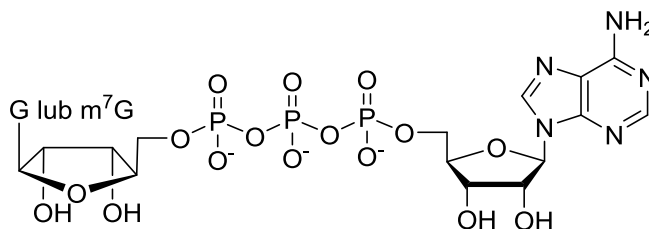


7.2.1.14.2. Pozostałe substraty: mAMP, AMP, GMP, m⁷GDP, GDP

Pozostałe substraty do syntezy dinukleotydów otrzymano jak opisano w poprzednich rozdziałach (mAMP, AMP, GMP – Rozdział 7.2.1.1, m⁷GDP – Rozdział 7.2.1.7, GDP – Rozdział 7.2.1.13) jednak na 10 razy większą skalę. Związki oczyszczano za pomocą chromatografii jonowymiennej (Rozdział 7.1.2).

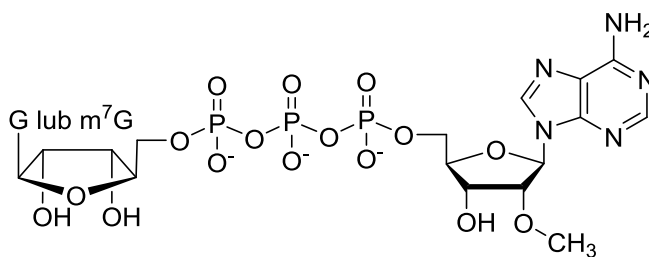
7.2.1.15. m⁷GpppA (7), GpppA (9)

m⁷GDP (0,0145 mmol) rozpuszczono w DMF (1 ml). Po 5 min dodano 8 eq ZnCl₂ (0,116 mmol) oraz 2 eq AMP-Im (0,029 mmol). Przebieg reakcji monitorowano za pomocą HPLC (Tabela 5). Reakcję prowadzono, do momentu kiedy konwersja substratów do produktów wynosiła około 85% (2,5 h). Reakcję zakończono, dodając roztwór EDTA równo molowy w stosunku do ZnCl₂ oraz zobojętniono NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5). Podobnie przebiegała synteza GpppA. Z tą różnicą, że do reakcji wzięto GDP zamiast m⁷GDP.



7.2.1.16. m^7 GpppA_m (8), GpppA_m (10)

m^7 GDP (0,0145 mmol) rozpuszczono w DMF (1 ml). Po 5 min dodano 8 eq ZnCl₂ (0,116 mmol) oraz 2 eq mAMP-Im (0,029 mmol). Przebieg reakcji monitorowano za pomocą HPLC (Tabela 5). Reakcje



przewodzą, do momentu kiedy konwersja substratów do produktów wynosiła około 95% (24 h). Reakcje zakończono, dodając roztwór EDTA równo molowy w stosunku do ZnCl₂ oraz zobojętniono NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczany był za pomocą HPLC (Tabela 5). Podobnie przebiegała synteza GpppA_m, z tą różnicą, że do reakcji wzięto GDP zamiast m^7 GDP.

7.2.2. Synteza oligonukleotydu na podłożu stałym (RNA C)

Synteza oligorybonukleotydu pG(CU)₅A₁₁, który użyty był do walidacji metody, była wykonana przez dr Marcina Warmińskiego metodą syntezy na podłożu stałym. Synteza wykonana była w skali 1 μmol używając aparatury AKTA Oligopilot plus 10 synthesizer (GE Healthcare) i Custom PrimerSupport™ Ribo A 40 (GE Healthcare). Do analizy LC-MS wzięto 20 ng oligoRNA i poddano reakcji enzymatycznej z użyciem SVPDE w warunkach przedstawionych w Rozdziale 5.6.2.3.

7.3. Badania biologiczne

7.3.1. Przygotowanie ekstraktów komórkowych HEK 293

Ekstrakty komórkowe HEK 293 (*Human embryonic kidney* 293) były przygotowane przez dr Pawła Sikorskiego i mgr Karolinę Kaczmańską na podstawie wcześniej opisanej procedury.²³¹

7.3.2. Reakcje w ekstraktach komórkowych HEK 293

Każda próbka zawierała 1 μl - 40 μM (stężenie końcowe 4 μM) roztworu odpowiedniego nukleotydu lub dinukleotydu (związki (25-32) 1 μl - 80 μM – stężenie końcowe 8 μM) oraz 9 μl ekstraktu. Przygotowano jedną próbkę z deaktywowanym termicznie ekstraktem i serie próbek, które były inkubowane: 0, 5, 30, 60, 200 min w 37°C. Reakcje były kończone przez zamrożenie w ciekłym azocie, następnie grzanie 5 min w 95°C, następnie wirowana i ponownie zamrożona w ciekłym azocie. próbki były rozmrażane przed analizą LC-MS/MS. Wyjątek stanowi m^7 GTP i [D] m^7 GTP. W tym przypadku reakcja była kończone przez zamrożenie w ciekłym azocie, następnie próbka była rozmrażana i od razu analizowana na LC-MS, z uwagi na zaobserwowaną degradację termiczną związku w 95°C. W niektórych wariantach do reakcji dodawano inhibitorów poszczególnych enzymów w stężeniach następujących RG3039 30 μM,

3-MeBn⁷GMP 1000μM, 7,8-dihydro-7,7-dimetylo-10-(4-chlorofenylo)-5H-indeno[1,2-b]chinolino-9,11(6H,10H)-dion (Fhit-inh) 125μM, 9-deazaguanina 1000μM.

7.3.3. Synteza i oczyszczanie RNA

Zestawienie RNA, o których mowa w pracy oraz ich zastosowanie znajduje się w [Tabeli 4](#). Szczegółowa procedura otrzymywania transkryptów opisana jest w Podrozdziałach poniżej.

Tabela 4. Zestawienie RNA omawianych w pracy

RNA	Sekwencja (5'koniec-5'-UTR- ORF-3'UTR- poli(A))	Sposób przygotowania	Zastosowanie
RNA A	GAAGAAGCGGGC AUGCGGCCAGCC AUAGCCGAUCA	IVT z użyciem SP6 Pol	Analiza wydajności wbudowywania analogów ATP
RNA A1	RNA A + poli(A)	Poliadenylacja niemodyfikowanego RNA A z użyciem polimerazy PAP	Analiza wydajności wbudowywania analogów ATP
RNA B	GGGGAAGCGGG CAUGCGGCCAGC CAUAGCCGAUCA	IVT z użyciem T7 Pol	Analiza wydajności wbudowywania analogów ATP
RNA C	GCUCUCUCUCUA AAAAAAAAAA	Synteza na podłożu stałym (niemodyfikowane)	Walidacja metody LC-MS/MS
RNA E	GGGGUUGCGGG CUUGCGGCCUG CCUUUGCCGUUC U	IVT z użyciem T7 Pol (niemodyfikowane)	Do przygotowania RNA E1
RNA E1	RNA D + poli(A)	Poliadenylacja niemodyfikowanego RNA D z użyciem PAP	Użyte jako kontrola degradacji modyfikowanych nukleotydów do AMP podczas trawienia RNA
RNA G (GLuc- 2- mRNA)	ARCA-(N ₁₃)-GLuc- (β-globin) ₂	IVT + SP6 Pol	Użyte jako substrat do syntezy RNA G1
RNA G1 (GLuc- 2- mRNA- polyA)	RNA G + poli(A)	Poliadenylacja niemodyfikowanego RNA G z użyciem PAP + różne stosunki ATP:ATPαS D1	Analiza wydajności wbudowywania analogów ATP oraz długości ogona poli(A)
RNA H (GLuc- 1- mRNA)	ARCA-(N ₁₃)-GLuc- (β-globin)	IVT + SP6 Pol	Użyte jako substrat do syntezy RNA H1
RNA H1 (GLuc- 1- mRNA- polyA)	RNA H + poli(A)	Poliadenylacja niemodyfikowanego RNA H z użyciem PAP + ATP, ATP:ATPαBH ₃ D1 lub ATPαBH ₃ D1	Analiza wydajności wbudowywania analogów ATP oraz długości ogona poli(A)

RNA I (GLuc- 2- mRNA- A128)	ARCA-(N₁₃)-GLuc- (β-globin)₂-A₁₂₈	IVT + SP6 RNA Pol	Użyte jako kontrola. Poli(A) zakodowane w matrycy
--	---	-------------------	--

7.3.3.1. Krótkie RNA (RNA A, RNA B)

Krótkie RNA były syntetyzowane na matrycy następujących oligonukleotydów 1) (CAGTAATACGACTCACTATAGGGGAAGCGGGCATGCGGCCAGCCATAGCCGATCA i TGATCGGCTATGGCTGGCCGCATGCCCCGCTTCCCCTATAGTGAGTCGTATTACTG)²³², które zawierały sekwencje promotorową T7 (TAATACGACTCACTATA) i kodowały 35 nukleotydowy fragment (GGGGAAGCGGGCATGCGGCCAGCCATAGCCGATCA); 2) (ATACGATTTAGGTGACACTATAGAAGAAGCGGGCATGCGGCCAGCCATAGCCGATCA i TGATCGGCTATGGCTGGCCGCATGCCCCGCTTCTTCTATAGTGTCACCTAAATCGTAT), które zawierały sekwencje promotorową SP6 (CGA TTTAGG TGACAC TATA) i kodowały 35 nukleotydowy fragment (GA AGAAGC GGGCAT GCGGCC AGCCAT AGCCGA TCA). Analogi ATP używane do otrzymywania RNA były syntetyzowane jak opisano wcześniej.^{84, 85} typowa reakcja transkrypcji in vitro (20 µl) była prowadzona w 37 °C przez 2 h i zawierała: bufor (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM spermidyny), 10 U/µl T7 lub 1 U/µl SP6, 1 U/µl RiboLock RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific), 0.5 mM CTP/UTP/GTP i różny stosunek ATP/ATPαX dający sumaryczne stężenie 0.5 mM oraz 0.4 µM matrycy oligonukleotydowej. Po 2 h do reakcji dodano 1 U/µl DNase I (ThermoFisher Scientific) po czym prowadzono reakcje jeszcze przez 30 min. Otrzymane transkrypty były oczyszczane przy użyciu RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research). Następnie transkrypty były sprawdzane podczas elektroforezy na 15 % żelu akrylamidowym. Stężenia były obliczane na podstawie metod spektrofotometrycznych. W celu usunięcia produktów ubocznych, RNA były izolowane z żelu przy użyciu buforu PAA (0.3 M octan sodu, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100), wytrącane izopropanolem i rozpuszczane w wodzie.

