

Streszczenie rozprawy doktorskiej

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

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

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

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

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