

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Mateusz Kozarski

Numer albumu 325608

Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania białek zaangażowanych w metabolizm końca 5' mRNA

Rozprawa doktorska

Dyscyplina naukowa: Nauki fizyczne

Praca wykonana pod kierunkiem

Dr hab. Joanny Kowalskiej

w Laboratorium Chemii Biofizycznej w Zakładzie Biofizyki,

Instytutu Fizyki Doświadczalnej,

Wydziału Fizyki, Uniwersytetu Warszawskiego oraz

w Laboratorium Chemii Biologicznej

w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, 2023

*Badania zrealizowano w ramach projektu TEAM POIR.04.04.00-00-20A2/16-00
finansowanego ze środków Fundacji na rzecz Polskiej Nauki oraz projektów OPUS (2018/31/B/ST5/03821)
oraz SONATINA (UMO-2017/24/C/NZ1/00169) finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki*

Podziękowania

Serdeczne podziękowania składam:

Promotor – dr hab. Joannie Kowalskiej za ogrom przekazanej wiedzy podczas całej mojej kariery naukowej, opiekę merytoryczną, pomoc oraz wsparcie nie tylko w sprawach naukowych

Profesorowi Jackowi Jemielitemu za możliwość realizacji badań w laboratorium, przekazaną wiedzę i doświadczenie, za wsparcie oraz wszelką pomoc na każdym etapie naukowym

Dr Dorocie Kubackiej za owocną współpracę oraz wsparcie od strony biologicznej niniejszej rozprawy

Dr Dominice Strzeleckiej oraz mgr Marcelinie Bednarczyk za wykonanie pomiarów biofizycznych

Dr Karolinie Drązkowskiej za wykonanie badań biologicznych w liniach komórkowych

Dr. Marcinowi Warmińskiemu za pomoc merytoryczną i przekazaną mi wiedzę na temat syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym oraz wiele ciekawych rozmów, niekoniecznie tych naukowych

Dr. Mikołajowi Chromińskiemu za przekazane mi doświadczenie dotyczące chemii bioorganicznej, za wnikliwe sprawdzenie części eksperymentalnej niniejszej rozprawy oraz za wspólne rozmowy i żarty

Dr. Markowi Baranowskiemu za naukę obsługi NMR oraz syntezę związków chemicznych wykorzystanych w niniejszej rozprawie

Mgr. Inż. Sebastianowi Chmielińskiemu za nieocenioną pomoc w sprawach formalnych i administracyjnych, a także za bycie kompanem podróży w wielu wyprawach rowerowych

Koleżankom i kolegom z Laboratorium Chemii Biologicznej i Biofizycznej za wspólnie spędzone lata na uniwersytecie, dyskusje, rozmowy i super atmosferę

Na koniec chciałbym złożyć najserdeczniejsze podziękowania mojej **Gosi**, bez której nie ukończyłbym pisanie niniejszej rozprawy. Za wiarę we mnie, wsparcie na każdym kroku, motywowanie mnie i cierpliwość do mnie w tym trudnym dla mnie czasie. Dziękuję, że byłaś i jesteś!

Spis publikacji

1. 7-Methylguanosine monophosphate analogues with 5'-(1,2,3-triazoyl) moiety: Synthesis and evaluation as the inhibitors of cNIIIB nucleotidase; Mateusz Kozarski§, Dorota Kubacka§, Błażej Wojtczak, Renata Kasprzyk, Marek Baranowski, Joanna Kowalska, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2018**, 26(1), 191-199.
2. Substrate-Based Design of Cytosolic Nucleotidase IIIB Inhibitors and Structural Insights into Inhibition Mechanism; Dorota Kubacka§, Mateusz Kozarski§, Marek R. Baranowski, Radosław Wójcik, Joanna Panecka-Hofman, Dominika Strzelecka, Jerome Basquin, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; *Pharmaceuticals* **2022**, 15(5), 554
3. Towards superior mRNA caps accessible by click chemistry: synthesis and translational properties of triazole-bearing oligonucleotide cap analogs; Mateusz Kozarski, Karolina Drazkowska, Marcelina Bednarczyk, Marcin Warminski, Jacek Jemielity and Joanna Kowalska; *RSC Advances* **2023**, 13, 12809-1282
4. M. Chrominski, M. Kozarski i wsp. Proximity-induced SuFEx increases the potency of substrate-derived inhibitors of cytosolic nucleotidase IIIB - w przygotowaniu

§ - równorzędne współautorstwo publikacji

Spis doniesień konferencyjnych

1. Young Researchers Symposium, Stockholm, Sweden, **2022**. Wystąpienie ustne pt. Synthesis and biological properties of novel triazole-containing, trinucleotide analogs of the 7-mehtylguanosine mRNA cap'.
2. XXIV International Round Tabel of Nucleoside, Nucleotide and Nucleic Acid, Stockholm, Sweden, **2022**. Prezentacja plakatu pt. *Synthesis and biological properties of novel triazole- containing, trinucleotide analogs of the 7-mehtylguanosine mRNA cap*.
3. IS3NA-IRT Virtual Symposium, Międzynarodowa Konferencja online, 2021. Prezentacja plakatu pt. *Synthesis and evaluation of novel triazole trinucleotide cap analogs*.
4. Sympozjum Młodych Naukowców, Konferencja online, **2021**. Wystąpienie ustne pt. *Nowe analogi 5'-monofosforanu 7- metyloguanozyny jako nowe narzędzie molekularne do badania roli ludzkiego enzymu 5'-nukleotydyazy IIIB*.
5. Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota (wknko), Konferencja online, **2021**. Prezentacja plakatu pt. *Synteza i ewaluacja nowych triazolowych trinukleotydydowych analogów kapu*
6. Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota (wknko), Konferencja online, **2020**. Prezentacja plakatu pt. *New 7-methylguanosine 5'-monophospahte analogues – synthesis and their application as molecular tools to investigate the role of 5'-nucleotidases IIIB in mRNA degradation*
7. Sympozjum Młodych Naukowców, Konferencja online, **2020**. Wystąpienie ustne pt. *Nowe analogi 5'-monofosforanu 7- metyloguanozyny jako nowe narzędzie molekularne do badania roli ludzkiego enzymu 5'-nukleotydyazy IIIB*

8. 12th European Biophysical Societies' Association/10th ICBP-IUPAP Congress, Madrid, Spain, **2019**. Prezentacja plakatu pt. 7- *methylguanosine 5'-monophosphate analogues as molecular tools to investigate the role of human cytosolic 5' nucleotidase IIIB (cNIIIB)*
9. 62. Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Warszawa, Polska, **2019**. Prezentacja plakatu pt. *Synteza nowych analogów 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny oraz ich zastosowanie w badaniu roli ludzkiej 5'- nukleotydyazy IIIB*

Spis treści

I	Wprowadzenie	13
II	Część literaturowa	16
II.1	Metabolizm końca 5' mRNA.....	16
II.1.1	Biosynteza eukariotycznego mRNA oraz jego elementy strukturalne.....	16
II.1.2	Transkrypcja – synteza <i>pre</i> -mRNA.....	16
II.1.3	Ko-transkrypcyjne modyfikacje mRNA – dojrzewanie <i>pre</i> -mRNA.....	17
II.1.4	Biosynteza końca 5' mRNA – kapu oraz jego budowa.....	17
II.1.5	Biologiczna rola końca 5' mRNA – kapu	20
II.1.6	Splicing mRNA oraz 3'-poliadenylacja mRNA.....	20
II.1.7	Translacja mRNA.....	21
II.1.8	Translacja zależna od kapu	21
II.1.9	Degradacja mRNA.....	22
II.1.9.1	Ścieżki degradacji mRNA	23
II.2	Białka zaangażowane w metabolizm nukleotydów	24
II.2.1	Enzymy odpowiedzialne za metabolizm nukleotydów – 5' nukleotydyazy.....	25
II.2.1.1	Ekto- i mitochondrialna 5'-nukleotydyaza.....	26
II.2.1.2	Cytozolowe 5'-nukleotydyazy	26
II.2.2	Cytozolowa 5'-nukleotydyaza IIIB i jej potencjalny udział w metabolizmie pochodnych końca 5' mRNA	27
II.2.2.1	Pierwsze nukleotydowe inhibitory enzymu cN-IIIB.....	29
II.3	Inne białka zaangażowane w metabolizm końca 5' mRNA jako cele terapeutyczne.....	30
II.4	Synteza naturalnych i modyfikowanych nukleotydów oraz kwasów nukleinowych	31
II.4.1	Synteza mono-, di- oraz trifosforanów nukleozydów	31
II.4.1.1	Reakcje fosforylacji nukleozydów	31
II.4.1.2	Reakcje wydłużania łańcucha fosforanowego.....	32
II.4.2	Synteza 7-metyloguanozyny oraz 5'-fosforanów 7-metyloguanozyny – reakcja metylacji.....	33
II.4.3	Synteza oligonukleotydów za pomocą syntezy na podłożu stałym	34
II.4.4	Synteza mRNA – reakcja transkrypcji <i>in vitro</i>	37
II.5	Synteza kapowanego RNA – mRNA.....	38
II.6	Synteza analogów nukleotydów.....	41

II.7	Przykłady modyfikowanych nukleotydów z uwzględnieniem modyfikacji końca 5' mRNA.....	42
II.7.1	Nukleotydy z modyfikacją w obrębie zasady azotowej.....	42
II.7.2	Nukleotydy z modyfikacją w obrębie reszty fosforanowej	42
II.7.3	Nukleotydy z modyfikacją w obrębie rybozy	43
II.8	Pronukleotydy – koń trojański w świecie komórek	44
II.8.1	Budowa amidofosforanowych pronukleotydów	45
II.8.2	Synteza pronukleotydów	46
II.8.3	Metabolizm pronukleotydów	48
II.9	Zastosowanie reakcji typu click chemisty w chemii nukleotydów	49
II.9.1	Reakcje typu „click chemisty”	49
II.9.2	Przykłady zastosowań reakcji typu click chemisty w syntezie modyfikowanych nukleotydów i nukleotydów	53
II.10	Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia molekularne do badania mRNA....	59
II.10.1	Wykorzystanie modyfikowanych nukleotydów jako narzędzi do badania metabolizmu mRNA	59
II.10.2	Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania degradacji końca 5' mRNA i jego metabolitów.....	60
II.10.3	Analogi końca 5' mRNA jako narzędzia do badania translacji mRNA	65
II.11	Terapeutyczne mRNA – przyszłość terapii przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych.....	71
II.11.1	Rodzaje terapii wykorzystujące technologię mRNA	72
II.11.1.1	Immunoterapia mRNA	72
II.11.1.2	Terapia zastępcza	73
II.11.2	Ograniczenia terapii bazujących na technologii mRNA.....	73
II.12	Perspektywy rozwoju terapii mRNA.....	75
III	Badania własne	77
III.1	Motywacja do badań	77
III.2	Cel badań.....	80
III.3	Pochodne 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny jako narzędzia służące do badania aktywności ludzkiego enzymu cN-IIIB	81
III.4	Badanie właściwości substratowych i inhibitorowych analogów 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny względem ludzkiego enzymu cNIIIB	82
III.4.1	Badania wstępne	82

III.4.2	Badanie aktywności enzymu przy użyciu metody kolorymetrycznej – analiza zieleni malachitową	87
III.4.3	Wyznaczanie wartości parametru IC ₅₀ dla potencjalnych inhibitorów z pierwszej biblioteki związków względem enzymu cN-IIIIB	89
III.4.4	Nowe analogii m ⁷ GMP jako potencjalne inhibitory enzymu cN-IIIIB	90
III.4.5	Podsumowanie badań wstępnych dotyczących aktywności enzymu cN-IIIIB.....	93
III.5	Benzytowe analogi m⁷GMP jako nowe potencjalne inhibitory enzymu cN-IIIIB93	
III.5.1	Właściwości substratowe oraz inhibitorowe biblioteki związków benzytowych względem enzymu cN-IIIIB	94
III.5.2	Selektywność inhibitorów enzymu cN-IIIIB.....	98
III.5.2.1	Selektywność inhibitorów enzymu cN-IIIIB względem enzymu cN-IIIA.....	99
III.5.2.2	Oddziaływanie inhibitorów cN-IIIIB z białkiem eIF4E	103
III.6	Wykorzystanie inhibitorów enzymu cN-IIIIB do badań biofizycznych i strukturalnych.....	106
III.6.1	Weryfikacja roli enzymu cN-IIIIB w degradacji metabolitów struktury kapu przy użyciu spektrometrii mas	106
III.6.2	Badania krystalograficzne ludzkiego enzymu cN-IIIIB w kompleksie z inhibitorami	108
III.7	Benzytowe pochodne guaniny	111
III.7.1	Synteza benzytowych analogów guaniny	112
III.7.2	Własności inhibitorowe pochodnych guaniny względem ludzkiego enzymu cN-IIIIB ..	114
III.8	Terapeutyczny potencjał inhibitorów enzymu cN-IIIIB – synteza inhibitorów enzymu cN-IIIIB w wersji pronukleotydowej	115
III.8.1	Synteza pronukleotydów	116
III.9	Analogi 5'-monofosforanów 7-metyloguanozyny typu SuFEX (ang. Sulfur (VI) Fluoride Exchange).....	118
III.9.1	Wyznaczenie parametru IC ₅₀ dla fluorosulfonowych i fluorosiarczanowych pochodnych m ⁷ GMP i Bn ⁷ GMP przy użyciu analizy zieleni malachitową	120
III.9.2	Badanie wytwarzania wiązania kowalencyjnego w kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIIB i białka eIF4E przy użyciu spektrometrii mas	123
III.10	Podsumowanie pierwszej części rozprawy doktorskiej dotyczącej enzymu cN-IIIIB	125
III.11	Triazolowe analogi kapu jako narzędzia do badania procesu translacji mRNA	126
III.11.1	Synteza dinukleotydów posiadających ugrupowanie azydkowe w pozycji 5' rybozy przy użyciu syntezy na podłożu stałym	130
III.11.1.1	Synteza dinukleotydów na podłożu stałym.....	130
III.11.2	Analogi 5'-trifosforanów 7-metyloguanozyny z ugrupowaniem alkinowym	137

III.11.3	Synteza trinukleotydowych analogów końca 5' mRNA z modyfikacją w obrębie mostka trifosforanowego	138
III.11.4	Synteza analogów końca 5' mRNA w modyfikowanych obrębie wiązania 5',3'-fosfodiesterowego.....	139
III.11.4.1	Analogi kapu z ugrupowaniem alkinowym w obrębie rybozy	140
III.11.4.2	Synteza tri- i tetranukleotydowych analogów kapu z triazolową modyfikacją w obrębie pierwszego wiązania fosfodiesterowego	142
III.12	Wpływ triazolowych modyfikacji końca 5' mRNA na właściwości biologiczne mRNA	144
III.12.1	Wbudowywanie modyfikowanych triazolem analogów kapu do krótkich i długich fragmentów mRNA – reakcja transkrypcji in vitro.....	144
III.12.1.1	Synteza krótkich, kapowanych fragmentów RNA.....	144
III.12.1.2	Synteza długich, kapowanych fragmentów RNA kodujących białko Gaussia lucyferazę	145
III.12.2	Wydajność procesu kapingu RNA	148
III.12.3	Wydajność procesu translacji w lizacie komórkowym z retikulocytów króliczych (RRL)	149
III.12.4	Produkcja białka lucyferazy Gaussia w komórkach dendrytycznych JAWS II	152
III.12.5	Oddziaływanie triazolowych analogów kapu z czynnikiem inicjującym translację 4E (eIF4E)	154
III.12.6	Odporność mRNA zakończonego triazolowymi analogami kapu na degradację enzymatyczną przez kompleks hDcp1/Dcp2.....	157
III.13	Perspektywy na dalsze badania triazolowych trinukleotydowych analogów końca 5' mRNA	158
III.14	Podsumowanie drugiej części rozprawy doktorskiej dotyczącej triazolowych analogów kapu	164
IV	Podsumowanie	167
V	Część eksperymentalna	174
V.1	Informacje ogólne	174
V.2	Techniki chromatograficzne	174
V.2.1	Chromatografia kolumnowa ze złożem jonowymiennym	174
V.2.2	Chromatografia kolumnowa ze złożem krzemionkowym	175
V.2.3	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) analityczna i półpreparatywna	175
V.2.3.1	Metody RP HPLC stosowane podczas monitorowania przebiegu reakcji chemicznych oraz oczyszczania związków	175