7.3.3.2. Krótkie RNA bez A w sekwencji (RNA D)

RNA były syntetyzowane na matrycy oligonukleotydów (CAGTAATACGACTCACTATAGGGGTTGCGGGCTTGCGGCCTGCCTTTGCCGTTCT i AGAACGGCAAAGGCAGGCCGCAAGCCCGCAACCCCTATAGTGAGTCGTATTACTG)²³², których sekwencja zawierała sekwencje promotorową T7 (TAATACGACTCACTATA) i 35 nukleotydową sekwencję kodującą (GGGGTTGCGGGCTTGCGGCCTGCCTTTGCCGTTCT). Reakcja transkrypcji in vitro (200 µl) była inkubowana w 37°C przez 3 h i zawierała: RNA Pol bufor (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM spermidyna), 10 U/µl T7, 1 U/µl RiboLock RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific), 5 mM CTP/UTP/GTP 1 µM matrycy oligonukleotydowej.

Po 2,5 h inkubacji dodawano 1 U/ μ l DNase I (ThermoFisher Scientific) po czym prowadzono reakcje jeszcze przez 30 min. Produkty były ekstrahowane używając mieszaniny fenol-chloroform, a następnie oczyszczane metodą HPL stosując następujące warunki: kolumna - Clarity 3 μ m Oligo-RP C18 (Phenomenex), eluent A: 50 mM trietyloamina i eluent; B 75% acetonitryl. Elucja odbywała się stosując następujący gradient: 0-5 min 95% A, 5-20 min 87,5% A, 20-21 min 50% A, przepływ 1ml/min. Otrzymane produkty były użyte do otrzymania RNA z ogonem poli(A) jak opisano poniżej.

7.3.3.3. Krótkie RNA z ogonem poli(A) (RNA A1, RNA D1)

Krótkie RNA z ogonem poli(A) były otrzymywane w reakcji poliadenylacji. Typowa mieszanina reakcyjna (20 μ l) była inkubowana w 37°C przez 1 h i zawierała: 1 μ g 35 nt RNA fragment, różny stosunek ATP([D]ATP)/ATP α X przy zachowaniu sumarycznego stężenia 1mM, 1 U/ μ l RiboLock RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific), bufor dedykowany do polimerazy PAP i polimerazę PAP (Lucigen) w stężeniu od 0,05 do 0,2 U/ μ l. Otrzymane RNA były oczyszczane z użyciem RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research). Otrzymane transkrypty były sprawdzane na 2% żelu agarozowym, a ich stężenie było obliczane na podstawie analizy spektrofotometrycznej.

7.3.3.4. mRNA (RNA G, RNA G1, RNA H, RNA H1, RNA I)

mRNA analizowane w pracy były dostarczone przez dr Mirosława Śmietańskiego.

7.3.4. Warunki degradacji enzymatycznej RNA

Typowa reakcja degradacji RNA (20 μ l) była wykonywana w 37°C przez 1 h i zawierała: (i) 20 ng RNA₃₅ (RNA A, RNA B), 3000 ng/ ml SVPDE, bufor SVPDE (1 mM MgCl₂, 5 mM Tris, pH 8,8), (ii) 20 ng RNA₃₅ z ogonem poli(A) (RNA A1, RNA D1) 40 ng (lub więcej ~120 ng, w przypadku modyfikacji boranofosforanowej) mRNA (RNA G1, H1, I), 9000 ng/ml SVPDE, 1 mg/ml CNOT7, bufor (5 mM MgCl₂, 10 mM Tris, pH 8,0, 50 mM KCl, 10 mM DTT). Reakcja była kończona przez zamrożenie w ciekłym azocie, podgrzanie do 95°C przez 5 min i ponowne zamrożenie w ciekłym azocie. Następnie próbki były analizowane za pomocą LC-MS. Każda próbka do analizy zawierała 20ng/40ng/120 ng RNA i 1 μ M odpowiedniego wzorca znakowanego izotopowo. Reakcje wykonywano w trzech powtórzeniach. Ilość enzymów do trawienia była na początku optymalizowana na modelowych RNA, żeby zapewnić całkowitą degradację RNA, ale wyeliminować degradację pojedynczych nukleotydów. Po degradacji próbki były sprawdzane za pomocą elektroforezy na 15% żelu poliakrylamidowym. Jeżeli było widać niedotrawione fragmenty procedura degradacji była optymalizowana indywidualnie dla poszczególnych próbek.

7.3.5. Warunki degradacji enzymatycznej sond fluorescencyjnych

1 μM roztwór $\text{ATPOC}_3(\text{Py})_2$ (synteza związku wykonana przez mgr Przemysława Wanata) w 50 mM Tris pH 8,0, 5 mM MgCl_2 był poddany hydrolizie przez enzym SVPDE (PDE-I) (99 ng/ml). Reakcja była prowadzona w 30 °C i wykonana w trzech powtórzeniach. Próbkę po 10 μl były pobierane z reakcji w następujących punktach czasowych: przed dodaniem enzymu (0 min), zaraz po dodaniu enzymu (1 min) i kolejno po 5, 10, 15, 30, i 60 min. Reakcja była kończona poprzez zamrożenie w ciekłym azocie. Każda próbka była rozmrażana zaraz przed analizą LC-MS.

7.4. Chromatografia i spektrometria mas

7.4.1. Spektrometr i chromatograf

Badania zaprezentowane w pracy były wykonane na tandemowych spektrometrach firmy Sciex, wyposażonych w jonizację typu elektrosprej (ESI) i analizatory: potrójny kwadrupol (API 3200) oraz potrójny kwadrupol, gdzie ostatni może służyć jako pułapka jonowa (QTrap 3200). Spektrometr QTrap 3200 jest połączony z chromatografem firmy Agilent Technologies wyposażony w pompe i degazer (1260 Bin Pump), autosampler (1260 ALS) oraz termostat (260 TCC). Do rejestracji oraz analizy danych używano programu Analyst 1.6.

7.4.2. Badanie widm fragmentacyjnych nukleotydów

Przygotowanie próbki: Nukleotyd rozpuszczony był w mieszaninie: woda: metanol (1:1, v/v) albo w mieszaninie: 0.05M octan amonu pH 5.9:metanol (1:1, v/v). Analizowane były stężenia w zakresie 40–400 μM .

Warunki MS: Analiza nukleotydów była wykonana na wcześniej wspomnianych spektrometrach. Próbkę były dostarczane do spektrometru za pomocą pompy strzykawkowej, gdzie średnica strzykawki wynosiła 4.6 mm, a przepływ 10–100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pozostałe parametry źródła jonów były następujące: *ion spray voltage* (IS): –4500 V; *curtain gas* (CUR): 25 psi; *high collision gas* (CAD) i *ion source gas 1* (GS1): 20 psi. Pozostałe parametry były optymalizowane dla każdego związku indywidualnie, a ich zakresy były następujące: *declustering potential* (DP) od –30 do –50V; *entrance potential* (EP) od –3 do –10V; *collision energy* (CE) od –30 do –55V.

7.4.3. Warunki chromatograficzne

Warunki chromatograficzne podczas każdej z analiz zostały przedstawione w Tabeli 5.

Tabela 5. Warunki chromatograficzne podczas wykonywanych analiz.

Kolumna	Bufory	Gradient	Przepływ	Rodzaj detekcji
Analiza produktów syntezy				
Supelcosil LC-18-T (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Eluent A: 0,05M octan amonu (pH 5,9) Eluent B: Eluent A: metanol 1:1	0-50% B w 15 min	1,3 ml/min	UV (254 nm)
Oczyszczanie				
RP Amide C-16 (25 cm × 21,2 mm, 5 µm)	Eluent A: 0,05M octan amonu (pH 5,9) Eluent B: Eluent A: acetonitryl 7:3	0-100% B w 120 min	5,0 ml/min	UV (260 nm)
Analiza nukleotydów w ekstraktach				
ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 mm × 100 mm, 5,0 µm)	Eluent A: 20 mM DMH (pH 4,8, kwas mrówkowy) Eluent B: acetonitryl: 20 mM DMH (pH 4,8, kwas mrówkowy) 1:1	a) Analiza metabolizmu kapu i jego metabolitów 0-50% B w 15 min, 100% B 20 min b) Analiza pronukleotydów z TA 0- 100% B w 7,5 min	0,7 ml/min	MS (MRM)
Analiza ogona poli(A)				
Eclipse XDB- C18 4,6 mm × 150 mm, 5,0 µm)	Eluent A: 20 mM DMH (pH 4,8, kwas mrówkowy) Eluent B: acetonitryl: 20 mM DMH (pH 4,8, kwas mrówkowy) 1:1	0-100% B w 15 min	0,7 ml/min	MS (MRM)
Analiza sond fluorescencyjnych				
Eclipse XDB- C18 4,6 mm × 150 mm, 5,0 µm)	Eluent A: 0,01M octan amonu (pH 5,9) Eluent B: acetonitryl	0-75% B w 15 min	1,0 ml/min	MS (MRM)

7.4.4. Parametry MS podczas analizy LC-MS/MS

Detekcja MS odbywała się za pomocą metody MRM. Pary MRM były wybierane na podstawie bazy danych msTide lub czystego wzorca podczas analizy ze strzykawki. Parametry