V.3	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometria mas (MS) i wysokorozdzielcza spektrometria mas (HRMS).....	176
V.3.1	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (<i>ang. Nuclear Magnetic Resonance</i> , NMR) 176	
V.3.2	Spektrometria mas (MS) i wysokorozdzielcza spektrometria mas (HR MS).....	176
V.4	Syntezy chemiczne	177
V.4.1	Benzytowe analogi guaniny – procedura ogólna (A)	177
V.4.1.1	Synteza 7-Benzyloguaniny (S19')	177
V.4.1.2	Synteza 7-(3-Metylobenzylo)guaniny (S36')	177
V.4.1.3	Synteza 7-(3,4-Difluorobenzylo)guaniny (S37').....	178
V.4.1.4	Synteza N7,9-bis-(3,4-Difluorobenzylo) guaniny (S37'')	178
V.4.2	Synteza 5'-amidofosforanu N7-3,4-Difluorobenzyloguanozyny – 3,4diFBn ⁷ GMP(OPh)-Ala-Bn 178	
V.4.2.1	Synteza 5'-O-Ph-H-fosfonianu 2',3'-izopropylidenoguanozyny (40)	179
V.4.2.2	Synteza 5'-O-Ph-Ala-amidofosforanu 2',3'-izopropylidenoguanozyny (41).....	179
V.4.2.3	Synteza 5'-O-Ph-Ala amidofosforanu guanozyny (42)	180
V.4.2.4	Synteza 5'-O-Ph-Ala-amidofosforanu N7-(3,4-Difluorobenzylo)guanozyny (ProTide S37) 180	
V.4.3	Synteza 3,4-diFB ⁷ GMP-TA.....	181
V.4.3.1	Synteza 3,4-diFBn ⁷ GMP (S37).....	181
V.4.3.2	Synteza 5'-imidazolowej pochodnej 3,4-diFBn ⁷ GMP	181
V.4.3.3	Synteza 3,4-diFB ⁷ GMP-TA.....	182
V.4.4	Synteza amidofosforynów do syntezy dinukleotydów na podłożu stałym	182
V.4.4.1	Synteza 5'-amidofosforynu N6,2'-O- -dimetyloadenozyny (5'-O-DMT-2'-OMe-N6-MeA-Pac).....	182
V.4.4.2	Synteza 5'-amidofosforynu N6-benzylo-2'-O- -metyloadenozyny (5'-O-DMT-2'-OMe-N6-Bn-A-Pac)	183
V.4.5	Synteza 5'-azydo-5'-deoksydinukleotydów na podłożu stałym – procedury ogólne	183
V.4.5.1	Synteza dinukleotydów na podłożu stałym za pomocą syntetyzera RNA – procedura ogólna B 183	
V.4.5.2	Manualna synteza dinukleotydów na podłożu stałym – procedura ogólna C.....	184
V.4.5.3	Synteza 5'-jodo-5'-deoksydinukleotydów – procedura ogólna D	184
V.4.5.4	Synteza 5'-azydo-5'-deoksydinukleotydów – procedura ogólna E	185
V.4.5.5	Odbezpieczanie i odcinanie dinukleotydów od podłoża – procedura ogólna F.....	185
V.4.5.6	Synteza 5'-N ₃ -ApG (12a)	185
V.4.5.7	Synteza 5'-N ₃ -A _m pG (12b)	186
V.4.5.8	Synteza 5'-N ₃ - ^{m6} A _m pG (12d).....	186
V.4.6	Synteza 5'-(2-azydo-etylo)-fosforanu dinukleotydu – procedura ogólna F.....	186
V.4.6.1	Synteza 5'-(2-bromoetylo)-fosforanu dinukleotydu.....	186
V.4.6.2	Reakcja 5'-azydowania.....	187

V.4.6.3	Odbezpieczanie i odcinanie dinukleotydu	187
V.4.6.4	Synteza 5'-N ₃ -C ₂ H ₄ pAmpG (12c)	187
V.4.6.5	Synteza 5'-N ₃ -C ₂ H ₄ p ^{m6} AmpG (12e).....	188
V.4.6.6	Synteza 5'-N ₃ -C ₂ H ₄ p ^{Bn6} AmpG (12f).....	188
V.4.7	Synteza trinukleotydowych analogów kapu przy użyciu reakcji CuAAC – procedura ogólna	
G	188	
V.4.7.1	Synteza m ⁷ Gppp-tr-ApG (1)	189
V.4.7.2	Synteza m ⁷ Gppp-tr-AmpG (2)	189
V.4.7.3	Synteza m ⁷ Gppp-CH ₂ -tr-ApG (3).....	190
V.4.7.4	Synteza m ⁷ Gppp-CH ₂ -tr-AmpG (4).....	191
V.4.7.5	Synteza m ⁷ Gppp-CH ₂ -tr- ^{m6} AmpG (4a)	191
V.4.7.6	Synteza m ⁷ Gppp-C ₂ H ₄ -tr-ApG (5)	192
V.4.7.7	Synteza m ⁷ Gppp-C ₂ H ₄ -tr-AmpG (6)	192
V.4.7.8	Synteza of m ⁷ GpppOCH ₂ -tr-ApG (7)	193
V.4.7.9	Synteza m ⁷ GpppOCH ₂ -tr-AmpG (8)	193
V.4.7.10	Synteza m ⁷ Gppp-tr-C ₂ H ₄ pAmpG (9).....	194
V.4.7.11	Synteza m ⁷ Gppp-tr-C ₂ H ₄ p ^{m6} AmpG (9a)	194
V.4.7.12	Synteza m ⁷ Gppp-tr-C ₂ H ₄ p ^{Bn6} AmpG (9b)	195
V.4.7.13	Synteza m ⁷ GpppG-(2' i 3')O-karb-CH ₂ -tr-ApG (10a i 10b).....	196
V.4.7.14	Synteza m ⁷ GpppA _m -3'O-CH ₂ -tr-G	197
V.4.7.14.1	Synteza 2'-OMe-3'-OC ₃ H ₃ adenozyiny (18).....	197
V.4.7.14.2	Synteza 5'-monofosforanu 2'-OMe-3'-OC ₃ H ₃ adenozyiny (19).....	197
V.4.7.14.3	Synteza m ⁷ GpppA _m -3'-OC ₃ H ₃ (20)	198
V.4.7.15	Synteza m ⁷ GpppA _m -3'-OCH ₂ -tr-G (11)	198
V.4.8	Badania biochemiczne i biologiczne.....	199
V.4.8.1	Badanie aktywności enzymu cN-IIIA i cN-IIIB przy użyciu kolorymetrii.....	199
V.4.8.2	Podatność na hydrolizę enzymatyczną benzytowych analogów m ⁷ GMP	199
V.4.8.2.1	Inhibicja enzymu cN-IIIA i cN-IIIB.....	199
V.4.8.3	Wyznaczanie wartości parametru IC ₅₀ względem enzymu cN-IIIBz.....	200
V.4.9	Przygotowanie matrycy dsDNA – trawienie plazmidu przy użyciu enzymu restrykcyjnego	
AarI	201	
V.4.10	Wyznaczanie wydajności translacji kapowanych mRNA w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych	202
V.4.10.1	Reakcja translacji in vitro w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych ...	202
V.4.10.2	Wyznaczenie wydajności translacji mRNA.....	202
V.4.11	Wyznaczenie stałej dysocjacji dla triazolowych trinukleotydowych analogów kapu względem białka eIF4E	203
VI	Wykaz skrótów.....	204
VII	Literatura	205

I Wprowadzenie

Z chemicznego punktu widzenia kwasy rybonukleinowe (RNA) są polimerami zbudowanymi z rybonukleozydów połączonych wiązaniem 3',5'- fosfodiesterowym. W skład rybonukleozydów budujących RNA wchodzi rybozydy zasad purynowych: adenozyina (A) i guanozyina (G) oraz rybozydy zasad pirymidynowych: cytozyna (C) i urydyna (U). Z biologicznego punktu widzenia, RNA są biopolimerami, powstałymi w procesie transkrypcji na matrycy DNA. Jednym z przedstawicieli RNA jest informacyjne RNA – mRNA (*ang. messenger RNA*), którego funkcją jest przechowywanie informacji genetycznej. Informacją zakodowaną w mRNA jest sekwencja aminokwasów budujących funkcjonalne białko, które jest biosyntezowane w procesie translacji. Na końcu 5' eukariotycznego mRNA znajduje się struktura zwana czapczką (kapem). Jest to zazwyczaj dodatnio naładowana 7-metyloguanozyina (m^7G) połączona z pierwszym transkrybowanym nukleotydem mostkiem 5',5'-trifosforanowym ($m^7GpppN^1pN^2$). Kap bierze udział w wielu ważnych procesach biologicznych zachodzących w komórkach eukariotycznych, takich jak dojrzewanie czy transport mRNA. Kap chroni mRNA przed przedwczesną degradacją przez 5'-egzonukelazy, reguluje proces translacji mRNA, a także odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu komórkowego i obcego mRNA przez układ immunologiczny. Z powodu pełnienia tak istotnych funkcji, struktura kapu oraz jej pochodne stały się bardzo interesującym obiektem chemicznych modyfikacji. Chemiczne modyfikowane analogi i pochodne kapu są obecnie wykorzystywane do monitorowania procesów komórkowych związanych z mRNA, jako narzędzia molekularne do badania białek rozpoznających strukturę kapu, jako reagenty do produkcji szczepionek mRNA, a także mają wiele innych potencjalnych zastosowań terapeutycznych, m.in. w terapiach przeciwnowotworowych.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza nowych, chemicznie modyfikowanych analogów nukleotydów, które mogłyby umożliwić badania wybranych procesów związanych z metabolizmem końca 5' mRNA (kapu).

Swoją uwagę skupiłem na analogach kapu i jego pochodnych, które można wykorzystać do badania procesu translacji mRNA oraz degradacji metabolitów końca 5' mRNA. Translacja oraz degradacja mRNA są to bardzo złożone procesy, w które zaangażowane jest szereg białek. W pierwszej części niniejszej rozprawy wykorzystałem analogi 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny (m^7GMP) do badania roli ludzkiego enzymu cytozolowej 5'-nukleotydyazy IIIB (*cN-IIIB*). Cytozolowa 5'-nukleotydyaza IIIB (*cN-IIIB*), jest niedawno odkrytym enzymem należącym do rodziny 5'-nukleotydzaz. Rolą 5'-nukleotydzaz jest kontrolowanie stężenia 5'-monofosforanów nukleozydów (*NMP*) w komórkach poprzez katalizowanie reakcji ich

defosforylacji. W komórkach organizmów eukariotycznych do tej pory zidentyfikowano sześć cytozolowych 5'-nukleotydz, które różnią się specyficznością substratową. Enzym cN-IIIB jest unikalną 5'-nukleotydzą z punktu widzenia specyficzności substratowej, ponieważ katalizuje on reakcję defosforylacji 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny, który jest jednym z metabolitów końca 5' mRNA. Do tej pory, rola enzymu cN-IIIB nie została w pełni poznana. Jednak jego specyficzność substratowa sugeruje, że może on brać udział w jednym z końcowych etapów degradacji końca 5' mRNA, a także w dezaktywacji aktywnych form terapeutyków pochodzenia nukleozydowego. W części rozprawy dotyczącej enzymu cN-IIIB, skupiłem się na poszukiwaniu inhibitorów enzymu cN-IIIB. Wstępne badania nad tym zagadnieniem rozpocząłem jeszcze na studiach pierwszego i drugiego stopnia odkrywając pierwszy inhibitor tego enzymu, o umiarkowanej aktywności. Podczas studiów doktoranckich, na podstawie doniesień literaturowych i wcześniejszych badań własnych, skonstruowałem bibliotekę potencjalnych inhibitorów (tzw. bibliotekę I generacji) enzymu cN-IIIB i zbadałem ich właściwości inhibitorowe w stosunku do rekombinowanego enzymu. Wytypowałem sześć struktur wiodących, na podstawie których skonstruowałem bibliotekę inhibitorów II generacji. Wyselekcjonowane, najsilniejsze inhibitory II generacji zostały zastosowane jako narzędzia do badań w lizatach komórkowych, mających na celu weryfikację roli enzymu cN-IIIB w degradacji metabolitów struktury kapu. Najsilniejsze inhibitory enzymu cN-IIIB zostały również wykorzystane do badań strukturalnych, dzięki którym otrzymano pierwszą strukturę krystalograficzną ludzkiego enzymu cN-IIIB wraz z ligandem. Wyselekcjonowane inhibitory enzymu cN-IIIB przekształciłem również w pronukleotydy, które mogą przenikać przez błonę komórkową do wnętrza komórki. Na koniec, zbadałem właściwości inhibitorowe nowych analogów m^7GMP , zaprojektowanych na podstawie struktury znalezionych przeze mnie inhibitorów, posiadających grupę funkcyjną umożliwiającą tworzenie wiązania kowalencyjnego w kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB. Dzięki tym badaniom zidentyfikowałem inhibitor kowalencyjny, który wykazał niemal 100 krotnie większą aktywność *in vitro* niż inhibitory niekowalencyjne.

Druga część niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczyła opracowania syntezy nowych, trinukleotydowych analogów kapu przy użyciu reakcji typu „click” i wykorzystanie otrzymanych analogów kapu do badania procesu kap-zależnej translacji (*ang. cap-dependent translation*) mRNA. Chemicznie modyfikowane analogi kapu są powszechnie stosowane jako narzędzia molekularne służące do badania procesów komórkowych kontrolowanych przez białka rozpoznające strukturę 7-metyloguanozyny (białka kap-zależne). Jednym z białek kap-zależnych jest eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (*ang. eukaryotic initiation translation factor 4E*), w skrócie *eIF4E*. Rolą białka *eIF4E* jest regulowanie procesu kap-zależnej translacji (*ang. cap-dependent translation*) mRNA. Białko *eIF4E* inicjuje proces translacji poprzez

bezpośrednie związanie struktury kapu. Chemicznie modyfikowane analogi kapu powszechnie wykorzystuje się do monitorowania translacji i inhibicji translacji mRNA. W swoim projekcie doktorskim skupiłem się na badaniu procesu kap-zależnej translacji. W tym celu zaprojektowałem i zsyntezowałem 15 triazolowych tri- i tetranukleotydowych analogów kapu. Związki te zostały zaprojektowane i zsyntezowane w oparciu o dotychczasową wiedzę na temat triazolowych analogów końca 5' mRNA i w połączeniu ich z technologią trinukleotydów. Zaprojektowana przeze mnie ścieżka syntetyczna, wykorzystywała chemię typu „click”, która miała na celu przyspieszenie i uproszczenie syntezy tri- i tetranukleotydowych analogów kapu, a otrzymane przeze mnie związki miały wydajnie wbudowywać się do mRNA oraz promować proces translacji takiego mRNA. Otrzymane przeze mnie analogi kapu wbudowałem w reakcji transkrypcji *in vitro* do mRNA, które następnie posłużyło do badania wpływu wprowadzonych przeze mnie modyfikacji na proces translacji mRNA zarówno *in vitro*, jak i w żywych komórkach.

Opisany w niniejszej rozprawie projekt doktorski był projektem interdyscyplinarnym, w którym zajmowałem się zarówno syntezą chemiczną pochodnych końca 5' mRNA jak i ich charakterystyką za pomocą testów biofizyczno-biochemicznych i biologicznych.

II Część literaturowa

II.1 Metabolizm końca 5' mRNA

Słowo metabolizm pochodzi od greckiego słowa „*metabole* – gr. *Μεταβολη*”, które w dosłownym tłumaczeniu oznacza „zmianę”. Z biologicznego punktu widzenia, metabolizm jest zbiorem reakcji chemicznych prowadzących do przemiany jednego związku w jego pochodną, którym towarzyszy uwolnienie lub wytworzenie energii. W przypadku cząsteczki mRNA, metabolizm obejmuje procesy takie jak transkrypcja, splicing (składanie), modyfikacje, transport wewnątrz komórkowy, a także proces translacji i degradacji mRNA. W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiłem się na badaniu translacji mRNA oraz degradacji metabolitów końca 5' mRNA. Dokładne zrozumienie i poznanie mechanizmów reakcji związanych z tymi dwoma procesami jest kluczowe do zaprojektowania potencjalnych leków bazujących na terapiach mRNA i jego pochodnych.

II.1.1 Biosynteza eukariotycznego mRNA oraz jego elementy strukturalne

Informacyjne RNA (*ang. Messenger RNA, mRNA*) jest jedną z najważniejszych biomolekuł niezbędnych do ekspresji genu. Podczas gdy DNA jest odpowiedzialne za przechowywanie informacji genetycznej, mRNA jest odpowiedzialne za jej przekazywanie w procesie ekspresji genu¹. Ekspresja genu polega na syntezie funkcjonalnego białka na podstawie informacji zakodowanej we fragmencie DNA – genie, na matrycy mRNA. U organizmów eukariotycznych proces ekspresji genu składa się z dwóch głównych procesów: transkrypcji – biosyntezy RNA na matrycy DNA oraz translacji – syntezy funkcjonalnego białka na podstawie matrycy mRNA. Transkrypcja i translacja są bardzo złożonymi procesami, których dokładany przebieg został opisany w kolejnych podrozdziałach.

II.1.2 Transkrypcja – synteza *pre*-mRNA

Transkrypcja jest pierwszym etapem ekspresji genu u organizmów eukariotycznych. Jest to proces zachodzący w jądrze komórkowym, polegający na skopiowaniu informacji genetycznej zakodowanej w DNA i przepisaniu jej na jednoniciowe prekursorowe matrycowe RNA (*pre*-mRNA). Transkrypcja składa się z trzech etapów – inicjacji, elongacji i terminacji². Transkrypcja rozpoczyna się od etapu inicjacji, w którym polimeraza *RNA II* (*ang. RNA polymersare II, RNAP II*) zależna od DNA wraz z dodatkowymi czynnikami transkrypcyjnymi wiąże dwuniciową nić DNA, tworząc hybrydę białko-DNA². Po związaniu dwuniciowego łańcucha DNA, *RNAP II* przesuwa się wzdłuż łańcucha poszukując sekwencji inicjującej proces transkrypcji. Sekwencja ta nosi nazwę promotora. Po rozpoznaniu sekwencji

promotora, *RNAP II* rozplata fragment dwuniciowej helisy DNA, po czym rozpoczyna syntezę RNA na matrycy DNA. Polimeraza RNA wydłuża nić RNA dołączając kolejne nukleotydy, tworząc komplementarną do matrycy nić RNA. Po etapie inicjacji następuje etap wydłużania łańcucha RNA, czyli etap elongacji, który rozpoczyna się po wytworzeniu pierwszego wiązania 3',5' fosfodiesterowego. Podczas elongacji, polimeraza *RNA II* przesuwa się po nici DNA w kierunku 3'-5' wydłużając nić *pre-mRNA* (od 5' do 3' końca). Po połączeniu około 20 nukleotydów, na końcu 5' wydłużającej się ciągle nici *pre-mRNA*, dosyntetyzowana jest struktura kapu. Synteza kapu odbywa się przy udziale trzech enzymów – fosfatazy, transferazy guanylnowej oraz N7-metylotransferazy. Polimeraza *RNA II* kończy syntezować *pre-mRNA* w momencie dołączenia do nici *pre-mRNA* sygnału poliadenylacji – sekwencji (AAUAAA), która występuje po sekwencji sygnału stop (rejonu bogatego w pary G-C). Po dodaniu do syntezowanej nici mRNA sekwencji sygnału poliadenylacji, mRNA zostaje odcięte od polimerazy przez odcinający/poliadenylujący kompleks białek, uwalniając mRNA^{2, 3}.

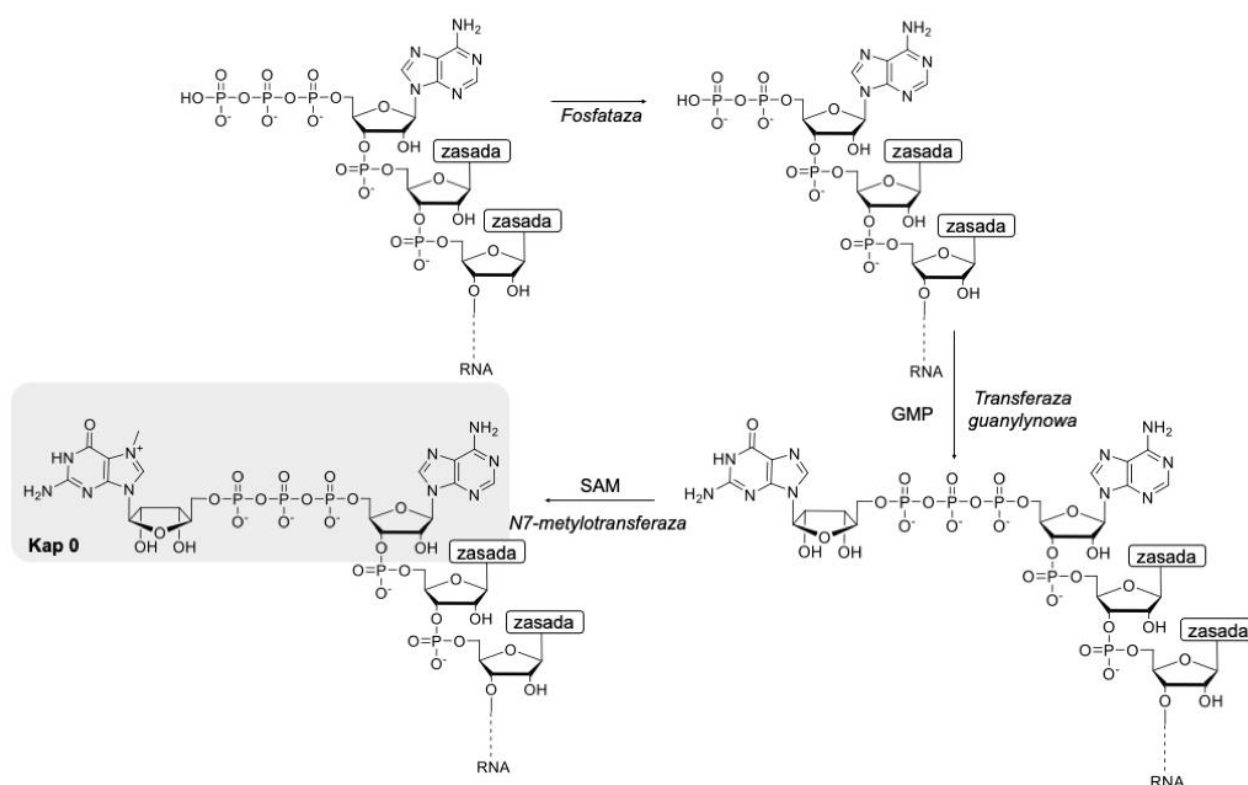
II.1.3 Ko-transkrypcyjne modyfikacje mRNA – dojrzewanie *pre-mRNA*

Podczas transkrypcji, syntezowane *pre-mRNA* zostaje poddane modyfikacjom prowadzącym do powstania funkcjonalnego mRNA, ulegającego translacji na późniejszym etapie ekspresji genu. Modyfikacje, którym zostaje poddane prekursorowe mRNA nazwano procesem dojrzewania mRNA. Wyróżnia się trzy główne etapy dojrzewania: kaping (ang. *capping*) mRNA, splicing oraz poliadenylacja mRNA⁴.

II.1.4 Biosynteza końca 5' mRNA – kapu oraz jego budowa

Pierwszą ko-transkrypcyjną modyfikacją niedojrzałego mRNA (*pre-mRNA*) jest dołączenie na końcu 5' struktury zwanej czapeczką lub kapem (spolszczona nazwa pochodząca od angielskiego słowa *cap*). Dołączenie struktury kapu na końcu 5' *pre-mRNA*, zwane kapingiem mRNA, jest jednym z najważniejszych etapów dojrzewania mRNA⁴. Struktura kapu składa się z pozytywnie naładowanej 7-metyloguanozyny (m^7G) połączonej z mRNA, niespotykanym w innych kwasach nukleinowych, wiązaniem 5',5'-trifosforanowym. Kap (m^7G) jest charakterystyczną strukturą występującą na końcu 5' eukariotycznych i niektórych wirusowych mRNA⁵. U organizmów eukariotycznych biosynteza kapu (m^7G) składa się z trzech etapów, katalizowanych przez trzy różne enzymy. W pierwszym etapie biosyntezy kapu, *pre-mRNA* zakończone na końcu 5' resztą trifosforanową, zostaje poddane reakcji hydrolizy, podczas której usunięta zostaje terminalna grupa fosforanowa (grupa fosforanowa γ). Produktem reakcji hydrolizy wiązania pirofosforanowego jest *pre-mRNA* zakończone na końcu 5' grupą difosforanową. Enzymem odpowiedzialnym za przeprowadzenie tej reakcji jest fosfataza. W kolejnym etapie biosyntezy kapu, transferaza guanylnowa dołącza do *pre-mRNA* 5'-

monofosforan guanozyny (GMP) łącząc go mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem⁶. Ostatnim etapem biosyntezy kapu jest metylacja *N7* pozycji guanozyny, za którą to odpowiedzialna jest *N7*-metylotransferaza przenosząca grupę metylową z *S*-adenozylometioiny (SAM) na azot w pozycji *N7* guanozyny⁵. Opisana, do tego momentu, biosynteza kapu opisuje syntezę kapu 0 o wzorze ogólnym m^7GpppN (Rysunek 1). Kap 0 występuje u niższych organizmów eukariotycznych wliczając w to drożdże⁷.

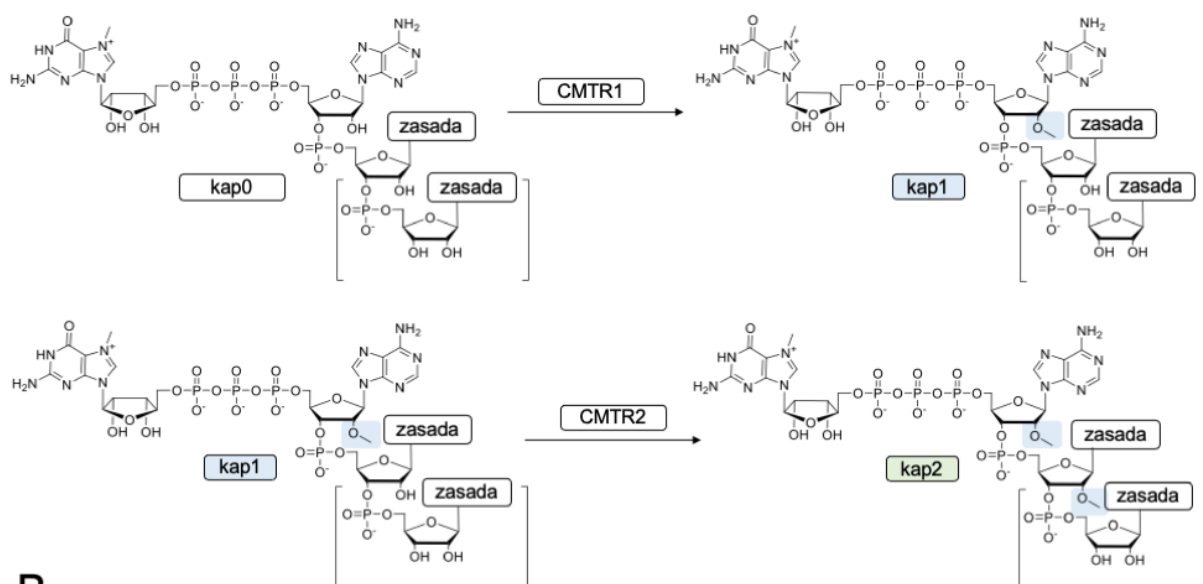


Rysunek 1. Biosynteza kapu 0 podczas dojrzewania *pre*-mRNA

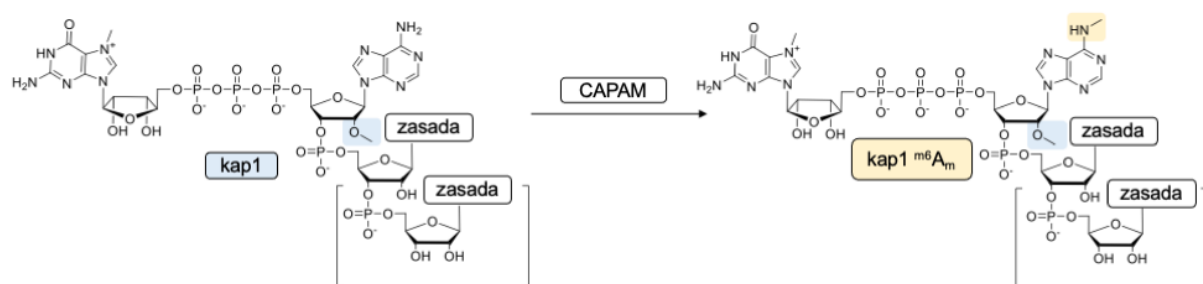
W komórkach eukariotycznych ssaczych, w tym ludzkich, kap 0, którym zakończone jest *pre*-mRNA, ulega dalszym modyfikacjom. Modyfikacjami tymi jest metylacja pierwszego transkrybowanego nukleotydu w pozycji 2'-OH rybozy. Reakcja metylacji pozycji 2'-OH, pierwszego transkrybowanego nukleotydu jest katalizowana przez enzym należący do rodziny metylotransferaz – 2'-O-metylotransferaza 1 (*ang. cap 2'-O-methyltransferase 1, CMTR1*)⁵. Kap, który posiada dodatkową metylację w pozycji 2'-OH pierwszego transkrybowanego nukleotydu nosi nazwę kap 1 – m^7GpppN_m ^{5, 8}. *Pre*-mRNA zakończone kapem 1 może ulegać dodatkowej metylacji – metylacji grupy 2'-OH drugiego transkrybowanego nukleotydu. Za metylację drugiego transkrybowanego nukleotydu odpowiada 2'-O-metylotransferaza 2 (*ang. cap 2'-O-methyltransferase 2, CMTR2*)⁹. Kap, o wzorze $m^7GpppN_mN_m$, w którym dwa kolejne nukleotydy posiadają metylację w obrębie pozycji 2'-OH rybozy, nazywany jest kapem 2 (Rysunek 2A)⁹. Oprócz modyfikacji (metylacji) występujących w obrębie rybozy pierwszego oraz drugiego transkrybowanego nukleotydu, w cząsteczce mRNA może występować

dotatkowa metylacja w obrębie zasady azotowej. Najczęściej występującą modyfikacją mRNA jest metylacja adenozy w pozycji N6 zasady azotowej – N6-metyloadenozyna (m^6A). Ta modyfikacja adenozy została po raz pierwszy odkryta w latach 70 XX wieku i ma ona wpływ na wiele etapów metabolizmu mRNA^{10, 11}. Badania transkryptomu wykazały, że podwójnie metylowana adenoza w pozycji N6 i 2'-OH (2'-O,N6-dimetyloadenozyna – m^6A_m) może występować również na końcu 5' mRNA jako pierwszy transkrybowany nukleotyd. Enzymem odpowiedzialnym za dodatkową metylację w pozycji N6 adenozy jest adenozy no kap-specyficzna N6 metylotransferaza (ang. Cap-specific adenosine N6 Methyltransferase, CAPAM) kodowana przez gen PCIF1¹² (Rysunek 2B). Dodatkowa metylacja adenozy w strukturze kapu zwiększa stabilność cząsteczki mRNA poprzez zwiększenie odporności na degradację przez enzymy dekapujące (Dcp1/Dcp2)¹³.

A



B



Rysunek 2. A. Enzymatyczna synteza kapu 1 oraz kapu 2 z udziałem 2'-O-metylotransferaz 1 oraz 2.B. Enzymatyczna synteza kapu 1 m^6A_m z udziałem CAPAM.

II.1.5 Biologiczna rola końca 5' mRNA – kapu

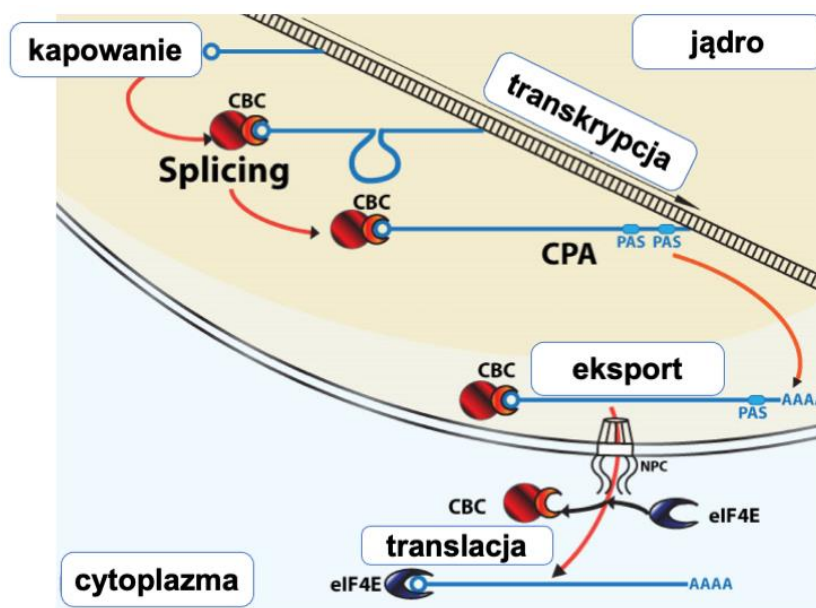
Koniec 5' eukariotycznego mRNA (kap) odgrywa kluczową rolę w metabolizmie całego mRNA. Bierze on udział w dojrzewaniu, transporcie oraz degradacji mRNA. Kap obecny na końcu 5' mRNA chroni mRNA przed przedwczesną degradacją przez 5'-egozonukleazy oraz bierze udział w procesie inicjacji biosyntezy białka (translacji mRNA). Obecność kapu na końcu 5' mRNA umożliwia białkom biorącym udział w translacji (kompleks białek eIF4F) rozpoznanie końca 5' mRNA i związanie go, co rozpoczyna złożony proces biosyntezy białka. Ostatnie badania pokazują, że kap, a dokładniej kap 1 – m⁷GpppN_mN, odgrywa kluczową rolę w rozróżnianiu komórkowego i obcego mRNA¹⁴.

II.1.6 Splicing mRNA oraz 3'-poliadenylacja mRNA

Splicing mRNA, czyli wycinanie fragmentów niekodujących z nici mRNA, jest drugim etapem dojrzewania *pre*-mRNA. U organizmów eukariotycznych geny nie są ciągłe, co oznacza, że syntezowana nić *pre*-mRNA składa się z fragmentów sekwencji kodujących dany gen – eksonów oraz sekwencji niekodujących – intronów². W czasie trwania transkrypcji, po dołączeniu kapu na końcu 5' syntezowanej nici *pre*-mRNA, introny są wycinane z nici mRNA. Splicing rozpoczyna się po związaniu końca 5' *pre*-mRNA (kapu) przez kompleks wiążący kap (*ang. cap-binding complex, CBC*). Po związaniu kapu, kompleks białek i RNA, zwany spliceosomem, rozpoczyna proces wycinania intronów z nici *pre*-mRNA oraz łączenia fragmentów kodujących gen – eksonów (*Rysunek 3*)^{2, 15}. Splicing determinuje ostateczną sekwencję nukleotydów w nici mRNA. Jest on również ostatnim etapem, na którym może dojść do kontroli sekwencji mRNA^{16, 17}.

Ostatnim etapem dojrzewania *pre*-mRNA jest 3'-poliadenylacja. Jest to proces, w którym na końcu 3' odłączonego od *RNAP II* mRNA, dołączana jest sekwencja składająca się z ciągu adenozyń (od 50 do 250)¹⁸. Etap 3'-poliadenylacji następuje po etapie terminacji procesu transkrypcji *pre*-mRNA. Terminacja transkrypcji następuje po rozpoznaniu przez *RNAP II* sekwencji sygnału poliadenylacji². Jest to sekwencja rozpoznawana również przez specyficzne endonukleazy, które odcinają prekursorowy transkrypt od polimerazy. Następnie polimeraza poliadenylowa (*ang. 3'-poly(A) polymerase, PAP*) dobudowuje na końcu 3' powstałego *pre*-mRNA ciąg adenozyń, zwany ogonem poliadenylowym (ogon poli(A))^{2, 17}. Ogon poli(A) stabilizuje cząsteczkę mRNA, chroni je przed przedwczesną degradacją, a także odgrywa kluczową rolę w translacji mRNA (*Rysunek 3*)¹⁹.

Dojrzałe mRNA zostaje przetransportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie ulega kolejnemu etapowi ekspresji genu – translacji.



Rysunek 3. Dojrzwanie mRNA w komórce eukariotycznej. Rysunek zaczerpnięto z pracy Jean-Clement Mars i wsp. ⁴ z drobnymi modyfikacjami.