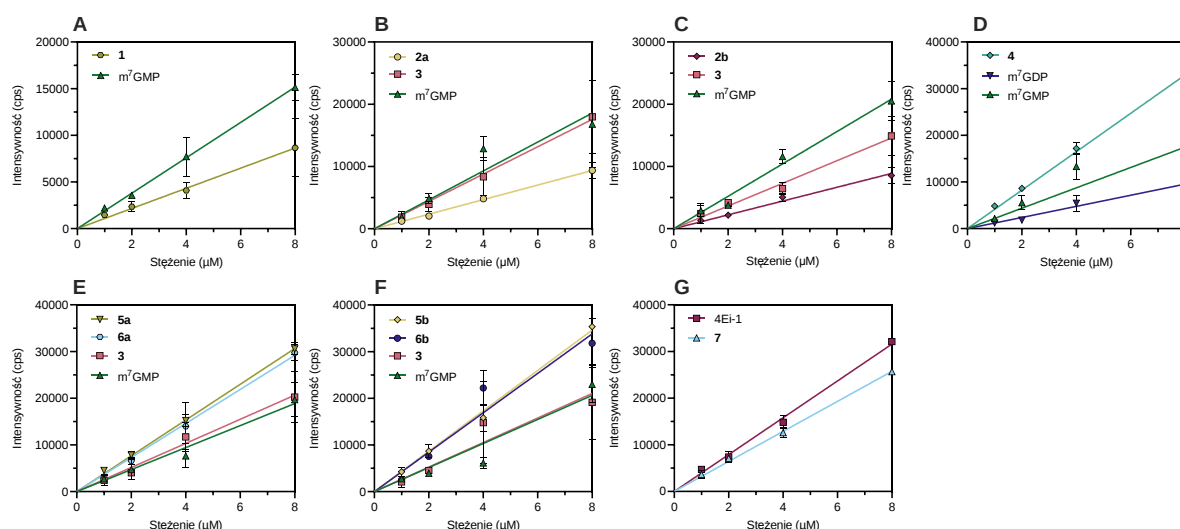
MS były następujące: *ion spray voltage* (IS): -4500V ; *curtain gas* (CUR): 30 psi; *high collision gas* (CAD), *ion source gas 1* (GS1): 30 psi, *ion source gas 2* (GS2): 25 psi, temperatura źródła jonów: 300°C . Pozostałe parametry były optymalizowane dla każdego związku indywidualnie, a ich zakresy były następujące: *declustering potential* (DP) od -30 do -50V ; *entrance potential* (EP) od -3 do -10V ; *collision energy* (CE) od -30 do -55V .

7.4.5. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych do analizy produktów degradacji RNA

Krzywe kalibracyjne były przygotowane poprzez zmieszanie czystego analitu w zakresie stężeń 0.01 – $50\text{ }\mu\text{M}$ i znakowanego izotopowo wzorca wewnętrznego w ilości $2\text{ }\mu\text{l}$ $10\text{ }\mu\text{M}$ (stężenie końcowe w próbce $20\text{ }\mu\text{l}$ – $1\text{ }\mu\text{M}$). Ponadto każda próbka zawierała bufor do SVPDE (1 mM MgCl_2 , 5 mM Tris , pH 8,8) i deaktywowany enzym SVPDE, żeby warunki były jak najbardziej zbliżone do tych panujących w reakcji. Na osi x znajdował się stosunek stężeń analitu i wzorca, a na osi y stosunek intensywności (powierzchni sygnału) analitu i wzorca. Krzywe były dopasowywane z wykorzystaniem programu GraphPad Prism. Dopasowana krzywa regresji liniowej miała wzór ogólny $y = ax + b$, gdzie a – nachylenie prostej, b – punkt przecięcia z osią y. Wartości parametrów oraz limity detekcji podane są w Tabeli 3.

7.4.6. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych do analizy względnej ilości pronukleotydów (25-32) i ich metabolitów

Do przygotowania krzywych użyto związków modyfikowanych tryptaminą i zsyntetyzowanych wzorców odpowiadających ich metabolitom w różnym stosunku stężeń. Analiza była wykonywana metodą MRM w takich samych warunkach jak analiza związków w ekstrakcie (Rozdział 7.3.2) Względne ilości pronukleotydów i ich metabolitów były obliczone używając parametrów otrzymanych z dopasowania prostych do punktów na wykresie zależności intensywności od stężenia (Rysunek 70).



Rysunek 70. Krzywe kalibracyjne użyte do obliczenia stosunkowej ilości pronukleotydów z tryptaminą i ich metabolitów.

8. LITERATURA

1. Langen, P.; Hucho, F., Karl Lohmann and the discovery of ATP. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47 (10), 1824-1827.
2. Bonora, M.; Patergnani, S.; Rimessi, A.; De Marchi, E.; Suski, J. M.; Bononi, A.; Giorgi, C.; Marchi, S.; Missiroli, S.; Poletti, F.; Wieckowski, M. R.; Pinton, P., ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling* **2012**, 8 (3), 343-357.
3. Serezani, C. H.; Ballinger, M. N.; Aronoff, D. M.; Peters-Golden, M., Cyclic AMP - Master regulator of innate immune cell function. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2008**, 39 (2), 127-132.
4. Zbrojkiewicz, M.; Sliwinski, L., Cyclic guanosine monophosphate in the regulation of the cell function. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej* **2016**, 70, 1276-1285.
5. Handford, M.; Rodriguez-Furlan, C.; Orellana, A., Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles in vivo. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2006**, 39 (9), 1149-1158.
6. Lane, A. N.; Fan, T. W. M., Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research* **2015**, 43 (4), 2466-2485.
7. Davies, O.; Mendes, P.; Smallbone, K.; Malys, N., Characterisation of multiple substrate-specific (d)ITP/(d)XTPase and modelling of deaminated purine nucleotide metabolism. *Bmb Reports* **2012**, 45 (4), 259-264.
8. Aragon, J. J.; Tornheim, K.; Lowenstein, J. M., On a possible role of IMP in the regulation of phosphorylase-activity in skeletal-muscle. *Febs Letters* **1980**, 117, K56-K64.
9. Pimkin, M.; Pimkina, J.; Markham, G. D., A Regulatory Role of the Bateman Domain of IMP Dehydrogenase in Adenylate Nucleotide Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284 (12), 7960-7969.
10. Teufel, R.; Miyanaga, A.; Michaudel, Q.; Stull, F.; Louie, G.; Noel, J. P.; Baran, P. S.; Palfey, B.; Moore, B. S., Flavin-mediated dual oxidation controls an enzymatic Favorskii-type rearrangement. *Nature* **2013**, 503 (7477), 552.
11. Pollak, N.; Dolle, C.; Ziegler, M., The power to reduce: pyridine nucleotides - small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal* **2007**, 402, 205-218.
12. Klaassen, C. D.; Boles, J. W., Sulfation and sulfotransferases .5. The importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *Faseb Journal* **1997**, 11 (6), 404-418.
13. Walsh, C. P.; Xu, G. L., Cytosine methylation and DNA repair. *DNA Methylation: Basic Mechanisms* **2006**, 301, 283-315.
14. Law, J. A.; Jacobsen, S. E., Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* **2010**, 11 (3), 204-220.
15. Torres, A. G.; Batlle, E.; de Pouplana, L. R., Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends in Molecular Medicine* **2014**, 20 (6), 306-314.

16. Zhao, W.; Qi, X. Q.; Liu, L. N.; Ma, S. Q.; Liu, J. W.; Wu, J., Epigenetic Regulation of m(6)A Modifications in Human Cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* **2020**, 19, 405-412.
17. Ries, R. J.; Zaccara, S.; Klein, P.; Olarerin-George, A.; Namkoong, S.; Pickering, B. F.; Patil, D. P.; Kwak, H.; Lee, J. H.; Jaffrey, S. R., m(6)A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature* **2019**, 571 (7765), 424.
18. Garcia-Campos, M. A.; Edelheit, S.; Toth, U.; Safra, M.; Shachar, R.; Viukov, S.; Winkler, R.; Nir, R.; Lasman, L.; Brandis, A.; Hanna, J. H.; Rossmanith, W.; Schwartz, S., Deciphering the "m(6)A Code" via Antibody-Independent Quantitative Profiling. *Cell* **2019**, 178 (3), 731.
19. Li, F. X.; Yi, Y.; Miao, Y. Y.; Long, W. Y.; Long, T.; Chen, S. Y.; Cheng, W. S.; Zou, C. Y.; Zheng, Y. Y.; Wu, X. G.; Ding, J. J.; Zhu, K. Y.; Chen, D. L.; Xu, Q. C.; Wang, J. K.; Liu, Q.; Zhi, F.; Ren, J.; Cao, Q.; Zhao, W., N-6-Methyladenosine Modulates Nonsense-Mediated mRNA Decay in Human Glioblastoma. *Cancer Research* **2019**, 79 (22), 5785-5798.
20. Lans, H.; Hoeijmakers, J. H. J.; Vermeulen, W.; Marteijn, J. A., The DNA damage response to transcription stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2019**, 20 (12), 766-784.
21. Dizdaroglu, M., Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research* **1992**, 275 (3-6), 331-342.
22. Gates, K. S., An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, 22 (11), 1747-1760.
23. Zhang, C. C.; Liu, Z.; Liu, X.; Wei, L.; Liu, Y. J.; Yu, J.; Sun, L. X., Targeted metabolic analysis of nucleotides and identification of biomarkers associated with cancer in cultured cell models. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2013**, 3 (4), 254-262.
24. Zhang, G. D., Nucleoside/Nucleotide Biomarkers. In *Targeted Biomarker Quantitation by LC-MS*, Weng, N.; Jian, W., Eds. John Wiley & Sons Inc: Hoboken, 2017; pp 389-406.
25. Premaratne, G.; Al Mubarak, Z. H.; Senavirathna, L.; Liu, L.; Krishnan, S., Measuring ultra-low levels of nucleotide biomarkers using quartz crystal microbalance and SPR microarray imaging methods: A comparative analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2017**, 253, 368-375.
26. Cho, S. H.; Choi, M. H.; Lee, W. Y.; Chung, B. C., Evaluation of urinary nucleosides in breast cancer patients before and after tumor removal. *Clinical Biochemistry* **2009**, 42 (6), 540-543.
27. Struck, W.; Siluk, D.; Yumba-Mpanga, A.; Markuszewski, M.; Kaliszan, R.; Markuszewski, M. J., Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1283, 122-131.
28. Zhang, W.; Tan, S. L.; Paintsil, E.; Dutschman, G. E.; Gullen, E. A.; Chu, E.; Cheng, Y. C., Analysis of deoxyribonucleotide pools in human cancer cell lines using a liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry technique. *Biochemical Pharmacology* **2011**, 82 (4), 411-417.
29. Hennere, G.; Becher, F.; Pruvost, A.; Goujard, C.; Grassi, J.; Benech, H., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assays for intracellular deoxyribonucleotide triphosphate competitors of nucleoside antiretrovirals. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2003**, 789 (2), 273-281.