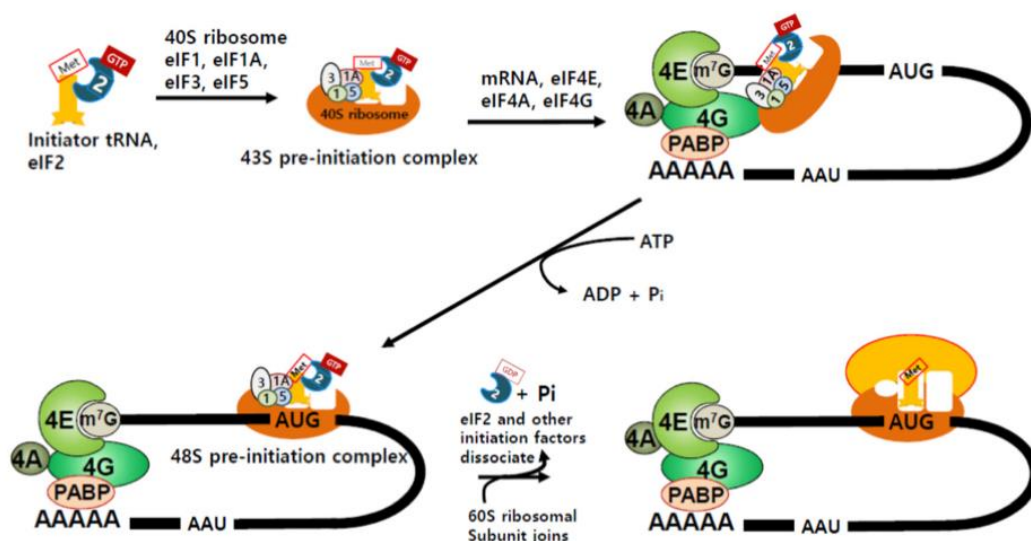
II.1.7 Translacja mRNA

Dojrzałe i w pełni funkcjonalne mRNA zostaje przetransportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie ulega translacji. Translacja mRNA jest kolejnym etapem ekspresji genu, w którym na matrycy mRNA syntezowane jest funkcjonalne białko. Proces translacji jest ściśle regulowany przez wiele białek, co umożliwia prawidłowe funkcjonowanie komórek. Niestety, pomimo wielu lat badań, proces regulacji translacji nie został jeszcze w pełni poznany²⁰. W niniejszym rozdziale przedstawię dotychczasową wiedzę na temat procesu translacji mRNA u organizmów eukariotycznych, ze szczególnym uwzględnieniem procesów istotnych z punktu widzenia badań własnych prezentowanych w niniejszej rozprawie.

II.1.8 Translacja zależna od kapu

U organizmów eukariotycznych występuje wiele mechanizmów inicjujących proces translacji mRNA. Jednakże inicjacja zależna od kapu (*ang. cap-dependent translation*) jest najczęściej występującym mechanizmem inicjacji translacji w komórce. Uważa się, że nawet 95% komórkowego mRNA ulega translacji zależnej od kapu²¹. W translacji zależnej od kapu etapem limitującym cały proces jest związanie struktury kapu przez eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E (*ang. eukaryotic translation initiation factor 4E*, eIF4E). Związanie struktury kapu przez białko eIF4E inicjuje proces tworzenia kompleksu eIF4F, składającego się z mRNA związanego z białkiem eIF4E, białka eIF4A (będącego helikazą RNA) oraz białka eIF4G, który stanowi rusztowanie do oddziaływania z innymi białkami wchodzącymi w skład maszyneryi translacyjnej. Wytworzony kompleks eIF4F oddziałuje dodatkowo z białkiem PABP (*ang. polyA binding protein*), które wiąże ogon poly(A). Białko PABP, po związaniu z ogonem poli(A), oddziałuje z białkiem eIF4G, co prowadzi do utworzenia pętli mRNA. Utworzony

kompleks *eIF4F* wraz z mRNA wiąże się, poprzez białko *eIF4G*, z kompleksem preinicjacyjnym 43S, w którego skład wchodzi białka *eIF3*, *eIF1A* i *eIF2*, uczestniczącego w wiązaniu tRNA_{Met} (incjatorowe tRNA odpowiadające z transport metioniny). Dodatkowo w skład kompleksu 43S wchodzi mała podjednostka rybosomu 40S. Kompleks 43S wraz z kompleksem *eIF4F* tworzy kompleks 48S, który skanuje mRNA w poszukiwaniu kodonu start – kodonu AUG rozpoczynającego proces translacji. Po znalezieniu, przez kompleks 48S, kodonu start, rekrutowana jest do niego duża podjednostka rybosomu 60S, co skutkuje powstaniem kompleksu inicjacyjnego 80S. Podczas tworzenia się kompleksu inicjacyjnego 80S, aktywowana jest GTPaza (enzymy hydrolizujący GTP), w wyniku czego GTP hydrolizowane jest do GDP, co skutkuje oddysocjowaniem z kompleksu 48S białka *eIF2*, dzięki czemu możliwe jest zrekrutowanie podjednostki rybosomu 60S (Rysunek 4)^{4, 20, 22, 23, 19}.



Rysunek 4. Schemat przedstawiający inicjację translacji według mechanizmu zależnego od kapu. Rysunek zaczerpnięty z pracy Hyun-Jung Kim²⁴.

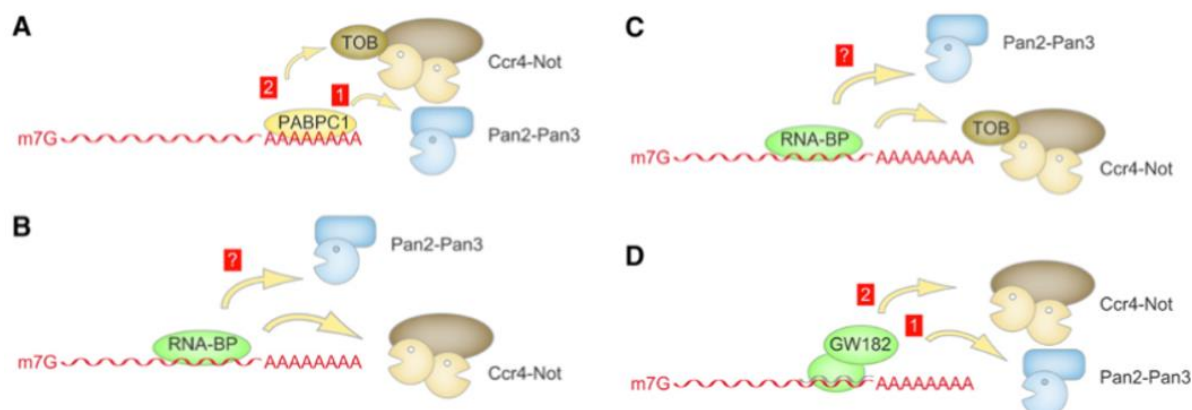
Po wytworzeniu kompleksu inicjacyjnego 80S rozpoczyna się proces elongacji, czyli wydłużania łańcucha polipeptydowego. Translacja jest kontynuowana do momentu rozpoznania przez kompleks 80S kodonu stop. Po zakończeniu takiej rundy translacji, mRNA może zostać użyte do kolejnej rundy translacji lub zostaje skierowane na ścieżkę degradacji, która kończy etap ekspresji genu.

II.1.9 Degradacja mRNA

Degradacja mRNA jest jednym z bardzo ważnych procesów regulujących ekspresję genów. Etap ten determinuje czas półtrwania mRNA w komórce, który wynosi od kilku minut do ponad 24 h. To, w którym momencie mRNA zostanie skierowane na drogę degradacji ma wpływ na pulę mRNA dostępną dla maszyneryi translacyjnej, co w rezultacie determinuje ilość wyprodukowanego białka podczas ekspresji genu^{25, 26}.

II.1.9.1 Ścieżki degradacji mRNA

W komórkach eukariotycznych degradacja mRNA może przebiegać według dwóch alternatywnych szlaków: degradacji w kierunku $5' \rightarrow 3'$ lub $3' \rightarrow 5'$ ²⁷. W obu przypadkach degradacja mRNA rozpoczyna się od skrócenia ogona poli(A) transkryptu, co często jest etapem limitującym proces degradacji mRNA²⁸. Za degradację ogona poli(A) odpowiadają dwa odrębne kompleksy enzymatyczne: Ccr4-Not, którego rdzeniem katalitycznym jest kompleks Ccr4-Caf1²⁹ lub kompleks Pan, będący heterodimerem, w którym funkcję katalityczną pełni kompleks Pan2-Pan3^{30, 31}. Oba kompleksy Ccr4-Not i Pan2-Pan3 są rekrutowane przez dwa mechanizmy. Pierwszy mechanizm obejmuje oddziaływanie tych kompleksów z białkiem PABP (*ang. PolyA Binding Protein*). W drugim mechanizmie kompleksy degradujące ogon poli(A) są rekrutowane przez białka wiążące się do specyficznych sekwencji mRNA (*ang. RNA binding proteins*) lub przez maszynę odpowiedzialną za wyciszanie genu, w której udział bierze mikroRNA (Rysunek 5)³².



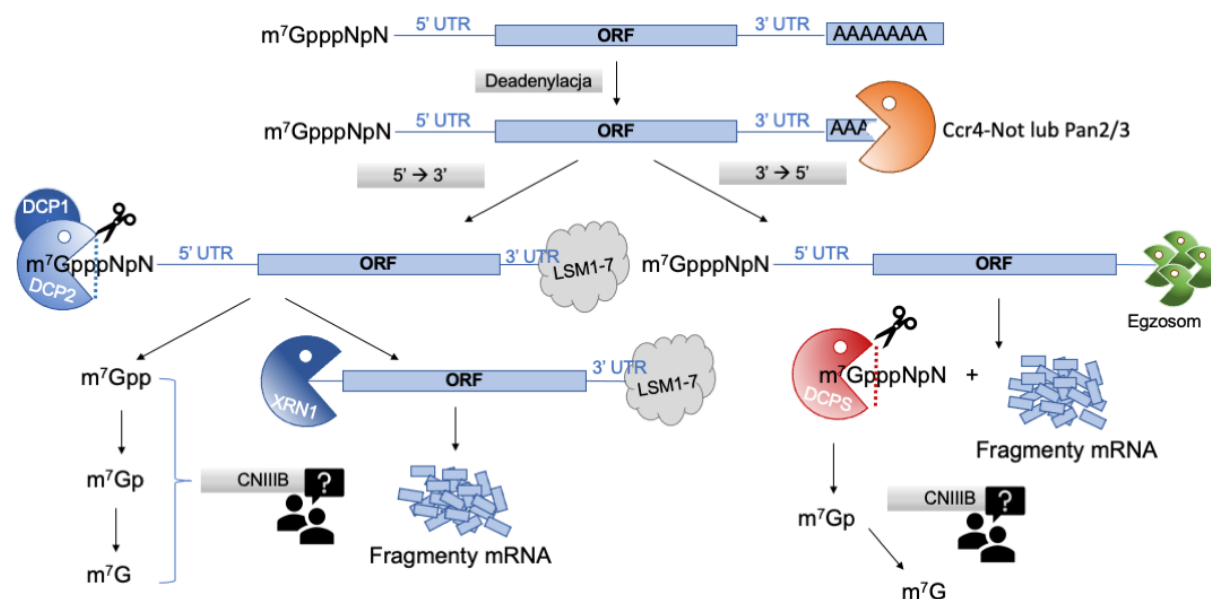
Rysunek 5. Mechanizm rekrutowania kompleksów Ccr4-Not oraz Pan2-Pan3 odpowiedzialnych za degradację ogona poli(A).

Po skróceniu ogona poli(A), do około 10 nukleotydów²⁸, mRNA kierowane jest na dalszy etap degradacji, od końca $5'$ lub $3'$ (Rysunek 6). W degradacji od końca $5'$ ($5' \rightarrow 3'$), pierwszym etapem jest związanie kompleksu Lsm1-7 z końcem $3'$ mRNA. Wytworzenie kompleksu Lsm1-7 z mRNA inicjuje etap usuwania struktury kapu (dekapiingu) przez kompleks enzymatyczny Dcp1-Dcp2 (Dcp1/2). Kompleks Dcp1/2 przecina mostek $5',5'$ -trifosforanowy w pozycji α - β , odcinając od struktury kapu m^7GDP . Produktem reakcji enzymatycznej katalizowanej przez kompleks Dcp1/2 jest m^7GDP oraz transkrypt mRNA zakończony grupą $5'$ -monofosforanową³³. Wolny od struktury kapu transkrypt mRNA zostaje zdegradowany przez $5'$ -egozukleazę Xrn-1, która hydrolizuje mRNA na pojedyncze $5'$ -monofosforany nukleozydów²⁸.

Drugą możliwą ścieżką degradacji mRNA jest degradacja od $3'$ końca ($3' \rightarrow 5'$). W tej ścieżce degradacyjnej, mRNA po usunięciu ogona poli(A), jest degradowane od $3'$ końca przez egzozom – kompleks enzymatyczny składający się z 10-12 podjednostek. Egzozom degraduje

mRNA od końca 3'. Egzosom degraduje mRNA do momentu natrafienia na strukturę kapu na końcu 5' RNA, który ze względu na swoją unikalną strukturę (mostek 5',5'-trifosforanowy) nie jest substratem dla egzosomu. Struktury kapu uwolnione podczas degradacji mRNA 3'→5', są usuwane przez enzym DcpS (*ang. Decapping Scavenger*), który przecina mostek 5',5'-trifosforanowy pomiędzy grupami fosforanowymi w pozycji β-γ, czego produktem jest m⁷GMP³⁴.

W obu ścieżkach degradacji mRNA kap znajdujący się na końcu 5' mRNA jest usuwany poprzez przecięcie mostka 5',5'-trifosforanowego. W zależności od ścieżki degradacji mRNA, w wyniku usuwania struktury kapu powstaje m⁷GDP lub m⁷GMP. Podczas gdy od dawna znane są ścieżki degradacji pozostałych metabolitów mRNA, to dalsze etapy degradacji metabolitów kapu nie zostały w literaturze opisane. W 2014 roku odkryto enzym mogący brać udział w końcowym etapie degradacji metabolitów mRNA. Jest to cytozolowa 5'-nukleotyda IIIIB (cN-IIIIB), która wykazuje wysokie powinowactwo do pochodnej 7-metyloguanozyny – m⁷GMP i nieco niższe powinowactwo do m⁷GDP. Te wstępne badania sugerują, że enzym ten może mieć udział w obu ścieżkach degradacyjnych mRNA^{35, 36}, ale obserwacje te nie zostały jeszcze potwierdzone w badaniach na układach komórkowych.



Rysunek 6. Schemat ogólny przedstawiający ścieżki degradacyjne mRNA wraz z potencjalną rolą enzymu cN-IIIIB w degradacji metabolitów końca 5' mRNA. Rysunek przygotowany na podstawie pracy Graneau i wsp.³⁷

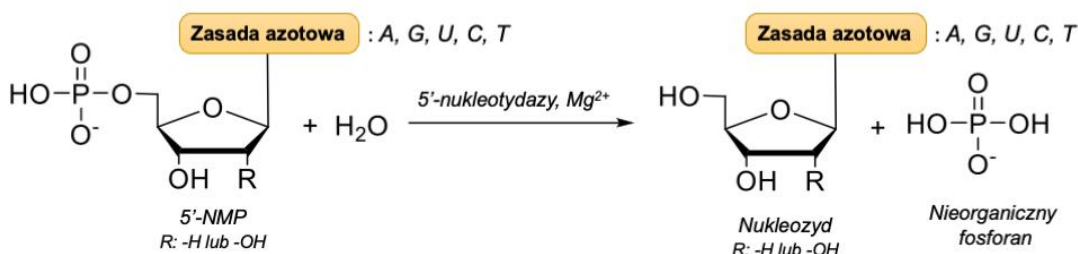
II.2 Białka zaangażowane w metabolizm nukleotydów

Nukleotydy są bardzo istotnymi biomolekułami z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania komórek. Są one budulcem kwasów nukleinowych: DNA oraz RNA i zostają uwolnione w procesie ich degradacji. Wolne, niezwiązane nukleotydy są zaangażowane we

wszystkie główne szlaki metaboliczne w komórkach. Biorą one udział w purynergicznym transferze energii oraz działają jako cząsteczki sygnałowe. 5'-Trifosforan guanozyny (GTP) odgrywa kluczową rolę podczas syntezy białek. Nukleotydy wykorzystywane są jako półprodukty podczas syntezy węglowodanów i lipidów, jak również są ważnymi składnikami koenzymów. Liczba funkcji jakie pełnią nukleotydy w komórce, sprawia, że ich poziom jest starannie i nieustannie kontrolowany przez wiele enzymów. Zaburzenie metabolizmu nukleotydów może być niebezpieczne dla komórek i może prowadzić do ich śmierci³⁸.

II.2.1 Enzymy odpowiedzialne za metabolizm nukleotydów – 5' nukleotydyazy

Grupą enzymów odpowiedzialnych za regulację poziomu nukleotydów wewnątrz oraz zewnątrz komórkowych są 5'-nukleotydyazy. Aktywność 5'-nukleotydz została po raz pierwszy zidentyfikowana w mięśniach serca oraz mięśniach szkieletowych niemal 90 lat temu³⁹. 5'-Nukleotydyazy to grupa enzymów, która jest odpowiedzialna za katalizowanie reakcji defosforylacji niecyklicznych 5'-monofosforanów (2'-deoksy)rybonukleozydów (5'-NMP) do odpowiedniego (2'-deoksy)rybonukleozydu oraz nieorganicznego fosforanu ([Rysunek 7](#)). Główną rolą 5'-nukleotydz jest kontrolowanie stężenia nukleotydów otrzymanych wewnątrz komórki *de novo* lub w wyniku szlaku rezerwowego (*ang. Salvage pathway*)⁴⁰.



Rysunek 7. Schemat reakcji katalizowanej przez 5'-nukleotydyazy.

Dotychczas w ludzkich komórkach zidentyfikowano osiem enzymów należących do rodziny 5'-nukleotydz. Enzymy te są klasyfikowane ze względu na swoją specyficzność substratową, lokalizację w komórce oraz ich aktywność względem 5'-monofosforanów nukleozydów⁴⁰. Najwięcej nukleotydz zlokalizowanych jest wewnątrz komórki – w cytoplazmie – są to cytozolowe 5'-nukleotydyazy. 5'-nukleotydyazy zlokalizowano również w mitochondrium (mitochondrialna 5'-nukleotydyaza) oraz po zewnętrznej stronie błony komórkowej (ekto 5'-nukleotydyaza). Zaburzenie aktywności 5'-nukleotydz zostało skorelowane z wieloma chorobami, które są spowodowane poprzez zakłócenie gospodarki nukleozydów i nukleotydów w komórkach⁴¹⁻⁴³.

5'-nukleotydyazy, oprócz powinowactwa do naturalnie występujących nukleozydów, wykazują również aktywność względem modyfikowanych nukleotydów stosowanych w wielu

terapiach przeciwwirusowych oraz przeciwnowotworowych⁴⁴. Z powodu ważnych funkcji jakie 5'-nukleotydazy pełnią w komórkach stały się one interesującym obiektem badawczym, a niektóre z nich także celem terapeutycznym w leczeniu chorób nowotworowych⁴¹.

II.2.1.1 Ekto- i mitochondrialna 5'-nukleotydaza

Zakotwiczona po zewnętrznej stronie błony komórkowej, za pomocą glikozylofosfatydylinozytolowej (GPI) kotwicy, ekto 5'-nukleotydaza jest zaangażowana w usuwanie zewnątrzkomórkowych nukleotydów. Ekto 5'-nukleotydaza występuje również w formie rozpuszczalnej w surowicy. Obie formy enzymu wykazują największe powinowactwo względem 5'-monofosforanu adenozy (AMP), katalizując tym samym hydrolizę AMP do adenozy i nieorganicznego fosforanu. Poprzez kontrolowanie stężenia AMP, na zewnątrz komórki, ekto 5'-nukleotydaza jest odpowiedzialna za modulowanie transdukcji sygnałowej purynergicznego transferu energii⁴⁰. Wzmocniona aktywność ekto 5'-nukleotydy jest również kluczowa w przewlekłych chorobach zapalnych. Ekto 5'-nukleotydaza zwiększa stężenie adenozy, która jest odpowiedzialna za tłumienie stanu zapalnego⁴⁵. Jednakże w przypadku chorób nowotworowych, nadaktywność i zwiększone stężenie ekto 5'-nukleotydy w mikro środowisku guza przeciwdziała naturalnej obronie organizmu przed nowotworem. Z tego powodu ekto 5'-nukleotydaza stała się jednym z celów terapeutycznych skierowanych przeciwko chorobom nowotworowym, w których wykorzystuje się pochodne nukleotydów jako terapie⁴⁶.

Mitochondrialna 5'-nukleotydaza (*mdN*), znajdująca się wewnątrz mitochondrium, jest *de facto* 5'-(3')-deoksynukleotydażą, ponieważ jej substratami są 5'-(3')-monofosforany 2'-deoksynukleotydów. Mitochondrialna 5'-nukleotydaza jest homologiem enzymu występującego w cytoplazmie – cytozolowej 5'-deoksynukleotydy. Oba enzymy są kodowane przez ten sam gen znajdujący się na 17 chromosomie. Sekwencja obu enzymów jest identyczna w 52%. Mitochondrialna 5'-nukleotydaza wykazuje preferencje względem 5'-(3')-monofosforanów tymidyny oraz urydyny (dTTP oraz dUMP). Rolą tego enzymu jest regulowanie poziomu dTTP wewnątrz mitochondrium. Regulowanie poziomu odbywa się poprzez defosforylację 5'-monofosforanów 2'-deoksynukleotydów (dTTP). Mitochondrialna 5'-nukleotydaza swoją aktywnością zapobiega akumulacji dTTP wewnątrz mitochondrium. Jest to niezwykle istotne z punktu widzenia procesu replikacji mitochondrialnego DNA. Nagromadzenie dTTP, spowodowane nieprawidłowym funkcjonowaniem *mdN*, może powodować defekty w replikacji DNA, co jest powiązane z autosomalną chorobą recesywną, zwaną encefalomiopatią⁴⁷⁻⁴⁹.

II.2.1.2 Cytozolowe 5'-nukleotydy

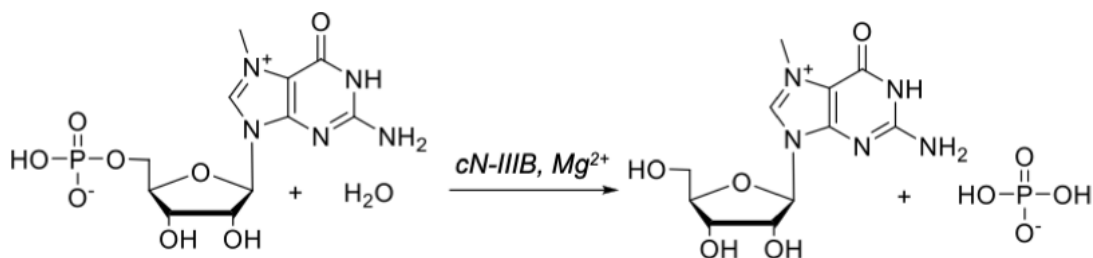
Największą pulę enzymów należących do rodziny 5'-nukleotydaz zidentyfikowano w cytoplazmie. Do tej pory w cytoplazmie znaleziono sześciu przedstawicieli tej grupy enzymów.

Są to 5'-deokynukleotyda (5'-cdN), będąca homologiem wcześniej wspomnianego enzymu *mdN*, oraz 5'-nukleotydy IA, IB, II, IIIA, IIIB (cN-IA, cN-IB, cN-II, cN-IIIA oraz cN-IIIB). Cytozolowe 5'-nukleotydy przynależą do superrodziny enzymów (*ang. superfamily enzymes*) *haloacid dehalogenase (HAD)*, posiadających dwie domeny: *core domaine* – zawierającej zmodyfikowany *Rossmann fold* oraz *CAP domaine*. Obie domeny, wspólnie, tworzą miejsce katalityczne enzymów. Aktywność katalityczna 5'-nukleotydaz zależy od obecności dwuwartościowych jonów metali – w przypadku 5'-nukleotydaz jonami tymi są jony Mg^{2+} . Dwuwartościowe jony magnezu koordynują wiązanie reszty fosforanowej nukleotydów wewnątrz centrum katalitycznego⁴⁷.

Cytozolowe 5'-nukleotydy są zróżnicowane ze względu na swoją specyficzność substratową. Specyficzność substratowa 5'-nukleotydaz determinuje ich miejsce występowania. 5'-nukleotyda IA, zwana również AMP-specyficzną nukleotydazą, pełni kluczową rolę w regulacji poziomu purynowych nukleotydów i występuje w komórkach mięśni szkieletowych, gdzie jest odpowiedzialna za wytwarzania adenozyne z AMP w warunkach niedokrwienia⁴⁷. cN-IA oprócz swojej roli katalitycznej, może pełnić rolę autoantygeny w chorobach mięśniowych, które mają powiązanie z nowotworem piersi⁴². Ciekawym przedstawicielem 5'-nukleotydaz jest enzym cN-II. Enzym cN-II wykazuje wysokie powinowactwo do IMP (5'-monofosforan inozyny). Oprócz aktywności hydrolitycznej, enzym ten wykazuje również aktywność fosfotransferazy. W odpowiednich warunkach fizjologicznych, cN-II, przenosi resztę fosforanową z purynowych nukleotydów na inozynę lub guanozynę. Aktywność fosfotransferazy została wykorzystana w chemii medycznej do aktywowania przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych terapeutyków pochodzenia nukleozydowego⁵⁰. Jednakże cN-II może również deaktywować analogi nukleotydów powszechnie stosowane jako terapeutyki⁴⁴.

II.2.2 Cytozolowa 5'-nukleotyda IIIB i jej potencjalny udział w metabolizmie pochodnych końca 5' mRNA

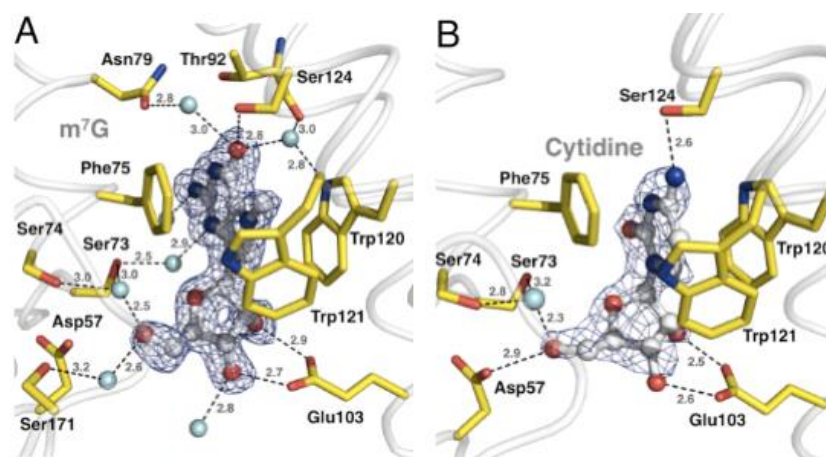
W komórkach eukariotycznych, oprócz naturalnych nukleotydów, występują również modyfikowane nukleotydy. Jednym z przykładów modyfikowanych nukleotydów jest 5'-monofosforan 7-metyloguanozyne (m^7GMP). m^7GMP tak jak naturalne nukleotydy, musi ulegać metabolizmowi w celu zachowania homeostazy w komórce. Do nie dawna, nie było wiadomo jaki enzym odpowiada za degradację tego związku w komórce. Sytuacja ta zmieniła się na początku 2013 roku, kiedy to w pracy Buschmann *i wsp.* przedstawiono po raz pierwszy cytozolowa 5'-nukleotyda IIIB (cN-IIIB). Enzym cN-IIIB wykazuje powinowactwo do m^7GMP i katalizuje reakcję jego defosforylacji do 7-metyloguanozyne i nieorganicznego fosforanu (Rysunek 8)⁵¹.



Rysunek 8. Reakcja enzymatycznej defosforylacji m^7GMP przez enzymy *cN-IIIB*

Enzym *cN-IIIB* jest homologiem innej cytozolowej 5'-nukleotydazy – 5'-nukleotydazy IIIA (*cN-IIIA*). Identyeczność i podobieństwo sekwencji obu enzymów wynosi odpowiednio 59% i 80%. Co ciekawe, pomimo podobieństwa w sekwencji enzymów *cN-IIIA* i *IIIB*, ich specyficzność substratowa znacząco się różni³⁵. Enzym *cN-IIIA* katalizuje reakcje defosforylacji głównie nukleotydów pirymidynowych. Enzym ten został zlokalizowany w komórkach czerwonych krwinek (erytrocytach). Brak lub obniżona aktywność enzymu *cN-IIIA* w komórkach czerwonych krwinek skutkuje nagromadzeniem się nukleotydów pirymidynowych, co zostało powiązane z hemolityczną anemią⁵². W odróżnieniu od *cN-IIIA*, enzym *cN-IIIB* katalizuje reakcje defosforylacji zarówno purynowych (GMP i AMP) jak i pirymidynowych (UMP i CMP) nukleotydów. Unikalność enzymu *cN-IIIB* względem pozostałych 5'-nukleotydaz polega na tym, że enzym ten katalizuje również reakcję defosforylacji modyfikowanego nukleotydu m^7GMP , do którego wykazuje najwyższe powinowactwo ($K_m = 7.8 \mu M$). Preferencje substratowe enzymu *cN-IIIB* zostały wytłumaczone w 2014 roku na podstawie struktury krystalograficznej enzymu *cN-IIIB* wraz z produktem reakcji enzymatycznej katalizowanej przez ten enzym – 7-metyloguanozyną. Pierwsza struktura krystalograficzna enzymu *cN-IIIB* pochodziła z enzymu wyizolowanego z *Drosophila melanogaster* (muszki owocówki) (Rysunek 9)³⁵. W kieszeni wiążącej enzymu *cN-IIIB* z *Drosophila* znajduje się pięć aminokwasów bezpośrednio oddziałujących z 7-metyloguanozyną. Są to kwas glutaminowy (*Glu103*), seryna (*Ser 124*) oraz trzy aminokwasy aromatyczne: fenyloalanina (*Phe 75*) i dwa tryptofany (*Trp120* i *Trp121*). Kwas glutaminowy i seryna są akceptorami i donorami wiązań wodorowych. Aminokwasy te oddziałują z grupami hydroksylowymi w pozycji 2' i 3' rybozy oraz z tlenem w pozycji 6 guaniny. Preferencje enzymu *cN-IIIB* do dodatnio naładowanej 7-metyloguanozyny wyjaśnia sposób ułożenia pierścieni aminokwasów aromatycznych w kieszeni wiążącej. Pierścienie aromatyczne fenyloalaniny 75 oraz tryptofanu 120 są ustawione równolegle względem siebie w odległości 3.5Å tworząc typowy motyw oddziaływania warstwowego, tzw. motyw kanapki (*ang. π - π stacking, sandwich motif*). Układ pierścieni aromatycznych fenyloalaniny 75 i tryptofanu 120 oddziałuje warstwowo z układem π elektronowym 7-metyloguaniny, stabilizując ją w kieszeni wiążącej enzymu *cN-IIIB*. Układ π elektronowy tych aminokwasów oddziałuje dodatkowo z kationem w pozycji N7 pierścienia zasady azotowej poprzez kulombowskie oddziaływanie warstwowe (*ang. cation- π*

stacking coulomb interaction). Tryptofan 121, który leży w płaszczyźnie prostopadłej do fenyloalaniny 75 i tryptofanu 120, dodatkowo stabilizuje pierścień 7-metyloguaniny poprzez oddziaływanie warstwowe (*ang. T-Shaped Edge-to-face*) z grupą metylową³⁵ (Rysunek 9A). Układ pierścieni aminokwasów aromatycznych w kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB jest charakterystyczny dla białek rozpoznających strukturę 7-metyloguanozyny – podobny układ jest widoczny w strukturach krystalograficznych białka eIF4E oraz enzymu DcpS³⁶.

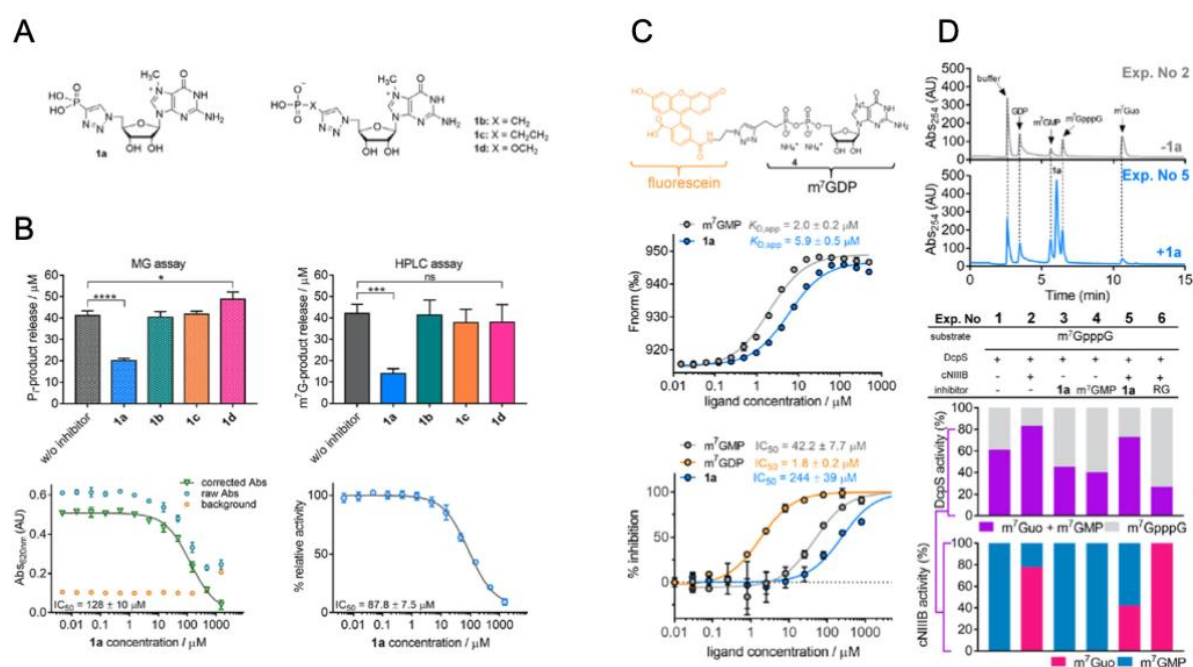


Rysunek 9. Kieszeń wiążąca enzymu cN-IIIB na podstawie struktury krystalograficznej uzyskanej dla enzymu pochodzącego z muszki owocówki. **A.** Kieszeń wiążąca enzymu cN-IIIB wraz z m⁷G (produkt reakcji enzymatycznej). **B.** Kieszeń wiążąca enzymu cN-IIIB wraz z cytozyną (produkt reakcji enzymatycznej). Rysunek zaczerpnięto z pracy Monecke i wsp.³⁵

II.2.2.1 Pierwsze nukleotydowe inhibitory enzymu cN-IIIB

Wysokie powinowactwo enzymu cN-IIIB do m⁷GMP sugeruje, że enzym ten może odgrywać bardzo ważną rolę w końcowym etapie metabolizmu końca 5' mRNA, zapobiegając tym samym akumulacji m⁷GMP w komórce. Co więcej, enzym cN-IIIB, tak jak pozostałe enzymy z rodziny 5'-nukleotydaz, może brać udział w degradacji pochodnych nukleotydów o znaczeniu terapeutycznym, głównie pochodnych 7-metyloguanzyny. Jednakże do chwili obecnej, rola tego enzymu nie została do końca wyjaśniona. Poza klasycznymi metodami biologii molekularnej i genetyki, w przybliżeniu roli enzymu cN-IIIB pomocne mogą być narzędzia molekularne takie jak specyficzne inhibitory czy próbniki. Do roku 2017, w literaturze brak było jakichkolwiek doniesień dotyczących syntezy inhibitorów enzymu cN-IIIB. Pierwsze inhibitory enzymu cN-IIIB zostały opracowane i opublikowane w roku 2017 przez autora niniejszej rozprawy⁵³. W pracy tej jako szkielet do syntezy inhibitorów enzymu cN-IIIB, wykorzystano m⁷GMP. Wzorując się na strukturze 7-metyloguanozyny, zapewniającej wysokie powinowactwo do enzymu cN-IIIB oraz selektywność względem pozostałych 5'-nukleotydaz, zaprojektowano i zsyntezowano cztery analogi m⁷GMP. Zaprojektowane związki posiadały modyfikacje w obrębie reszty fosforanowej w pozycji 5' rybozy. Celem wprowadzonych modyfikacji było uodpornienie tych związków na degradację enzymatyczną katalizowaną przez enzym cN-IIIB. Analogi m⁷GMP otrzymano przy użyciu reakcji azydkowo-alkinowej

cykloaddycji katalizowanej jonami miedzi (I) (ang. *Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition- CuAAC*) (Rysunek 10A). Otrzymane związki zbadano pod kątem ich stabilności chemicznej, enzymatycznej oraz selektywności względem białek rozpoznających strukturę kapu – białko eIF4E oraz DcpS. Wykazano, że związki, w których grupę fosforanową zastąpiono grupą 1,2,3-triazolofosfonianową były odporne na degradację enzymatyczną. Natomiast związek, do którego wprowadzono ugrupowanie 1,2,3-triazolofosforanowe okazał się być dobrym substratem enzymu cN-IIIB. Ponadto, związek ten był szybciej degradowany przez enzym cN-IIIB niż naturalny substrat tego enzymu – m⁷GMP. Jeden spośród otrzymanych związków okazał się być mikromolarnym inhibitorem enzymu cN-IIIB (Rysunek 10B). Ponadto, związek ten wykazywał selektywność względem cNIII-B, ponieważ nie oddziaływał efektywnie z białkami eIF4E i DcpS. Wstępne badania przedstawione w tej pracy pokazały również, że w warunkach *in vitro* enzym cN-IIIB degraduje metabolity końca 5' mRNA powstałe w wyniku działania na strukturę kapu enzymem DcpS (Rysunek 10C,D)⁵³.