30. Lin, L. N.; Caton-Williams, J.; Kaur, M.; Patino, A. M.; Sheng, J.; Punetha, J.; Huang, Z., Facile synthesis of nucleoside 5'-(alpha-P-seleno)-triphosphates and phosphoroselenoate RNA transcription. *Rna-a Publication of the Rna Society* **2011**, 17 (10), 1932-1938.
31. Shen, W.; Kim, J. S.; Kish, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J., Design and synthesis of vidarabine prodrugs as antiviral agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19 (3), 792-796.
32. Perry, C. M.; Faulds, D., Lamivudine - A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs* **1997**, 53 (4), 657-680.
33. Clercq, E., A guided tour through the antiviral drug field. *Future Virology* **2006**, 1 (1), 19-35.
34. Shelton, J.; Lu, X.; Hollenbaugh, J. A.; Cho, J. H.; Amblard, F.; Schinazi, R. F., Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chemical Reviews* **2016**, 116 (23), 14379-14455.
35. Auriola, S.; Frith, J.; Rogers, M. J.; Koivuniemi, A.; Monkkonen, J., Identification of adenine nucleotide-containing metabolites of bisphosphonate drugs using ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **1997**, 704 (1-2), 187-195.
36. Rogers, M. J.; Russell, R. G. G.; Blackburn, G. M.; Williamson, M. P.; Watts, D. J., Metabolism of halogenated bisphosphonates by the cellular slime-mold dictyostelium-discoideum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1992**, 189 (1), 414-423.
37. Frith, J. C.; Monkkonen, J.; Blackburn, G. M.; Russell, R. G. G.; Rogers, M. J., Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta,gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* **1997**, 12 (9), 1358-1367.
38. Amir, A.; Shmuel, E.; Zagalsky, R.; Sayer, A. H.; Nadel, Y.; Fischer, B., Nucleoside-5' -phosphorothioate analogues are biocompatible antioxidants dissolving efficiently amyloid beta-metal ion aggregates. *Dalton Transactions* **2012**, 41 (28), 8539-8549.
39. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C., Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, 12 (6), 447-464.
40. Wang, Z. F.; Burge, C. B., Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna* **2008**, 14 (5), 802-813.
41. Mignone, F.; Gissi, C.; Liuni, S.; Pesole, G., Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* **2002**, 3 (3), 10.
42. Lu, Y. F.; Mauger, D. M.; Goldstein, D. B.; Urban, T. J.; Weeks, K. M.; Bradrick, S. S., IFNL3 mRNA structure is remodeled by a functional non-coding polymorphism associated with hepatitis C virus clearance. *Scientific Reports* **2015**, 5, 14.
43. Wieczorek, Z.; Stepinski, J.; Jankowska, M.; Lonnberg, H., Fluorescence and absorption spectroscopic properties of RNA 5'-cap analogs derived from 7-methyl-guanosines, n-2,7-dimethyl-guanosines and n-2,n-2,7-trimethyl-guanosines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **1995**, 28 (1), 57-63.
44. Devarkar, S. C.; Wang, C.; Miller, M. T.; Ramanathan, A.; Jiang, F. G.; Khan, A. G.; Patel, S. S.; Marcotrigiano, J., Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped

RNAs by the innate immune receptor RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, 113 (3), 596-601.

45. Werner, M.; Purta, E.; Kaminska, K. H.; Cymerman, I. A.; Campbell, D. A.; Mittra, B.; Zamudio, J. R.; Sturm, N. R.; Jaworski, J.; Bujnicki, J. M., 2'-O-ribose methylation of cap2 in human: function and evolution in a horizontally mobile family. *Nucleic Acids Research* **2011**, 39 (11), 4756-4768.

46. Valadkhan, S., snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9 (6), 603-608.

47. Topisirovic, I.; Svitkin, Y. V.; Sonenberg, N.; Shatkin, A. J., Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* **2011**, 2 (2), 277-298.

48. Wei, C. M.; Gershowitz, A.; Moss, B., N⁶,O^{2'}-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to 5' terminal of animal-cell and virus messenger-RNAs. *Nature* **1975**, 257 (5523), 251-253.

49. Engel, M.; Chen, A., The emerging role of mRNA methylation in normal and pathological behavior. *Genes Brain and Behavior* **2018**, 17 (3), 9.

50. Wang, X.; Lu, Z. K.; Gomez, A.; Hon, G. C.; Yue, Y. N.; Han, D. L.; Fu, Y.; Parisien, M.; Dai, Q.; Jia, G. F.; Ren, B.; Pan, T.; He, C., N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* **2014**, 505 (7481), 117.

51. Meyer, K. D.; Patil, D. P.; Zhou, J.; Zinoviev, A.; Skabkin, M. A.; Elemento, O.; Pestova, T. V.; Qian, S. B.; Jaffrey, S. R., 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* **2015**, 163 (4), 999-1010.

52. Ramanathan, A.; Robb, G. B.; Chan, S. H., mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research* **2016**, 44 (16), 7511-7526.

53. Bouvet, M.; Ferron, F.; Imbert, I.; Gluais, L.; Selisko, B.; Coutard, B.; Canard, B.; Decroly, E., Capping strategies in RNA viruses. *M S-Medecine Sciences* **2012**, 28 (4), 423-429.

54. Warminski, M.; Sikorski, P. J.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Applications of Phosphate Modification and Labeling to Study (m)RNA Caps. In *Phosphate Labeling and Sensing in Chemical Biology*, Jessen, H. J., Ed. Springer International Publishing Ag: Cham, 2017; pp 211-239.

55. Wu, X. Y.; Brewer, G., The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* **2012**, 500 (1), 10-21.

56. Shuman, S., RNA capping: progress and prospects. *Rna* **2015**, 21 (4), 735-737.

57. Gommans, W. M.; Mullen, S. P.; Maas, S., RNA editing: a driving force for adaptive evolution? *Bioessays* **2009**, 31 (10), 1137-1145.

58. Goss, D. J.; Kleiman, F. E., Poly(A) binding proteins: are they all created equal? *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* **2013**, 4 (2), 167-179.

59. Poulin, F.; Pyronnet, S., Molecular interactions and initiation of protein synthesis. *M S-Medecine Sciences* **2000**, 16 (5), 617-622.

60. Eliseev, B.; Yeramala, L.; Leitner, A.; Karuppasamy, M.; Raimondeau, E.; Huard, K.; Alkalaeva, E.; Aebersold, R.; Schaffitzel, C., Structure of a human cap-dependent 48S translation pre-initiation complex. *Nucleic Acids Research* **2018**, 46 (5), 2678-2689.
61. Sasikumar, A. N.; Perez, W. B.; Kinzy, T. G., The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* **2012**, 3 (4), 543-555.
62. Frolova, L. Y.; Merkulova, T. I.; Kisselev, L. L., Translation termination in eukaryotes: Polypeptide release factor eRF1 is composed of functionally and structurally distinct domains. *Rna-a Publication of the Rna Society* **2000**, 6 (3), 381-390.
63. Balatsos, N. A. A.; Maragozidis, P.; Anastasakis, D.; Stathopoulos, C., Modulation of Poly(A)-specific Ribonuclease (PARN): Current Knowledge and Perspectives. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, 19 (28), 4838-4849.
64. Schoenberg, D. R., Mechanisms of endonuclease-mediated mRNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* **2011**, 2 (4), 582-600.
65. Wiederhold, K.; Passmore, L. A., Cytoplasmic deadenylation: regulation of mRNA fate. *Biochemical Society Transactions* **2010**, 38, 1531-1536.
66. Sun, M.; Schwalb, B.; Pirkel, N.; Maier, K. C.; Schenk, A.; Failmezger, H.; Tresch, A.; Cramer, P., Global Analysis of Eukaryotic mRNA Degradation Reveals Xrn1-Dependent Buffering of Transcript Levels. *Molecular Cell* **2013**, 52 (1), 52-62.
67. Jonas, S.; Christie, M.; Peter, D.; Bhandari, D.; Loh, B.; Huntzinger, E.; Weichenrieder, O.; Izaurralde, E., An asymmetric PAN3 dimer recruits a single PAN2 exonuclease to mediate mRNA deadenylation and decay (vol 21, pg 599, 2014). *Nature Structural & Molecular Biology* **2014**, 21 (12), 1106-1106.
68. Cohen, L. S.; Mikhli, C.; Friedman, C.; Jankowska-Anyszka, M.; Stepinski, J.; Darzynkiewicz, E.; Davis, R. E., Nematode M(7)GpppG and m(3)(2,2,7)GpppG decapping: activities in *Ascaris* embryos and characterization of *C-elegans* scavenger DcpS. *Rna-a Publication of the Rna Society* **2004**, 10 (10), 1609-1624.
69. Wypijewska, A.; Bojarska, E.; Lukaszewicz, M.; Stepinski, J.; Jemielity, J.; Davis, R. E.; Darzynkiewicz, E., 7-Methylguanosine Diphosphate (m(7)GDP) Is Not Hydrolyzed but Strongly Bound by Decapping Scavenger (DcpS) Enzymes and Potently Inhibits Their Activity. *Biochemistry* **2012**, 51 (40), 8003-8013.
70. van Dijk, E.; Cougot, N.; Meyer, S.; Babajko, S.; Wahle, E.; Seraphin, B., Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo Journal* **2002**, 21 (24), 6915-6924.
71. Liu, H. D.; Rodgers, N. D.; Jiao, X.; Kiledjian, M., The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *Embo Journal* **2002**, 21 (17), 4699-4708.
72. Taverniti, V.; Seraphin, B., Elimination of cap structures generated by mRNA decay involves the new scavenger mRNA decapping enzyme Aph1/FHIT together with DcpS. *Nucleic Acids Research* **2015**, 43 (1), 482-492.
73. Monecke, T.; Buschmann, J.; Neumann, P.; Wahle, E.; Ficner, R., Crystal Structures of the Novel Cytosolic 5'-Nucleotidase IIIB Explain Its Preference for m(7)GMP. *Plos One* **2014**, 9 (3), 13.

74. Mugridge, J. S.; Collier, J.; Gross, J. D., Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5'-3' mRNA decay (vol 25, pg 1077, 2018). *Nature Structural & Molecular Biology* **2019**, 26 (2), 147-148.
75. Zinder, J. C.; Lima, C. D., Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes & Development* **2017**, 31 (2), 88-100.
76. Schmidt, C.; Kowalinski, E.; Shanmuganathan, V.; Defenouillere, Q.; Braunger, K.; Heuer, A.; Pech, M.; Namane, A.; Berninghausen, O.; Fromont-Racine, M.; Jacquier, A.; Conti, E.; Becker, T.; Beckmann, R., The cryo-EM structure of a ribosome-Ski2-Ski3-Ski8 helicase complex. *Science* **2016**, 354 (6318), 1431-1433.
77. Tang, X. J.; Zhang, S. Q.; Fug, R.; Zhang, L.; Huang, K. M.; Peng, H.; Dai, L. J.; Chen, Q. X., Therapeutic Prospects of mRNA-Based Gene Therapy for Glioblastoma. *Frontiers in Oncology* **2019**, 9, 10.
78. Zhang, C. L.; Maruggi, G.; Shan, H.; Li, J. W., Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* **2019**, 10, 13.
79. Weissman, D.; Kariko, K., mRNA: Fulfilling the Promise of Gene Therapy. *Molecular Therapy* **2015**, 23 (9), 1416-1417.
80. Bitterman, P. B.; Polunovsky, V. A., Attacking a Nexus of the Oncogenic Circuitry by Reversing Aberrant eIF4F-Mediated Translation. *Molecular Cancer Therapeutics* **2012**, 11 (5), 1051-1061.
81. Butchbach, M. E. R.; Singh, J.; Porsteinsdottir, M.; Saieva, L.; Slominski, E.; Thurmond, J.; Andresson, T.; Zhang, J.; Edwards, J. D.; Simard, L. R.; Pellizzoni, L.; Jarecki, J.; Burghes, A. H.; Gurney, M. E., Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* **2010**, 19 (3), 454-467.
82. Kalek, M.; Jemielity, J.; Darzynkiewicz, Z. M.; Bojarska, E.; Stepinski, J.; Stolarski, R.; Davis, R. E.; Darzynkiewicz, E., Enzymatically stable 5' mRNA cap analogs: Synthesis and binding studies with human DcpS decapping enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14 (9), 3223-3230.
83. Rydzik, A. M.; Kulis, M.; Lukaszewicz, M.; Kowalska, J.; Zuberek, J.; Darzynkiewicz, Z. M.; Darzynkiewicz, E.; Jemielity, J., Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety-fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20 (5), 1699-1710.
84. Kowalska, J.; Lewdorowicz, M.; Zuberek, J.; Grudzien-Nogalska, E.; Bojarska, E.; Stepinski, J.; Rhoads, R. E.; Darzynkiewicz, E.; Davis, R. E.; Jemielity, J., Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *Rna* **2008**, 14 (6), 1119-1131.
85. Kowalska, J.; Wypijewska del Nogal, A.; Darzynkiewicz, Z. M.; Buck, J.; Nicola, C.; Kuhn, A. N.; Lukaszewicz, M.; Zuberek, J.; Strenkowska, M.; Ziemniak, M.; Maciejczyk, M.; Bojarska, E.; Rhoads, R. E.; Darzynkiewicz, E.; Sahin, U.; Jemielity, J., Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes. *Nucleic Acids Research* **2014**, 42 (16), 10245-10264.
86. Wojtczak, B. A.; Sikorski, P. J.; Fac-Dabrowska, K.; Nowicka, A.; Warminski, M.; Kubacka, D.; Nowak, E.; Nowotny, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J., 5'-Phosphorothiolate Dinucleotide Cap

Analogues: Reagents for Messenger RNA Modification and Potent Small-Molecular Inhibitors of Decapping Enzymes. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, 140 (18), 5987-5999.

87. Ziemniak, M.; Strenkowska, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Potential therapeutic applications of RNA cap analogs. *Future Medicinal Chemistry* **2013**, 5 (10), 1141-1172.

88. Barba, A. A.; Bochicchio, S.; Dalmoro, A.; Lamberti, G., Lipid Delivery Systems for Nucleic-Acid-Based-Drugs: From Production to Clinical Applications. *Pharmaceutics* **2019**, 11 (8), 26.

89. Mali, S., Delivery systems for gene therapy. *Indian journal of human genetics* **2013**, 19 (1), 3-8.

90. Kuhn, A. N.; Diken, M.; Kreiter, S.; Selmi, A.; Kowalska, J.; Jemielity, J.; Darzynkiewicz, E.; Huber, C.; Tureci, O.; Sahin, U., Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Therapy* **2010**, 17 (8), 961-971.

91. Tarun, S. Z.; Sachs, A. B., Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo Journal* **1996**, 15 (24), 7168-7177.

92. Gossringer, M.; Helmecke, D.; Kohler, K.; Schon, A.; Kirsebom, L. A.; Bindereif, A.; Hartmann, R. K., Enzymatic RNA Synthesis Using Bacteriophage T7 RNA Polymerase. In *Handbook of Rna Biochemistry*, Vols 1 and 2, 2nd Edition, Hartmann, R. K.; Bindereif, A.; Schon, A.; Westhof, E., Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2014; pp 3-27.

93. Griffiths, A. D.; Potter, B. V. L.; Eperon, I. C., Stereospecificity of nucleases towards phosphorothioate-substituted RNA - stereochemistry of transcription by T7 RNA-polymerase. *Nucleic Acids Research* **1987**, 15 (10), 4145-4162.

94. Logsdon, N.; Lee, C. G. L.; Harper, J. W., Selective 5' modification of T7 RNA-polymerase transcripts. *Analytical Biochemistry* **1992**, 205 (1), 36-41.

95. Milligan, J. F.; Uhlenbeck, O. C., Synthesis of small RNAs using T7 RNA-polymerase. *Methods in Enzymology* **1989**, 180, 51-62.

96. Anhauser, L.; Huwel, S.; Zobel, T.; Rentmeister, A., Multiple covalent fluorescence labeling of eukaryotic mRNA at the poly(A) tail enhances translation and can be performed in living cells. *Nucleic Acids Research* **2019**, 47 (7), 12.

97. Kinkelin, K.; Veith, K.; Grunwald, M.; Bono, F., Crystal structure of a minimal eIF4E-Cup complex reveals a general mechanism of eIF4E regulation in translational repression. *Rna* **2012**, 18 (9), 1624-1634.

98. Mugridge, J. S.; Ziemniak, M.; Jemielity, J.; Gross, J. D., Structural basis of mRNA-cap recognition by Dcp1-Dcp2. *Nature Structural & Molecular Biology* **2016**, 23 (11), 987-994.

99. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, 74 (12), 5463-5467.

100. Kan, C. W.; Fredlake, C. P.; Doherty, E. A. S.; Barron, A. E., DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems. *Electrophoresis* **2004**, 25 (21-22), 3564-3588.