Rysunek 10. Pierwsze inhibitory enzymu cN-IIIB – synteza i właściwości. **A**. Struktury zsyntezowanych inhibitorów enzymu cN-IIIB; **B**. Badanie własności inhibitorowych triazolowych inhibitorów enzymu cN-IIIB; **C,D**. Badanie selektywności pierwszego inhibitora enzymu cN-IIIB względem białka eIF4E i DCPS. Rysunek zaczerpnięty z pracy Kozarski i wsp.⁵³

II.3 Inne białka zaangażowane w metabolizm końca 5' mRNA jako cele terapeutyczne

5'-nukleotydaza IIIB, którego rola została szczegółowo opisana w powyższym rozdziale, bierze udział w jednym z ostatnich etapów metabolizmu końca 5' mRNA. W komórkach eukariotycznych istnieją enzymy katalizujące reakcje degradacji bardziej złożonych struktur nukleotydowych niż 5'-monofosforany nukleozydów. Tymi enzymami są enzymy DcpS (ang.

Scavenger decapping enzyme) oraz kompleks enzymów Dcp1-Dcp2 (Dcp1/2). Oba enzymy odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genu. Dodatkowo, aktywność enzymu DcpS i kompleksu Dcp1/2 została skorelowana z rdzeniowym zanikiem mięśni (*ang. spinal muscular atrophy, SMA*)^{54, 55}. Z tego powodu oba enzymy znalazły się w centrum zainteresowań wielu grup badawczych.

Metabolizm końca 5' mRNA obejmuje zarówno proces jego degradacji przez enzymy dekapujące, jak i proces translacji. Proces translacji mRNA jest regulowany przez kompleks białek oddziałujących ze strukturą kapu (*ang. cap-binding complex, CBC*). Jednym z białek należących do tego kompleksu, jest eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E (eIF4E). Badania dotyczące białka eIF4E wykazały, że białko to jest nadeksprymowane w komórkach nowotworowych, w których proces translacji jest ciągle na wysokim poziomie⁵⁶. Fakt ten spowodował, że białko eIF4E stało się celem terapeutycznym w leczeniu chorób nowotworowych.

II.4 Synteza naturalnych i modyfikowanych nukleotydów oraz kwasów nukleinowych

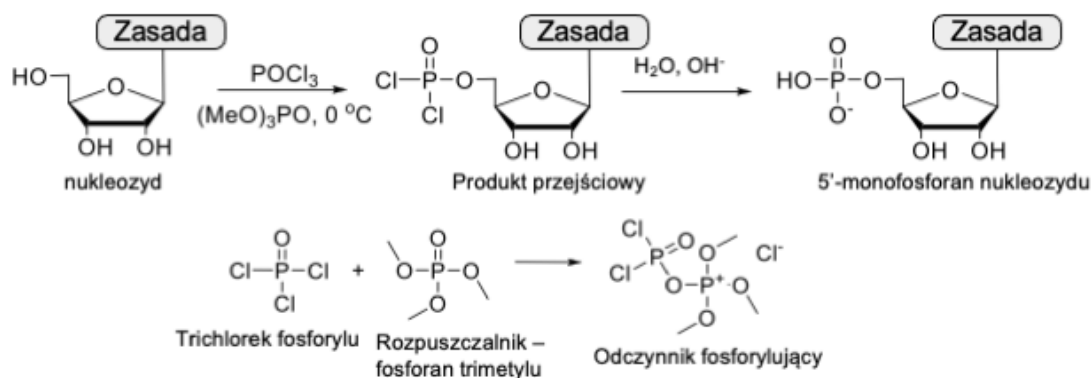
Nukleotydy (mono-, di- oraz trifosforany nukleozydów), zaraz po nukleozydach, są najbardziej podstawowymi jednostkami budującymi złożone biopolimery kwasów nukleinowych. Pełnią one również liczne funkcje niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek. Z tego powodu nukleotydy i ich pochodne stały się interesującym obiektem badawczym – zaczęto rozwijać wiele metod syntetycznych mających na celu syntezę naturalnych i modyfikowanych nukleotydów. W poniższych rozdziałach opiszę powszechnie stosowane metody syntezy chemicznej nukleotydów, zarówno naturalnych jak i modyfikowanych, oraz kwasów nukleinowych.

II.4.1 Synteza mono-, di- oraz trifosforanów nukleozydów

II.4.1.1 Reakcje fosforylacji nukleozydów

Jedną z najbardziej powszechnych reakcji stosowanych w chemii nukleotydów jest reakcja 5'-fosforylacji nukleozydów. Celem tej reakcji jest otrzymanie 5'-monofosforanu nukleozydu. Do tego celu najczęściej stosowaną reakcją jest reakcja fosforylacji Yoshikawy⁵⁷. Reakcja fosforylacji Yoshikawy jest szybką i wydajną reakcją, w której jako odczynnik fosforylujący wykorzystuje się trichlorek fosforylu (POCl_3) oraz fosforan trimetylu ($((\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO})$) jako rozpuszczalnik. W reakcji fosforylacji Yoshikawy fosforan trimetylu, w pierwszej kolejności reaguje z trichlorkiem fosforylu, tworząc kompleks, który następnie reaguje z grupą hydroksylową w pozycji 5' rybozy. Zatłoczenie steryczne spowodowane dużym rozmiarem powstałego kompleksu, utrudnia przyłączenie trichloru fosforylu w pozycjach 2' i 3'⁵⁷ i warunkuje jej regioselektywność. Spowolnienie reakcji poprzez obniżenie temperatury do 0 °C

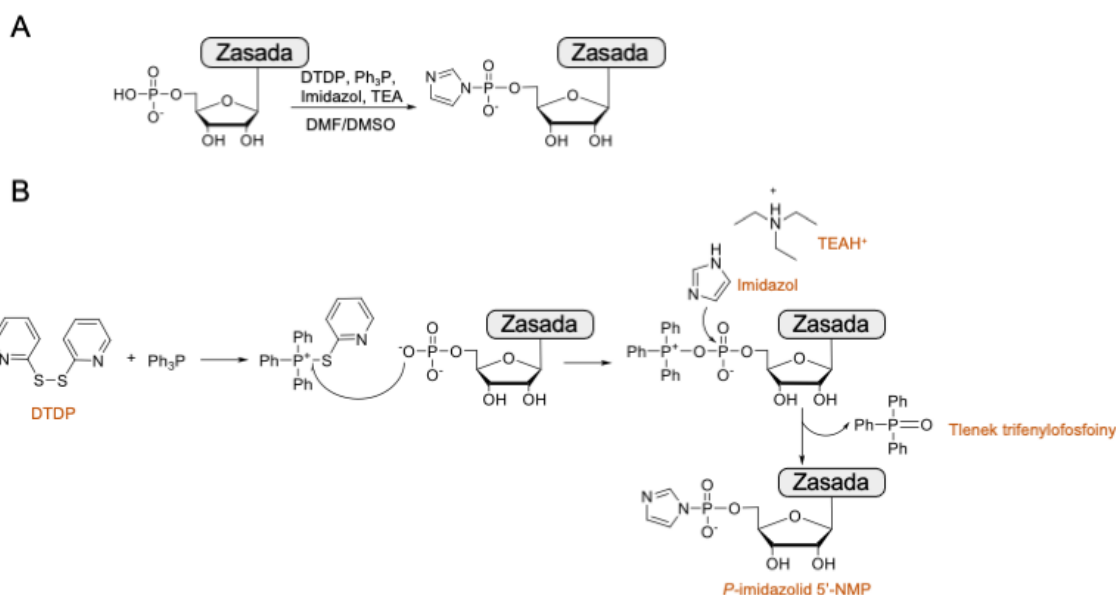
dodatkowo zwiększa regioselektywność tej reakcji⁵⁷. Mechanizm reakcji fosforylacji Yoshikawy przedstawia Rysunek 11.



Rysunek 11. Schemat reakcji fosforylacji nukleozydów z wyróżnionym etapem tworzenia odczynnika fosforylującego. Otrzymywanie 5'-monofosforanów nukleozydów przy użyciu reakcji Yoshikawy⁵⁷

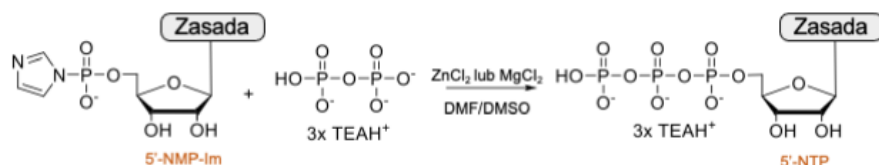
II.4.1.2 Reakcje wydłużania łańcucha fosforanowego

W wyniku reakcji fosforylacji otrzymywany jest 5'-monofosforan nukleozydu (5'-NMP), który można poddać dalszym reakcjom, mającym na celu wydłużenie łańcucha fosforanowego poprzez dołączenie kolejnych grup fosforanowych. Kolejne grupy fosforanowe mogą zostać przyłączone do nukleotydu m.in. za pomocą reakcji sprzęgania, w której biorą udział pochodna NMP z aktywowaną grupą fosforanową, oraz nieorganiczny fosforan lub jego pochodne. Często, grupę fosforanową NMP aktywuje się w reakcji Mukaiyamy-Hashimoto do 5'-*P*-imidazolidu (5'-NMP-Im). W reakcji Mukaiyamy-Hashimoto resztą fosforanową nukleozydu aktywowany jest imidazolem w obecności trifenylofosfiny (Ph_3P), trietyloaminy (TEA) oraz ditiopirydyny (DTDP)(Rysunek 12)⁵⁸. Oprócz imidazolu stosowane są również inne grupy aktywujące grupę fosforanową. Przykładem takich grup aktywujących jest morfolina tworząca morfolinofosforan czy grupa amidowa tworząca amidofosforan⁵⁹⁻⁶¹. Alternatywnym podejściem syntezy 5'-oligofosforanów nukleozydów jest zastosowanie chemii fosforu (III), po raz pierwszy zaproponowanej przez J. Ludwiga i F. Ecksteina⁶². W tym podejściu aktywowany triester fosforynu nukleozydu ulega reakcji z pirofosforanem tworząc cykliczny trifosforan nukleozydu, który następnie ulega utlenieniu i hydrolizie tworząc 5'-NTP⁶².



Rysunek 12. Aktywacja 5'-NMP za pomocą imidazolu. **A.** Schemat syntezy *P*-imidolizdu 5'-NMP; **B.** Mechanizm reakcji imidazolowania 5'-NMP przy użyciu reakcji Mukaiyamy-Hashimoto⁵⁸.

Aktywowany *P*-imidazolid NMP można następnie poddać reakcji sprzęgania z nieorganicznym fosforanem lub pirofosforanem w obecności dwuwartościowych jonów metali Mg^{2+} lub Zn^{2+} tworząc 5'-difosforan lub 5'-trifosforan nukleozydu (Rysunek 13)⁶³.



Rysunek 13. Schemat syntezy 5'-trifosforanów nukleozydów przy użyciu aktywowanego *P*-imidazolidem 5'-NMP.

W analogiczny sposób, stosując reakcję sprzęgania oraz *P*-imidazolową pochodną nukleotydu, możliwe jest połączenie dwóch nukleotydów mostkiem 5',5'-fosforanowym (Rysunek 14)⁸.

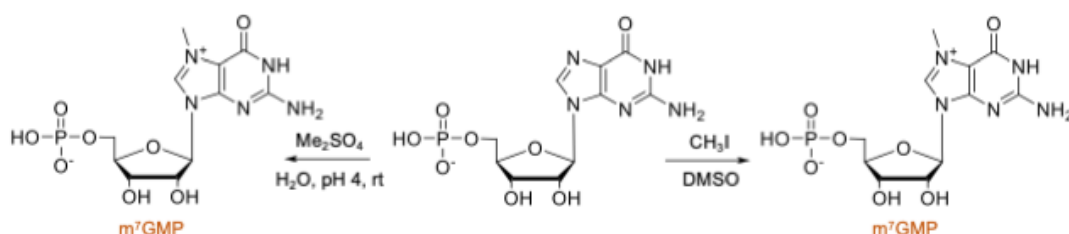


Rysunek 14. Schemat syntezy kap 0. Reakcja sprzęgania m^7GDP z imidazolową pochodną pApG w obecności dwuwartościowych jonów metali⁸.

II.4.2 Synteza 7-metyloguanozyny oraz 5'-fosforanów 7-metyloguanozyny – reakcja metylacji

Jedną z cech charakterystycznych końca 5' mRNA jest dodatnio naładowana 7-metyloguanozyna. Jest ona wprowadzana do mRNA na etapie syntezy i dojrzewania poprzez

enzymatyczną metylację guanozyny na końcu 5' mRNA ([Rozdział II.1.4.](#)). 7-Metyloguanozynę można otrzymać również w warunkach laboratoryjnych, za pomocą reakcji chemicznych, stosując odpowiednie odczynniki alkilujące. Powszechnie stosowanymi odczynnikami alkilującymi są jodek metylu czy siarczan dimetylu, które w reakcji substytucji nukleofilowej bezpośrednio alkilują nukleofilowy atom azotu w pozycji *N7* guanozyny. W zależności od zastosowanego odczynnika alkilującego, reakcję metylacji prowadzi się w różnych warunkach. W przypadku reakcji z udziałem jodku metylu, reakcję metylacji prowadzi się zazwyczaj w DMSO. Natomiast w przypadku reakcji z udziałem siarczanu dimetylu, medium reakcyjnym jest buforowany roztwór wodny. Ze względu na nukleofilowy charakter atomu azotu w pozycji *N7*, reakcja alkilacji przebiega w sposób chemoselektywny, pod warunkiem, że zachowane są odpowiednie warunki kwasowo-zasadowe ([Rysunek 15](#)). Zbyt długie prowadzenie reakcji metylacji może jednak powodować powstanie produktów ubocznych, którymi najczęściej są związki posiadające dodatkową grupę metylową w obrębie reszty fosforanowej.

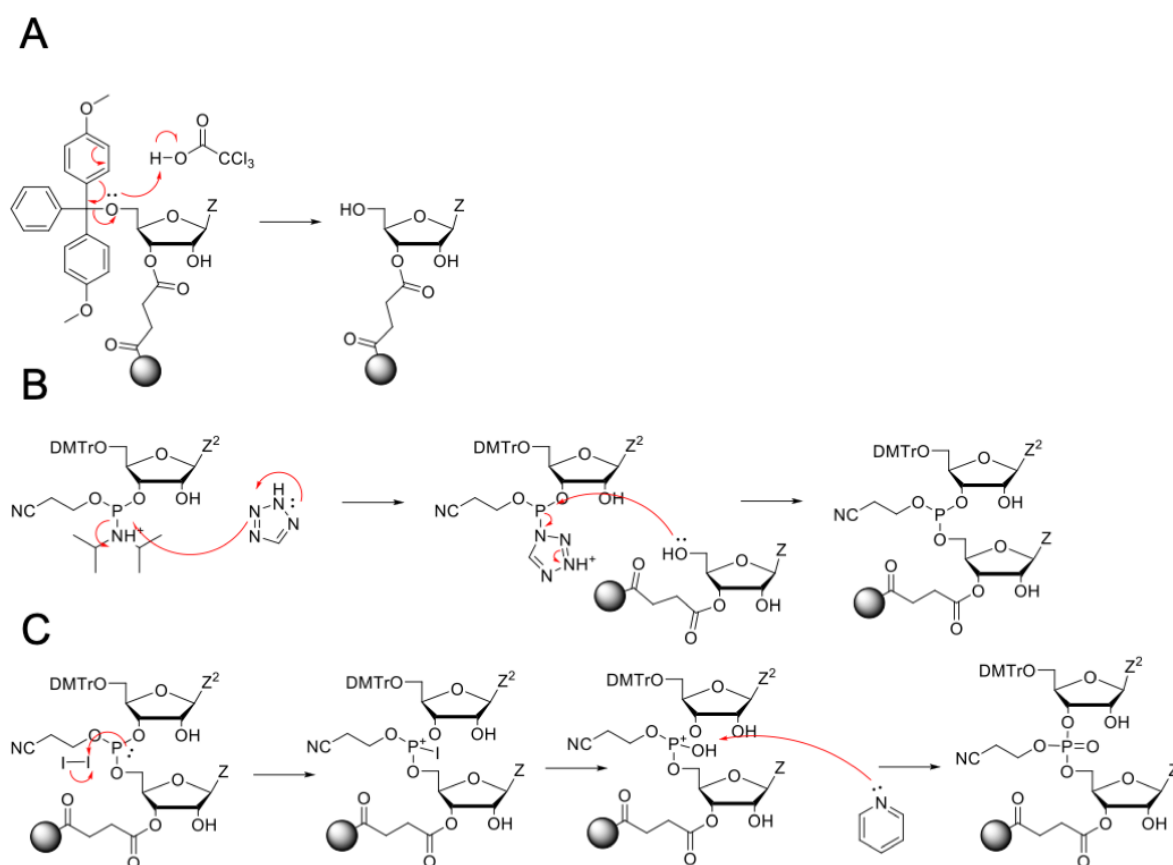


Rysunek 15. Schemat reakcji *N*⁷-metylacji GMP dwiema niezależnymi metodami - z wykorzystaniem Me₂SO₄ lub CH₃I.