101. Morozova, O.; Marra, M. A., Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* **2008**, 92 (5), 255-264.

102. Workman, R. E.; Tang, A. D.; Tang, P. S.; Jain, M.; Tyson, J. R.; Razaghi, R.; Zuzarte, P. C.; Gilpatrick, T.; Payne, A.; Quick, J.; Sadowski, N.; Holmes, N.; de Jesus, J. G.; Jones, K. L.; Soulette, C. M.; Snutch, T. P.; Loman, N.; Paten, B.; Loose, M.; Simpson, J. T.; Olsen, H. E.; Brooks, A. N.; Akeson, M.; Timp, W., Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome (vol 16, pg, 1297, 2019). *Nature Methods* **2020**, 17 (1), 114-114.
103. Liu, Y. S.; Nie, H.; Liu, H. X.; Lu, F. L., Poly(A) inclusive RNA isoform sequencing (PAIso-seq) reveals wide-spread non-adenosine residues within RNA poly(A) tails. *Nature Communications* **2019**, 10, 13.
104. Legnini, I.; Alles, J.; Karaikos, N.; Ayoub, S.; Rajewsky, N., FLAM-seq: full-length mRNA sequencing reveals principles of poly(A) tail length control. *Nature Methods* **2019**, 16 (9), 879.
105. Chang, H.; Lim, J.; Ha, M.; Kim, V. N., TAIL-seq: Genome-wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3' End Modifications. *Molecular Cell* **2014**, 53 (6), 1044-1052.
106. Subtelny, A. O.; Eichhorn, S. W.; Chen, G. R.; Sive, H.; Bartel, D. P., Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* **2014**, 508 (7494), 66.
107. Nicholson, A. L.; Pasquinelli, A. E., Tales of Detailed Poly(A) Tails. *Trends in Cell Biology* **2019**, 29 (3), 191-200.
108. Niedzwiecka, A.; Marcotrigiano, J.; Stepinski, J.; Jankowska-Anyszka, M.; Wyslouch-Cieszyńska, A.; Dadlez, M.; Gingras, A. C.; Mak, P.; Darzynkiewicz, E.; Sonenberg, N.; Burley, S. K.; Stolarski, R., Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: Recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *Journal of Molecular Biology* **2002**, 319 (3), 615-635.
109. Kopciał, M.; Wojtczak, B. A.; Kasprzyk, R.; Kowalska, J.; Jemielity, J., N1-Propargylguanosine Modified mRNA Cap Analogs: Synthesis, Reactivity, and Applications to the Study of Cap-Binding Proteins. *Molecules* **2019**, 24 (10), 17.
110. Ghosh, S. S.; Eis, P. S.; Blumeyer, K.; Fearon, K.; Millar, D. P., Real-time kinetics of restriction-endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy-transfer. *Nucleic Acids Research* **1994**, 22 (15), 3155-3159.
111. Mischak, H.; Coon, J. J.; Novak, J.; Weissinger, E. M.; Schanstra, J. P.; Dominiczak, A. F., Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker discovery and clinical diagnosis: an update of recent developments. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, 28 (5), 703-724.
112. Lanucara, F.; Holman, S. W.; Gray, C. J.; Evers, C. E., The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry* **2014**, 6 (4), 281-294.
113. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T., Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*: 1988; Vol. 2, p 151.
114. Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G., Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature* **1999**, 399 (6733), 243-246.
115. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L., Molecular beams of macroions. *Journal of Chemical Physics* **1968**, 49 (5), 2240-&.

116. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, 60 (20), 2299-2301.
117. Siuzdak, G., *An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*. MCC Press: San Diego, 2004; Vol. 9.
118. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, 9 (1), 37-70.
119. Siuzdak, G., *An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*. MCC Press: San Diego, 2004; Vol. 9.
120. Cole, R. B., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation, and Applications*. Wiley: New York, 1997.
121. Kebarle, P.; Verkerk, U. H., Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, 28 (6), 898-917.
122. Wilm, M., Principles of Electrospray Ionization. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, 10 (7), 8.
123. Haag, A. M., Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*, Hamid Mirzaei, M. C., Ed. Springer International Publishing: Switzerland, 2016; Vol. 919.
124. Charette, J.; De Hoffmann, E.; Stroobant, V., *Spektrometria mas*. Wydawnictwa Naukowo Techniczne: Warszawa, 1998.
125. Lorenzetti, R.; Lilla, S.; Donato, J. L.; De Nucci, G., Simultaneous quantification of GMP, AMP, cyclic GMP and cyclic AMP by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, 859 (1), 37-41.
126. Szczepaniak, W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. PWN: Warszawa, 1996.
127. Witkiewicz, Z., *Podstawy chromatografii*. WNT: Warszawa, 2005.
128. Minczewski, J.; Marczewski, Z., *Chemia analityczna, tom III*. PWN: Warszawa, 1986.
129. Ewing, G. W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. PWN: Warszawa, 1980.
130. Baird, C. C., M., *Environmental Chemistry*. W.H. Freeman and Co.: 2005.
131. Tsay, F. R.; Ahmad, I. A. H.; Henderson, D.; Schiavone, N.; Liu, Z. J.; Makarov, A. A.; Mangion, I.; Regalado, E. L., Generic anion-exchange chromatography method for analytical and preparative separation of nucleotides in the development and manufacture of drug substances. *Journal of Chromatography A* **2019**, 1587, 129-135.
132. Marinescu, G. C.; Popescu, R. G.; Dinischiotu, A., Size Exclusion Chromatography Method for Purification of Nicotinamide Mononucleotide (NMN) from Bacterial Cells. *Scientific Reports* **2018**, 8, 11.
133. Huber, C. G.; Premstaller, A.; Wen, X.; Oberacher, H.; Bonn, G. K.; Oefner, P. J., Mutation detection by capillary denaturing high-performance liquid chromatography using monolithic columns. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2001**, 47 (1-2), 5-19.

134. Moravcova, D.; Haapala, M.; Planeta, J.; Hyotylainen, T.; Kostianen, R.; Wiedmer, S. K., Separation of nucleobases, nucleosides, and nucleotides using two zwitterionic silica-based monolithic capillary columns coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1373, 90-96.
135. Pabst, M.; Grass, J.; Fischl, R.; Leonard, R.; Jin, C. S.; Hinterkorn, G.; Borth, N.; Altmann, F., Nucleotide and Nucleotide Sugar Analysis by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry on Surface-Conditioned Porous Graphitic Carbon. *Analytical Chemistry* **2010**, 82 (23), 9782-9788.
136. Studzinska, S.; Buszewski, B., Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405 (5), 1663-1672.
137. Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S., Analysis of oligonucleotides by HPLC-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1997**, 69 (7), 1320-1325.
138. Contreras-Sanz, A.; Scott-Ward, T. S.; Gill, H. S.; Jacoby, J. C.; Birch, R. E.; Malone-Lee, J.; Taylor, K. M. G.; Peppiatt-Wildman, C. M.; Wildman, S. S. P., Simultaneous quantification of 12 different nucleotides and nucleosides released from renal epithelium and in human urine samples using ion-pair reversed-phase HPLC. *Purinergic Signalling* **2012**, 8 (4), 741-751.
139. Gong, L. Z.; McCullagh, J. S. O., Comparing ion-pairing reagents and sample dissolution solvents for ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, 28 (4), 339-350.
140. Buszewski, B.; Noga, S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 402 (1), 231-247.
141. Lobue, P. A.; Jora, M.; Addepalli, B.; Limbach, P. A., Oligonucleotide analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry in the absence of ion-pair reagents. *Journal of Chromatography A* **2019**, 1595, 39-48.
142. Willems, A. V.; Deforce, D. L.; Van Peteghem, C. H.; Van Bocxlaer, J. F., Analysis of nucleic acid constituents by on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* **2005**, 26 (7-8), 1221-1253.
143. D'Agostino, P. A.; Chenier, C. L., Desorption electrospray ionization mass spectrometric analysis of organophosphorus chemical warfare agents using ion mobility and tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, 24 (11), 1617-1624.
144. Dudley, E.; Bond, L., Mass spectrometry analysis of nucleosides and nucleotides. *Mass Spectrometry Reviews* **2014**, 33 (4), 302-331.
145. Zhu, B. J.; Wei, H.; Wang, Q. J.; Li, F. G.; Dai, J. Y.; Yan, C.; Cheng, Y., A simultaneously quantitative method to profiling twenty endogenous nucleosides and nucleotides in cancer cells using UHPLC-MS/MS. *Talanta* **2018**, 179, 615-623.
146. Wu, H.; Zhang, Y., Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. *Cell* **2014**, 156 (1-2), 45-68.

147. Nilsson, E.; Jansson, P.; Perilyev, A.; Pedersen, M.; Svensson, M. K.; Poulsen, P.; Ribel-Madsen, R.; Pedersen, N. L.; Almgren, P.; Fadista, J.; Ronn, T.; Klarlund-Pedersen, B.; Scheele, C.; Vaag, A.; Ling, C., Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia* **2014**, *57*, S152-S152.
148. Fernandez, A. F.; Assenov, Y.; Martin-Subero, J. I.; Balint, B.; Siebert, R.; Taniguchi, H.; Yamamoto, H.; Hidalgo, M.; Tan, A. C.; Galm, O.; Ferrer, I.; Sanchez-Cespedes, M.; Villanueva, A.; Carmona, J.; Sanchez-Mut, J. V.; Berdasco, M.; Moreno, V.; Capella, G.; Monk, D.; Ballestar, E.; Ropero, S.; Martinez, R.; Sanchez-Carbayo, M.; Prosper, F.; Agirre, X.; Fraga, M. F.; Grana, O.; Perez-Jurado, L.; Mora, J.; Puig, S.; Prat, J.; Badimon, L.; Puca, A. A.; Meltzer, S. J.; Lengauer, T.; Bridgewater, J.; Bock, C.; Esteller, M., A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Research* **2012**, *22* (2), 407-419.
149. Timp, W.; Feinberg, A. P., Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature Reviews Cancer* **2013**, *13* (7), 497-510.
150. Li, B.; Luo, X.; Dong, Y. Z., Effects of Chemically Modified Messenger RNA on Protein Expression. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (3), 849-853.
151. Holliday, R.; Ho, T., Evidence for gene silencing by endogenous DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95* (15), 8727-8732.
152. Zeng, H.; Qi, C. B.; Liu, T.; Xiao, H. M.; Cheng, Q. Y.; Jiang, H. P.; Yuan, B. F.; Feng, Y. Q., Formation and Determination of Endogenous Methylated Nucleotides in Mammals by Chemical Labeling Coupled with Mass Spectrometry Analysis. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (7), 4153-4160.
153. Nyhan, W. L.; Friedmann, T., Disorders of Nucleotide Metabolism: Purines and Pyrimidines. In *Metabolic Diseases: Foundations of Clinical Management, Genetics, and Pathology*, 2nd Edition, GilbertBarness, E.; Barness, L. A.; Farrell, P. M., Eds. Ios Press: Amsterdam, 2017; pp 441-464.
154. Aloj, G.; Giardino, G.; Valentino, L.; Maio, F.; Gallo, V.; Esposito, T.; Naddei, R.; Cirillo, E.; Pignata, C., Severe Combined Immunodeficiencies: New and Old Scenarios. *International Reviews of Immunology* **2012**, *31* (1), 43-65.
155. Al-Dirbashi, O. Y.; Ogrel, S.; McIntosh, N.; Higgins, L.; McRoberts, C.; Fisher, L.; Bulman, D. E.; Geraghty, M. T.; Chakraborty, P., Tandem mass spectrometric determination of purine metabolites and adenosine deaminase activity for newborn screening of ADA–SCID LymphoSign Journal **2015**, *2*.
156. Donti, T. R.; Cappuccio, G.; Hubert, L.; Neira, J.; Atwal, P. S.; Miller, M. J.; Cardon, A. L.; Sutton, V. R.; Porter, B. E.; Baumer, F. M.; Wangler, M. F.; Sun, Q.; Emrick, L. T.; Elsea, S. H., Diagnosis of adenylosuccinate lyase deficiency by metabolomic profiling in plasma reveals a phenotypic spectrum. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* **2016**, *8*, 61-66.
157. Ceballos-Picot, I.; Le Dantec, A.; Brassier, A.; Jais, J. P.; Ledroit, M.; Cahu, J.; Ea, H. K.; Daignan-Fornier, B.; Pinson, B., New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2015**, *10*, 11.
158. Bollee, G.; Harambat, J.; Bensman, A.; Knebelmann, B.; Daudon, M.; Ceballos-Picot, I., Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2012**, *7* (9), 1521-1527.

159. Bailey, C. J., Orotic aciduria and uridine monophosphate synthase: A reappraisal. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **2009**, 32 (1), S227-S233.
160. Monostori, P.; Klinke, G.; Hauke, J.; Richter, S.; Bierau, J.; Garbade, S. F.; Hoffmann, G. F.; Langhans, C. D.; Haas, D.; Okun, J. G., Extended diagnosis of purine and pyrimidine disorders from urine: LC MS/MS assay development and clinical validation. *Plos One* **2019**, 14 (2), 17.
161. Zhou, X. F.; Deng, Z. X.; Firmin, J. L.; Hopwood, D. A.; Kieser, T., Site-specific degradation of streptomyces-lividans DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Research* **1988**, 16 (10), 4341-4352.
162. Ray, T.; Weaden, J.; Dyson, P., Tris-dependent site-specific cleavage of streptomyces-lividans DNA. *Fems Microbiology Letters* **1992**, 96 (2-3), 247-252.
163. Wang, L. R.; Chen, S.; Xu, T. G.; Taghizadeh, K.; Wishnok, J. S.; Zhou, X. F.; You, D. L.; Deng, Z. X.; Dedon, P. C., Phosphorothioation of DNA in bacteria by dnd genes. *Nature Chemical Biology* **2007**, 3 (11), 709-710.
164. Eckstein, F., Phosphorothioation of DNA in bacteria. *Nature Chemical Biology* **2007**, 3 (11), 689-690.
165. Wang, L. R.; Jiang, S. S.; Deng, Z. X.; Dedon, P. C.; Chen, S., DNA phosphorothioate modification-a new multi-functional epigenetic system in bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **2019**, 43 (2), 109-122.
166. Cao, B.; Chen, C.; DeMott, M. S.; Cheng, Q. X.; Clark, T. A.; Xiong, X. L.; Zheng, X. Q.; Butty, V.; Levine, S. S.; Yuan, G.; Boitano, M.; Luong, K.; Song, Y.; Zhou, X. F.; Deng, Z. X.; Turner, S. W.; Korlach, J.; You, D. L.; Wang, L. R.; Chen, S.; Dedon, P. C., Genomic mapping of phosphorothioates reveals partial modification of short consensus sequences. *Nature Communications* **2014**, 5, 13.
167. Xie, X. Q.; Liang, J. D.; Pu, T. N.; Xu, F.; Yao, F.; Yang, Y.; Zhao, Y. L.; You, D. L.; Zhou, X. F.; Deng, Z. X.; Wang, Z. J., Phosphorothioate DNA as an antioxidant in bacteria. *Nucleic Acids Research* **2012**, 40 (18), 9115-9124.
168. Eckstein, F., Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics* **2014**, 24 (6), 374-387.
169. Korycka, A.; Lech-Maranda, E.; Robak, T., Novel Purine Nucleoside Analogues for Hematological Malignancies. In *Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery*, Vol 1, AttaUrRahman, F. R. S.; Choudhary, M. I., Eds. Bentham Science Publ: Sharjah, 2010; Vol. 1, pp 219-240.
170. Hiramatsu, N.; Yamada, R.; Takehara, T., The suppressive effect of nucleos(t)ide analogue treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2016**, 31 (3), 546-552.
171. Hofmann, U.; Heinkele, G.; Angelberger, S.; Schaeffeler, E.; Lichtenberger, C.; Jaeger, S.; Reinisch, W.; Schwab, M., Simultaneous Quantification of Eleven Thiopurine Nucleotides by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2012**, 84 (3), 1294-1301.
172. Cihlar, T.; Ray, A. S.; Boojamra, C. G.; Zhang, L.; Hui, H.; Laflamme, G.; Vela, J. E.; Grant, D.; Chen, J.; Myrick, F.; White, K. L.; Gao, Y.; Lin, K. Y.; Douglas, J. L.; Parkin, N. T.; Carey, A.; Pakdaman, R.; Mackman, R. L., Design and profiling of GS-9148, a novel nucleotide analog active against nucleoside-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1, and its orally

bioavailable phosphonoamidate prodrug, GS-9131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, 52 (2), 655-665.

173. Singh, K.; Sarafianos, S. G.; Sonnerborg, A., Long-Acting Anti-HIV Drugs Targeting HIV-1 Reverse Transcriptase and Integrase. *Pharmaceuticals* **2019**, 12 (2), 14.

174. Ray, A. S.; Vela, J. E.; Booramra, C. G.; Zhang, L.; Hui, H.; Callebaut, C.; Stray, K.; Lin, K. Y.; Gao, Y.; Mackman, R. L.; Cihlar, T., Intracellular metabolism of the nucleotide prodrug GS-9131, a potent anti-human immunodeficiency virus agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, 52 (2), 648-654.

175. Vela, J. E.; Olson, L. Y.; Huang, A.; Fridland, A.; Ray, A. S., Simultaneous quantitation of the nucleotide analog adefovir, its phosphorylated anabolites and 2'-deoxyadenosine triphosphate by ion-pairing LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, 848 (2), 335-343.

176. Treede, I.; Jakobsen, L.; Kirpekar, F.; Vester, B.; Weitnauer, G.; Bechthold, A.; Douthwaite, S., The avilamycin resistance determinants AviRa and AviRb methylate 23S rRNA at the guanosine 2535 base and the uridine 2479 ribose. *Molecular Microbiology* **2003**, 49 (2), 309-318.

177. Johansen, S. K.; Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Douthwaite, S., Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular Cell* **2006**, 23 (2), 173-182.

178. Kehrenberg, C.; Schwarz, S.; Jacobsen, L.; Hansen, L. H.; Vester, B., A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular Microbiology* **2005**, 57 (4), 1064-1073.

179. Madsen, C. T.; Mengel-Jorgensen, J.; Kirpekar, F.; Douthwaite, S., Identifying the methyltransferases for m(5)U747 and m(5)U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research* **2003**, 31 (16), 4738-4746.

180. Douthwaite, S.; Kirpekar, F., Identifying modifications in RNA by maldi mass spectrometry. In *Rna Modification*, Gott, J. M., Ed. Elsevier Academic Press Inc: San Diego, 2007; Vol. 425, pp 3-20.

181. Kowalak, J. A.; Pomerantz, S. C.; Crain, P. F.; McCloskey, J. A., A novel method for the determination of posttranscriptional modification in RNA by mass-spectrometry. *Nucleic Acids Research* **1993**, 21 (19), 4577-4585.

182. Ross, R. L.; Cao, X. Y.; Limbach, P. A., Mapping Post-Transcriptional Modifications onto Transfer Ribonucleic Acid Sequences by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Biomolecules* **2017**, 7 (1), 13.

183. Calderisi, G.; Glasner, H.; Breuker, K., Radical Transfer Dissociation for De Novo Characterization of Modified Ribonucleic Acids by Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* **2020**, 59 (11), 4309-4313.

184. Ji, P. F.; Wang, X.; Xie, N. N.; Li, Y. J., N6-Methyladenosine in RNA and DNA: An Epitranscriptomic and Epigenetic Player Implicated in Determination of Stem Cell Fate. *Stem Cells International* **2018**, 2018, 18.

185. Huang, W.; Qi, C. B.; Lv, S. W.; Xie, M.; Feng, Y. Q.; Huang, W. H.; Yuan, B. F., Determination of DNA and RNA Methylation in Circulating Tumor Cells by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2016**, 88 (2), 1378-1384.