II.4.3 Synteza oligonukleotydów za pomocą syntezy na podłożu stałym

Oligonukleotydy, czyli nukleotydy połączone wiązaniem 3',5'- fosfodiestrowym są wykorzystywane zarówno w biologii molekularnej, jako narzędzia do badania procesów związanych z kwasami nukleinowymi, jak i w medycynie, gdzie są podstawą wielu terapii, m.in. jako oligonukleotydy antysensowne. Metody syntezy oligonukleotydów eksplorowane są od lat 50. XX wieku, kiedy to grupa profesora A.R. Todda zaprezentowała syntezę dinukleotydu połączonego wiązaniem 3',5'-fosfodiestrowym przy użyciu 3'-H-fosfonianów nukleozydów⁶⁴. Praca ta stała się inspiracją dla innych grup badawczych, które rozwijały różne metody syntezy oligonukleotydów, a także opracowywały udoskonalenia technologiczne, które ostatecznie umożliwiły pełną automatyzację syntezy. Obecnie najczęściej stosowaną, a zarazem najszybszą metodą służącą do syntezy oligonukleotydów, jest metoda na podłożu stałym, w której blokami budulcowymi są amidofosforyny. Powszechnie stosowanym podłożem stałym stosowanym podczas syntezy oligonukleotydów, do którego przyłączony jest pierwszy nukleozyd w syntezowanej sekwencji, jest między innymi szkło o kontrolowanej porowatości (*ang. controlled-pore glass, CPG*) lub odpowiednio spreparowany polistyren (PS).

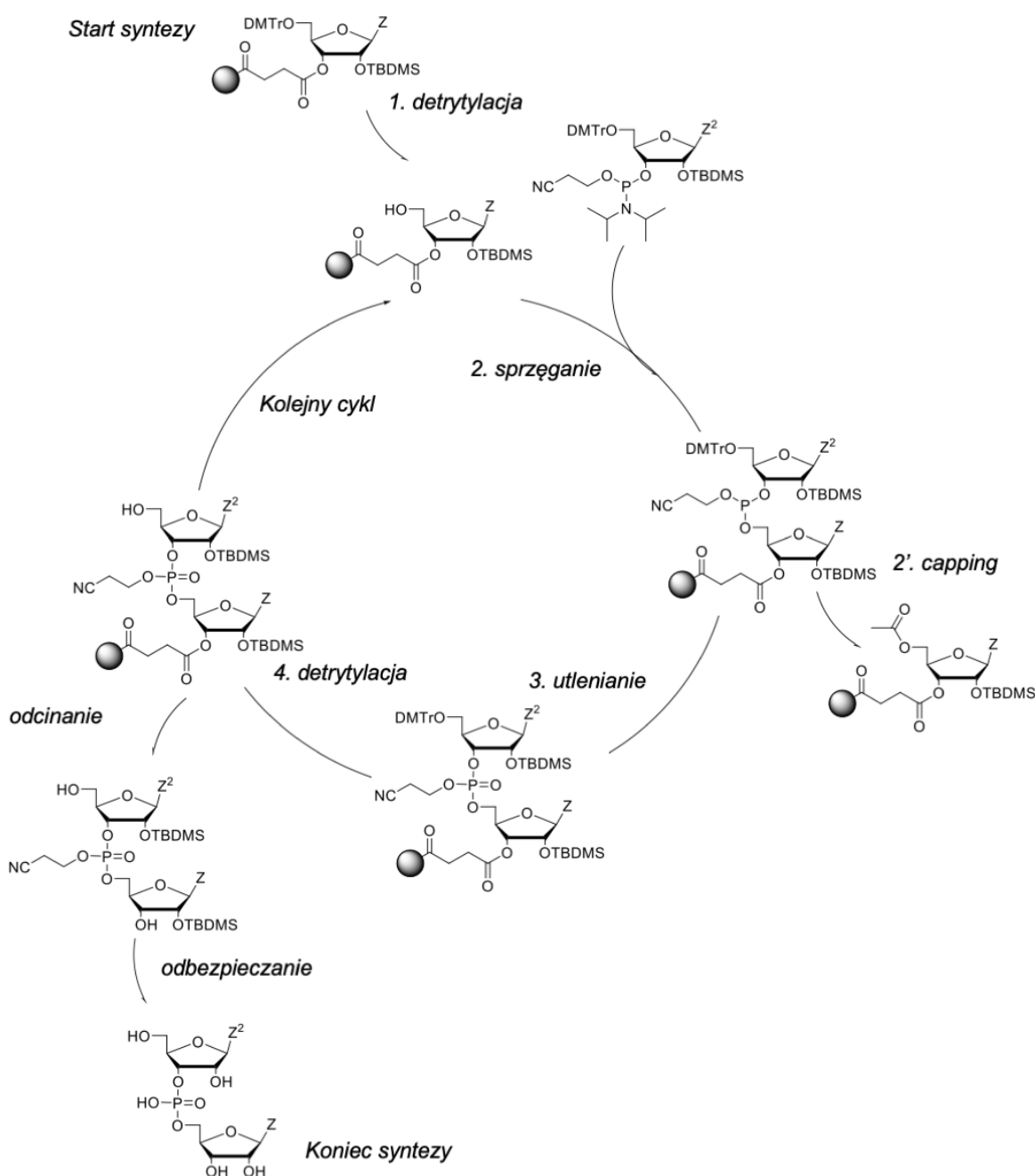
Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym składa się z czteroetapowego cyklu. W pierwszym etapie cyklu, z nukleozydu przytwierdzonego do podłoża, usuwa się grupę zabezpieczającą – grupę dimetylotrytylową (DMTr) z pozycji 5'-OH. Grupę DMTr zwykle usuwa się za pomocą kwasu dichloro- lub trichlorooctowego w DCM ([Rysunek 16A](#)). Po odbezpieczeniu pozycji 5'-OH, w drugim etapie cyklu – zwanym sprzęganiem, do nukleozydu przyłączonego do podłoża przyłącza się, w reakcji sprzęgania, drugi (licząc od końca 3') nukleozyd w sekwencji. Reakcja sprzęgania zachodzi pomiędzy 3'-amidofosforem nukleozydu, a odbezpieczoną grupą 5'-OH, w obecności tak zwanego aktywatora. Aktywatorem w reakcji sprzęgania jest roztwór 5-(Benzyltio)-1*H*-tetrazolu, który inicjuje reakcję sprzęgania poprzez aktywowanie amidofosforynu ([Rysunek 16B](#)). Po reakcji sprzęgania, kolejnym etapem w cyklu jest etap utleniania, w którym fosfor (III) utleniany jest do P(V). Utleniaczem w tym etapie syntezy jest roztwór jodu w pirydynie ([Rysunek 16C](#)).



Rysunek 16. Mechanizmy etapów syntezy oligonukleotydów za pomocą syntezy na podłożu stałym **A.** Detritylacja; **B.** Sprzęganie; **C.** Utlenianie

Ostatnim etapem w cyklu jest usunięcie grupy DMTr z pozycji 5' przyłączonego nukleozydu. W jednym cyklu przyłączany jest zawsze jeden nukleozyd z sekwencji. W przypadku przyłączenia kolejnych nukleotydów, cykl się powtarza aż do uzyskania sekwencji zaprojektowanego oligonukleotydu. W przypadku syntezy sekwencji zawierającej więcej niż dwa nukleotydy, wymagany jest dodatkowy etap w cyklu. Etapem tym jest tak zwany *capping*.

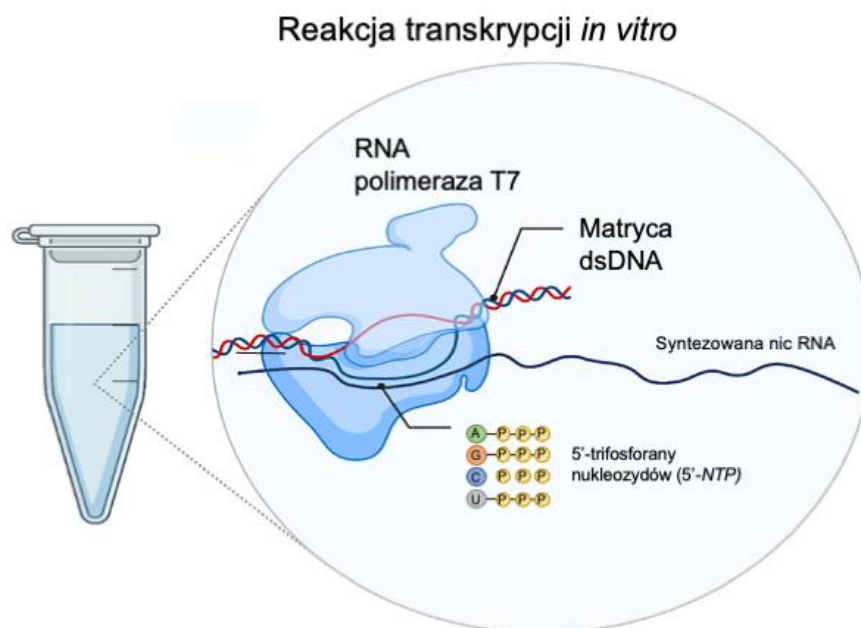
Podczas *cappingu* nieprzereagowane nukleozydy posiadające odbezpieczoną grupę 5'-hydroksylową, zabezpiecza się ponownie przy użyciu grupy acetylowej. Nukleozyd zabezpieczony grupą acetylową nie będzie reagować w kolejnym cyklu sprzęgania. Dzięki etapowi *cappingu* ogranicza się powstawania mutacji – delecji, w syntezowanej sekwencji oligonukleotydu. Po przyłączeniu ostatniego nukleozydu, otrzymany oligonukleotyd odcina się od podłoża w warunkach zasadowych, np. przy użyciu roztworu amoniaku i metyloaminy. Po odcięciu od podłoża, ostatnim etapem syntezy oligonukleotydu jest usunięcie pozostałych grup zabezpieczających, które nie zostały usunięte podczas syntezy (Rysunek 17)⁶⁵.



Rysunek 17. Synteza oligonukleotydów za pomocą syntezy na podłożu stałym. Czteroetapowy główny cykl syntezy uwzględniający etap detritylacji, sprzęgnięcia, utleniania oraz dodatkowe etapy: , odcinanie oraz odbezpieczania ostatecznego oligonukleotydu.

II.4.4 Synteza mRNA – reakcja transkrypcji *in vitro*

Najszybszą metodą syntezy krótkich fragmentów RNA jest synteza na podłożu stałym, opisana w poprzednim rozdziale. Za pomocą syntezy na podłożu stałym możliwa jest synteza RNA o długości maksymalnie 200 nukleotydów. Przeważne jednak, metody syntezy RNA na podłożu stałym wykorzystuje się do syntezy krótkich, ok. 20 nukleotydowych, fragmentów RNA⁶⁶. Do syntezy dłuższych, w pełni funkcjonalnych fragmentów RNA, używa się reakcji transkrypcji *in vitro*. Pierwsze doniesienia dotyczące syntezy RNA za pomocą reakcji transkrypcji *in vitro* (ang. *in vitro* transcription, *IVT*) pochodzą z lat 90., XX wieku^{67, 68}. Reakcja transkrypcji *in vitro* jest reakcją enzymatyczną, w której do syntezy RNA wykorzystywany jest enzym – polimeraza RNA. Powszechnie stosowanymi polimerazami w reakcji *IVT* są polimerazy RNA z fagów SP6 oraz T7⁶⁸. Polimeraza RNA (ang. *RNA polymerase*, *RNAP*), podczas reakcji *IVT*, syntezuje nić RNA na liniowej matrycy DNA. Synteza RNA, podczas reakcji *IVT*, przebiega w sposób analogiczny jak to się dzieje w komórkach. Polimeraza RNA, po rozpoznaniu sekwencji promotora na nici DNA, wiąże się z dwuniciowym DNA (ang. *double-stranded DNA*, *dsDNA*), po czym rozplata dwuniciową nić DNA w celu przeprowadzenia syntezy RNA. RNA jest syntezowane przez RNAP w kierunku 5'-3'. Substratami polimerazy RNA są 5'-trifosforany nukleozydów (5'-NTP). Polimeraza przesuając się po nici DNA, włącza do syntezowanej nici RNA 5'-NTP zgodnie z kolejnością wynikającą z matrycy DNA ([Rysunek 18](#)). Polimeraza łączy ze sobą kolejne 5'-NTP wiązaniem 3'-5' fosfodiesterowym, odłączając od 5'-NTP pirofosforan($P_2O_7^{4-}$). Zakończenie reakcji *IVT* może nastąpić, gdy polimeraza RNA natrafi na specjalną sekwencję nukleotydów na matrycy dsDNA – sekwencję stop lub po dotarciu do końca zlinearyzowanej sekwencji matrycy dsDNA (tzw. transkrypcja *run-off*)⁶⁹. W obu przypadkach polimeraza RNA uwalnia dsDNA oraz syntezowaną nić RNA. Etap zakończenia reakcji transkrypcji *in vitro* zwany jest terminacją transkrypcji⁶⁸.



Rysunek 18. Schematyczny rysunek przebiegu reakcji *in vitro* transkrypcji. Rysunek zaczerpnięto z pracy Nance K.D. i wsp.⁷⁰

W zależności od warunków reakcji oraz długości matrycy dsDNA, reakcja *in vitro* transkrypcji trwa od kilku do nawet kilkunastu godzin. Po zakończeniu reakcji *in vitro* transkrypcji, z mieszaniny reakcyjnej usuwa się matrycę dsDNA. Do tego celu najczęściej wykorzystuje się odpowiedni enzym, który selektywnie degraduje podwójną nić DNA. Enzymem tym może być deoksyrybonukleaza I (*Dnase I*)⁷¹. Otrzymane RNA izoluje się z mieszaniny reakcyjnej za pomocą technik chromatograficznych lub poprzez selektywne wytrącanie RNA.

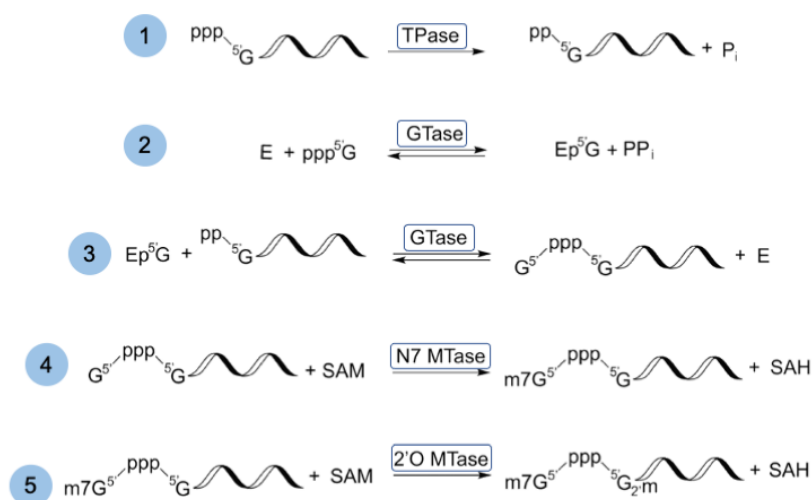
Na etapie reakcji *in vitro* transkrypcji, możliwe jest ko-transkrypcyjne wprowadzanie modyfikacji w obrębie RNA. W tym celu najczęściej stosuje się modyfikowane nukleotydy, które są wbudowywane do nici RNA za pomocą polimerazy. Celem wprowadzanych modyfikacji jest zmiana właściwości fizycznych i biologicznych otrzymanych konstruktów RNA. Takie podejście zastosowano między innymi podczas syntezy szczepionek RNA, w których naturalne nukleotydy zastąpiono modyfikowanymi^{70, 72}.

II.5 Synteza kapowanego RNA – mRNA

Eukariotyczne mRNA zakończone jest na swoim końcu 5' kapem. W komórkach kap dołączany jest do syntezowanej nici RNA, podczas procesu dojrzewania mRNA ([Rozdział II.1.4.](#)). Podczas syntezy mRNA w warunkach *in vitro*, kap może być dołączany do nici mRNA na dwa sposoby post- oraz ko-transkrypcyjnie^{73, 74}.