186. Wu, Y.; Tang, Y. N.; Dong, X. L.; Zheng, Y. Y.; Haruehanroengra, P.; Mao, S.; Lin, Q. S.; Sheng, J., RNA Phosphorothioate Modification in Prokaryotes and Eukaryotes. *Acs Chemical Biology* **2020**, 15 (6), 1301-1305.
187. Beverly, M.; Hagen, C.; Slack, O., Poly A tail length analysis of in vitro transcribed mRNA by LC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2018**, 410 (6), 1667-1677.
188. Taucher, M.; Breuker, K., Characterization of Modified RNA by Top-Down Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, 51 (45), 11289-11292.
189. Huang, T. Y.; Liu, J. A.; McLuckey, S. A., Top-Down Tandem Mass Spectrometry of tRNA Via Ion Trap Collision-Induced Dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 21 (6), 890-898.
190. Griffiths, R. L.; Sisley, E. K.; Lopez-Clavijo, A. F.; Simmonds, A. L.; Styles, I. B.; Cooper, H. J., Native mass spectrometry imaging of intact proteins and protein complexes in thin tissue sections. *International Journal of Mass Spectrometry* **2019**, 437, 23-29.
191. Heck, A. J. R., Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nature Methods* **2008**, 5 (11), 927-933.
192. Hernandez, H.; Robinson, C. V., Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry. *Nature Protocols* **2007**, 2 (3), 715-726.
193. Zhou, M.; Robinson, C. V., When proteomics meets structural biology. *Trends in Biochemical Sciences* **2010**, 35 (9), 522-529.
194. Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H., Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry. *Chemical Reviews* **2001**, 101 (2), 377-390.
195. Turner, K. B.; Kohlway, A. S.; Hagan, N. A.; Fabris, D., Noncovalent Probes for the Investigation of Structure and Dynamics of Protein-Nucleic Acid Assemblies: The Case of NC-Mediated Dimerization of Genomic RNA in HIV-1. *Biopolymers* **2009**, 91 (4), 283-296.
196. Keller, K. M.; Breeden, M. M.; Zhang, J. M.; Ellington, A. D.; Brodbelt, J. S., Electrospray ionization of nucleic acid aptamer/small molecule complexes for screening aptamer selectivity. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 40 (10), 1327-1337.
197. Marchand, A.; Gabelica, V., Native Electrospray Mass Spectrometry of DNA G-Quadruplexes in Potassium Solution. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, 25 (7), 1146-1154.
198. Lin, C.; Yang, D. Z., Human Telomeric G-Quadruplex Structures and G-Quadruplex-Interactive Compounds. In *Telomeres and Telomerase: Methods and Protocols*, 3rd Edition, Songyang, Z., Ed. Springer: Dordrecht, 2017; Vol. 1587, pp 171-196.
199. Marchand, A.; Strzelecka, D.; Gabelica, V., Selective and Cooperative Ligand Binding to Antiparallel Human Telomeric DNA G-Quadruplexes. *Chemistry-a European Journal* **2016**, 22 (28), 9551-9555.
200. Liu, R. Y.; Ye, Y.; Qiang, L. M.; Liao, X. C.; Zhao, Y. F., The fragmentation pathway of the nucleosides under the electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Life Science Journal-Acta Zhengzhou University Overseas Edition* **2008**, 5 (2), 37-40.

201. Strzelecka, D.; Chmielinski, S.; Bednarek, S.; Jemielity, J.; Kowalska, J., Analysis of mononucleotides by tandem mass spectrometry: investigation of fragmentation pathways for phosphate- and ribose-modified nucleotide analogues. *Scientific Reports* **2017**, 7, 12.
202. Tuytten, R.; Lemiere, F.; Van Dongen, W.; Esmans, E. L.; Witters, E.; Herrebout, W.; Van der Veken, B.; Dudley, E.; Newton, R. P., Intriguing mass spectrometric behavior of guanosine under low energy collision-induced dissociation: H₂O adduct formation and gas-phase reactions in the collision cell (vol 16, pg 1904, 2005). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16 (11), 1904-1904.
203. Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T., A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides. *Tetrahedron Letters* **1967**, (50), 5065.
204. Webb, M. R., A method for determining the positional isotope exchange in a nucleoside triphosphate - cyclization of nucleoside triphosphate by dicyclohexylcarbodiimide. *Biochemistry* **1980**, 19 (21), 4744-4748.
205. Rackowska, E.; Bobrowska-Korczak, B.; Giebultowicz, J., Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for determination of methylated nucleosides and nucleobases in urine. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2019**, 1128, 8.
206. Nakamura, M.; Matsuda, K.; Yamashita, K.; Suzuki, T.; Inouye, S., Enzymatic Conversion of Cypridina Luciferyl Sulfate to Cypridina Luciferin with Coenzyme A as a Sulfate Acceptor in Cypridina (*Vargula*) *hilgendorffii*. *Photochemistry and Photobiology* **2019**, 95 (6), 1376-1386.
207. Franco, A.; Ascenso, J. R.; Ilharco, L.; da Silva, J. A. L., Synthesis of ribonucleotides from the corresponding ribonucleosides under plausible prebiotic conditions within self-assembled supramolecular structures. *New Journal of Chemistry* **2020**, 44 (6), 2206-2209.
208. Suarez-Marina, I.; Abul-Haija, Y. M.; Turk-MacLeod, R.; Gromski, P. S.; Cooper, G. J. T.; Olive, A. O.; Colon-Santos, S.; Cronin, L., Integrated synthesis of nucleotide and nucleosides influenced by amino acids (vol 2, 28, 2019). *Communications Chemistry* **2019**, 2, 1.
209. Tian, H.; Sparvero, L. J.; Blenkinsopp, P.; Amoscato, A. A.; Watkins, S. C.; Bayir, H.; Kagan, V. E.; Winograd, N., Secondary-Ion Mass Spectrometry Images Cardiolipins and Phosphatidylethanolamines at the Subcellular Level. *Angewandte Chemie-International Edition* **2019**, 58 (10), 3156-3161.
210. Fechter, P.; Brownlee, G. G., Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *Journal of General Virology* **2005**, 86, 1239-1249.
211. Gu, M. G.; Fabrega, C.; Liu, S. W.; Liu, H. D.; Kiledjian, M.; Lima, C. D., Insights into the structure, mechanism, and regulation of scavenger mRNA decapping activity. *Molecular Cell* **2004**, 14 (1), 67-80.
212. Arase, S.; Kimura, S.; Ikegami, T., Method optimization of hydrophilic interaction chromatography separation of nucleotides using design of experiment approaches I: Comparison of several zwitterionic columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, 158, 307-316.
213. Jiao, X. F.; Xiang, S.; Oh, C.; Martin, C. E.; Tong, L. A.; Kiledjian, M., Identification of a quality-control mechanism for mRNA 5'-end capping. *Nature* **2010**, 467 (7315), 608-U137.
214. Buschmann, J.; Moritz, B.; Jeske, M.; Lilie, H.; Schierhorn, A.; Wahle, E., Identification of *Drosophila* and Human 7-Methyl GMP-specific Nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288 (4), 2441-2451.

215. Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Shugar, D., Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics* **2000**, 88 (3), 349-425.
216. Chen, C. Y.; Gherzi, R.; Ong, S. E.; Chan, E. K. L.; Raijmakers, R.; Pruijn, G. J. M.; Stoecklin, G.; Moroni, C.; Mann, M.; Karin, M., AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **2001**, 107 (4), 451-464.
217. Li, S.; Jia, Y.; Jacobson, B.; McCauley, J.; Kratzke, R.; Bitterman, P. B.; Wagner, C. R., Treatment of Breast and Lung Cancer Cells with a N-7 Benzyl Guanosine Monophosphate Tryptamine Phosphoramidate Pronucleotide (4Ei-1) Results in Chemosensitization to Gemcitabine and Induced eIF4E Proteasomal Degradation. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, 10 (2), 523-531.
218. De Benedetti, A.; Graff, J. R., eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **2004**, 23 (18), 3189-3199.
219. Golojuch, S.; Kopcial, M.; Strzelecka, D.; Kasprzyk, R.; Baran, N.; Sikorski, P. J.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Exploring tryptamine conjugates as pronucleotides of phosphate -modified 7-methylguanine nucleotides targeting cap -dependent translation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2020**, 28 (13), 13.
220. Chou, T. F.; Baraniak, J.; Kaczmarek, R.; Zhou, X.; Cheng, J. L.; Ghosh, B.; Wagner, C. R., Phosphoramidate pronucleotides: A comparison of the phosphoramidase substrate specificity of human and Escherichia coli histidine triad nucleotide binding proteins. *Molecular Pharmaceutics* **2007**, 4 (2), 208-217.
221. Wanat, P.; Kasprzyk, R.; Kopcial, M.; Sikorski, P. J.; Strzelecka, D.; Jemielity, J.; Kowalska, J., ExciTides: NTP-derived probes for monitoring pyrophosphatase activity based on excimer-to-monomer transitions. *Chemical Communications* **2018**, 54 (70), 9773-9776.
222. Strzelecka, D.; Smietanski, M.; Sikorski, P. J.; Warminski, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression. *RNA (New York, N.Y.)* **2020**, 26 (12), 1815-1837.
223. Baranowski, M. R.; Nowicka, A.; Rydzik, A. M.; Warminski, M.; Kasprzyk, R.; Wojtczak, B. A.; Wojcik, J.; Claridge, T. D. W.; Kowalska, J.; Jemielity, J., Synthesis of Fluorophosphate Nucleotide Analogues and Their Characterization as Tools for ¹⁹F NMR Studies. *Journal of Organic Chemistry* **2015**, 80 (8), 3982-3997.
224. Williams, E.; Sung, S.; Laskowski, M., ACTION OF VENOM PHOSPHODIESTERASE ON DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *Journal of Biological Chemistry* **1961**, 236 (4), 1130.
225. Yehudai-Resheff, S.; Schuster, G., Characterization of the E.coli poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28 (5), 1139-1144.
226. Balbo, P. B.; Bohm, A., Mechanism of Poly(A) polymerase: Structure of the enzyme-MgATP-RNA ternary complex and kinetic analysis. *Structure* **2007**, 15 (9), 1117-1131.
227. Hall, A. H. S.; Wan, J.; Shaughnessy, E. E.; Shaw, B. R.; Alexander, K. A., RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic Acids Research* **2004**, 32 (20), 5991-6000.
228. Eckstein, F., Nucleoside phosphorothioates. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92 (15), 4718.

229. Jemielity, J.; Stepinski, J.; Jaremko, M.; Haber, D.; Stolarski, R.; Rhoads, R. E.; Darzynkiewicz, E., Synthesis of novel mRNA 5' cap-analogues: Dinucleoside P-1, P-3-tri-, P-1, P-4-tetra-, and P-1, P-5-pentaphosphates. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 22 (5-8), 691-694.
230. Kalek, M.; Jemielity, J.; Stepinski, J.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E., A direct method for the synthesis of nucleoside 5'-methylenebis(phosphonate)s from nucleosides. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46 (14), 2417-2421.
231. Mukherjee, D.; Fritz, D. T.; Kilpatrick, W. J.; Gao, M.; Wilusz, J., mRNA Processing and Metabolism. Humana Press Inc: Totowa, NJ, 2004; Vol. 257.
232. Coleman, T. M.; Wang, G. C.; Huang, F. Q., Superior 5' homogeneity of RNA from ATP-initiated transcription under the T7 phi 2.5 promoter. *Nucleic Acids Research* **2004**, 32 (1), 4.