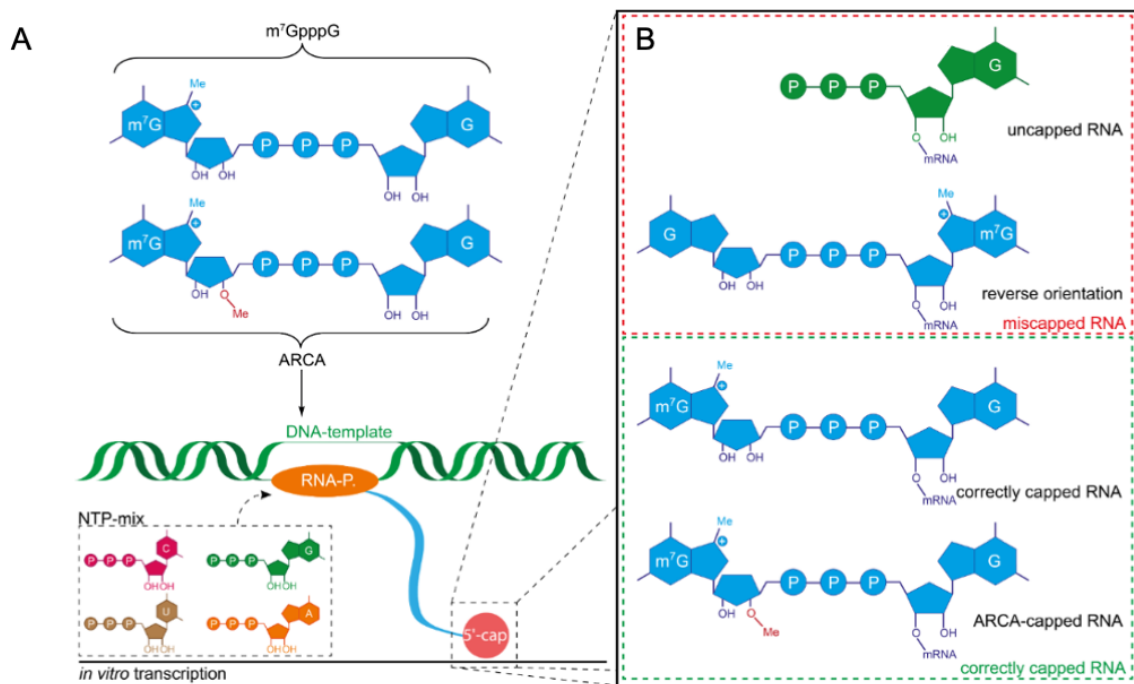
W pierwszej metodzie, post-transkrypcyjnej, kap wprowadzany jest do nici mRNA po etapie transkrypcji *in vitro*. W metodzie tej kap wprowadzany jest na końcu 5' mRNA enzymatycznie.

Enzymami biorącymi udział w kapingu mRNA są RNA 5'-fosfataza (RTase) – usuwająca terminalną grupę fosforanową, RNA guanylotransferaza (GTase), dołączająca do końca 5' mRNA GMP (tworząc strukturę GpppN-RNA) oraz metylotransferazy (MTase) – wprowadzające grupy metylowe w pozycji N7 terminalnej guaniny oraz w pozycji 2'-OH pierwszego transkrybowanego nukleotydu (m^7GpppN_m -RNA)⁷³⁻⁷⁵. Post-transkrypcyjne wprowadzenie struktury kapu 1 na końcu 5' mRNA, możliwe jest również przy użyciu enzymu kapującego pochodzącego z wirusa krowianki (*ang. Vaccinia Capping Enzyme, VCE*). Enzym VCE jest polipeptydem zbudowanym z dwóch podjednostek (D1 i D12) posiadającym wszystkie trzy, wymienione wcześniej, aktywności – guanylotransferazy, N7 i 2'-OH metylotransferazy^{76, 77}. Obecnie, wykorzystanie enzymu VCE jest jedną z najczęściej stosowanych metod służącą do post-transkrypcyjnego kapingu mRNA.



Rysunek 19. Post-transkrypcyjny kaping mRNA otrzymanego w warunkach *in vitro*. Rysunek zaczerpnięto z pracy Anand Ramanathan i wsp.⁷³

W drugiej metodzie, ko-transkrypcyjnej, kap wprowadzany jest do mRNA podczas reakcji transkrypcji *in vitro* (Rysunek 20A). W tej metodzie analog kapu, o wzorze m^7GpppN , gdzie N to dowolny nukleotyd determinowany przez sekwencję matrycy DNA (najczęściej guanozyna), dodawany jest bezpośrednio do mieszaniny reakcyjnej reakcji *IVT* wraz z pozostałymi komponentami. Podczas reakcji *IVT*, kap rozpoznawany jest przez polimerazę RNA, która rozpoczyna syntezę nici RNA od kapu, dołączając do niego kolejne nukleotydy sekwencji.

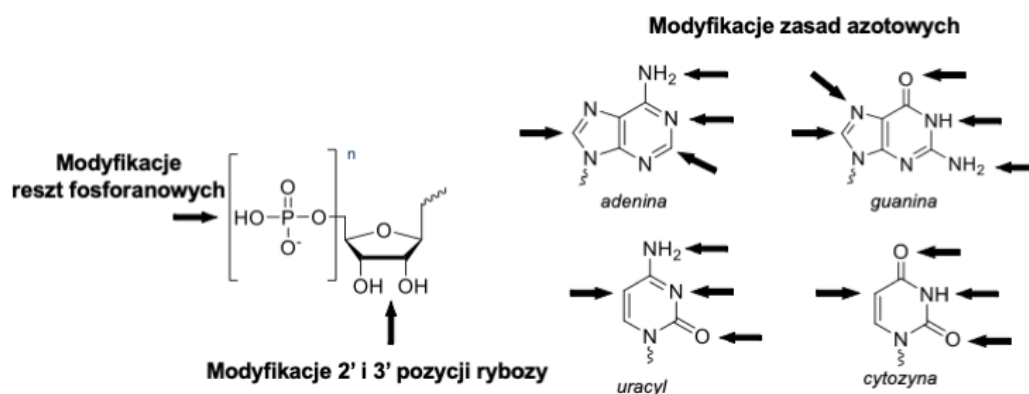


Rysunek 20. Metoda kapiu mRNA - ko-transkrypcyjnie. **A.** Schemat pokazujący ko-transkrypcyjną syntezę kapowanego mRNA; **B.** Odwrotna inkorporacji kapu do nici mRNA za pomocą polimerazy RNA. Analog kapu typu ARCA – poprawna orientacja kapu w strukturze mRNA. Rysunek zaczerpnięty z pracy Fabian Muttach i wsp.⁷⁴

Obie metody kapiu mRNA, post- i ko-transkrypcyjna, mają wady i zalety. Metody post-transkrypcyjnego wprowadzania kapu wykorzystuje się głównie do syntezy mRNA zakończonego naturalnie występującym kapem 0 lub 1. Stosując odpowiednio modyfikowane kofaktory metylotransferaz, możliwe jest modyfikowanie kapu post-transkrypcyjnie⁷⁸. Jednak metoda ta nie jest powszechnie stosowana oraz umożliwia jedynie wprowadzanie modyfikacji w obrębie zasady azotowej. W porównaniu do post-transkrypcyjnego kapiu mRNA, metoda ko-transkrypcyjna daje o wiele więcej możliwości w kontekście modyfikacji wprowadzanych w obrębie kapu. Za pomocą metody ko-transkrypcyjnej możliwe jest wprowadzenie dowolnie modyfikowanych analogów kapu, jeśli wprowadzone modyfikacje są akceptowane przez polimerazę RNA, co pozwala na modulowanie właściwości biologicznych całego konstruktów mRNA⁷⁹⁻⁸¹. Niestety wadą metody ko-transkrypcyjnej jest brak pełnej kontroli nad procesem kapiu mRNA. Polimeraza RNA może wbudować kap w dwóch orientacjach: w poprawnej, w której mRNA zaczyna się od 7-metyloguanozyny lub jej pochodnej oraz w orientacji odwrotnej (*ang. reverse*), w której 7-metyloguanozyny znajduje się w pozycji pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Wbudowane kapu w odwrotnej orientacji sprawia, że takie mRNA jest нефunkcjonalne biologicznie. Problem odwrotnej orientacji kapu został rozwiązany dzięki chemicznej modyfikacji kapu – kap typu ARCA (*ang. anti-reverse cap analog*) (Rysunek 20B) oraz przez zastosowanie trinukleotydowych analogów kapu. Struktury tych analogów kapu oraz zasada ich działania, została opisana w dalszej części niniejszej rozprawy.

II.6 Synteza analogów nukleotydów

Chemicznie modyfikowane pochodne nukleozydów i nukleotydów wykorzystywane są w wielu dziedzinach nauki, począwszy od prostych narzędzi molekularnych służących do podstawowych badań biofizycznych, po skuteczne, efektywne i nietoksyczne środki przeciwwirusowe lub przeciwnowotworowe. Modyfikowane nukleozydy i nukleotydy są również wykorzystywane jako bloki budulcowe do syntezy modyfikowanych oligonukleotydów oraz funkcjonalnych łańcuchów RNA. Poszukiwania nowych pochodnych nukleozydów i nukleotydów, które mogą być wykorzystywane do wymienionych celów, doprowadziły do opracowania i rozwoju wielu strategii syntetycznych. Syntezowane chemicznie analogi nukleozydów i nukleotydów ze względu na miejsce występowania modyfikacji można podzielić na trzy grupy: związki modyfikowane w obrębie reszty cukrowej, zasady azotowej oraz (w przypadku nukleotydów) reszty fosforanowej ([Rysunek 21](#))⁸².



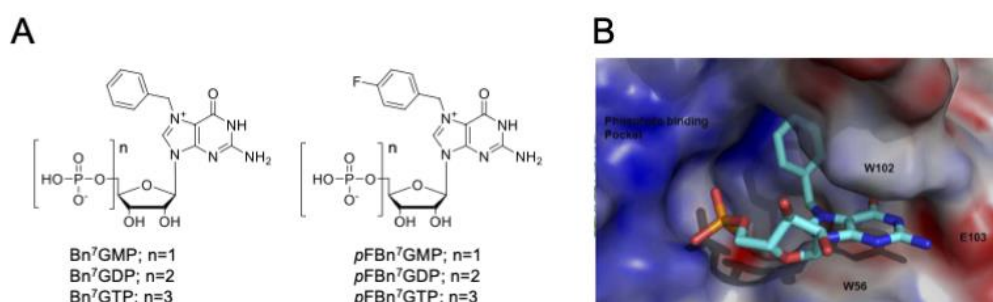
Rysunek 21. Możliwe miejsca modyfikacji nukleozydów i nukleotydów

Miejsce wprowadzenia modyfikacji definiuje jakie właściwości otrzyma nowy związek. Wprowadzenie modyfikacji w obrębie zasady azotowej, często ma na celu zwiększenie powinowactwa do białka czy enzymu. Modyfikacje reszty fosforanowej mogą również wpływać na powinowactwo do białka, dodatkowo uodpornić dany analog na degradację enzymatyczną lub zwiększyć przenikalność przez błony biologiczne. Natomiast w obrębie rybozy najczęściej wprowadza się grupy funkcyjne, które umożliwiają przyłączenie do nukleotydu znacznika fluorescencyjnego lub umożliwiają ligację nukleotydów⁸³.

II.7 Przykłady modyfikowanych nukleotydów z uwzględnieniem modyfikacji końca 5' mRNA

II.7.1 Nukleotydy z modyfikacją w obrębie zasady azotowej

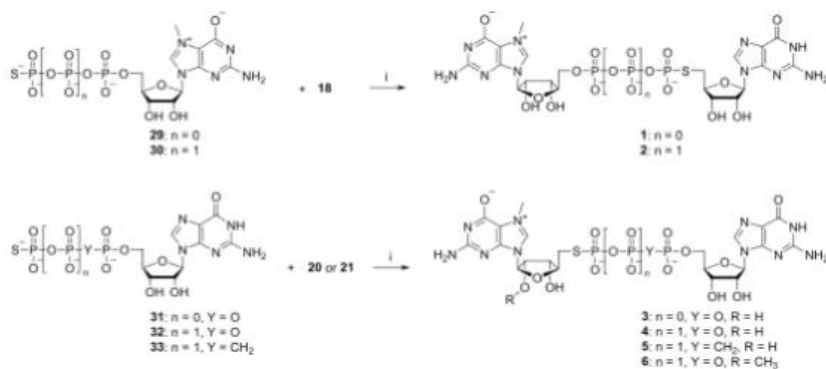
Nukleotydy z modyfikacją w obrębie zasady azotowej są najczęściej wykorzystywane jako inhibitory białek czy enzymów. Inhibitory te mogą służyć do poznania roli danego białka, np. poprzez krystalografię rentgenowską bądź mogą pełnić funkcje terapeutyczną. Przykładem nukleotydu modyfikowanego w obrębie zasady azotowej są 5'-fosforanowe pochodne guanozyny posiadające modyfikację w obrębie N^7 pozycji guanozyny. Związki te w pozycji N^7 posiadały ugrupowanie benzytowe lub *p*-fluorobenzytowe⁸⁴. Otrzymane analogi wykazywały wyższe powinowactwo do białka eIF4E niż niemodyfikowane nukleotydy⁸⁴. Fakt ten wykorzystano w badaniach krystalografii rentgenowskiej, w celu uzyskania struktury białka wraz z ligandem (Rysunek 22)



Rysunek 22. Przykład pochodnych nukleotydów z modyfikacją w obrębie zasady azotowej. **A.** Struktury otrzymanych związków w pracy *Brown i wsp.*; **B.** Struktura krystalograficzna – zbliżenie na kieszeń wiążącą białka eIF4E wraz z ligandem Bn⁷GMP⁸⁴

II.7.2 Nukleotydy z modyfikacją w obrębie reszty fosforanowej

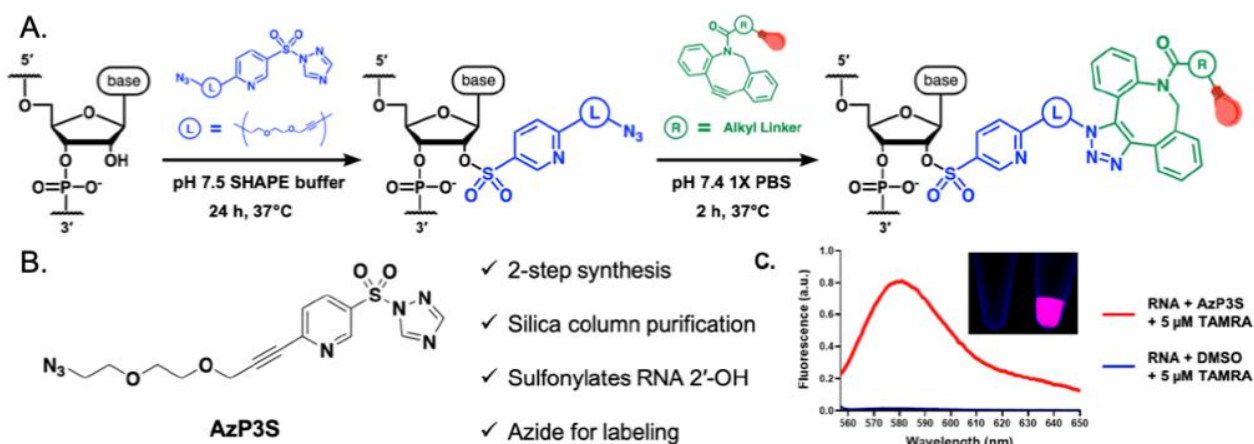
Drugą grupą modyfikowanych nukleotydów są związki posiadające modyfikacje w obrębie reszty fosforanowej. Przykładem takich analogów są pochodne końca 5' mRNA, w których modyfikacje wprowadzono w obrębie mostka 5',5'-trifosforanowego. W pracy *Wojtczak i wsp.* naturalnie występujący mostek 5',5'-trifosforanowy zastąpiono mostkiem, w którym grupy fosforanowe zastąpiono grupami tiofosforanowymi. Otrzymane analogi kapu okazały się być małowiązującymi inhibitorami enzymów dekapujących⁸⁵.



Rysunek 23. Synteza tiofosforanowych analogów kapu z modyfikacją w obrębie mostka 5',5'-trifosforanowego. Rysunek zaczerpnięto z pracy Wojtczak i wsp.⁸⁵

II.7.3 Nukleotydy z modyfikacją w obrębie rybozy

Jedną z najczęściej występujących, a zarazem najprostszych, modyfikacji rybozy jest metylacja pozycji 2'-O. Jak wspomniano w rozdziale II.1.1.5., metyl w pozycji 2'-O jest znacznikiem dla układu immunologicznego, który rozpoznaje tę modyfikację jako naturalną. Grupa 2'-OH rybozy jest atrakcyjna z punktu widzenia modyfikacji chemicznych pojedynczych nukleotydów, jak również RNA. Grupa 2'-OH rybozy posiada charakter nukleofilowy, co umożliwia jej łatwą modyfikację. Grupa ta jest zazwyczaj wykorzystywana do znakowania nukleotydów oraz RNA. Przykładem modyfikacji pozycji 2'-O, jest opisana w pracy Chatterjee i wsp., grupa sulfonilowa służąca do znakowania RNA⁸⁶. Wysoka reaktywność grupy 2'-OH umożliwiła wprowadzenie sfunkcjonalizowanej azydkiem grupy sulfonilowej, do której następnie przyłączony został barwnik fluorescencyjny w reakcji SPAAC (Rysunek 24).



Rysunek 24. Przykład modyfikacji nukleotydu w pozycji 2'-O rybozy. Modyfikacja przy użyciu grupy sulfonowej. Rysunek zaczerpnięto z pracy Chatterjee i wsp.⁸⁶

W przeciwieństwie do pozycji 2'-O rybozy, pozycja 3'-O rybozy jest znacznie mniej reaktywna. Selektywna modyfikacja w pozycji 3'-O rybozy jest możliwa po wcześniejszym zablokowaniu pozostałych grup hydroksylowych rybozy. Alternatywnym podejściem, często stosowanym do modyfikacji pozycji 3'-O rybozy, jest wykorzystanie jako substratów 2'-

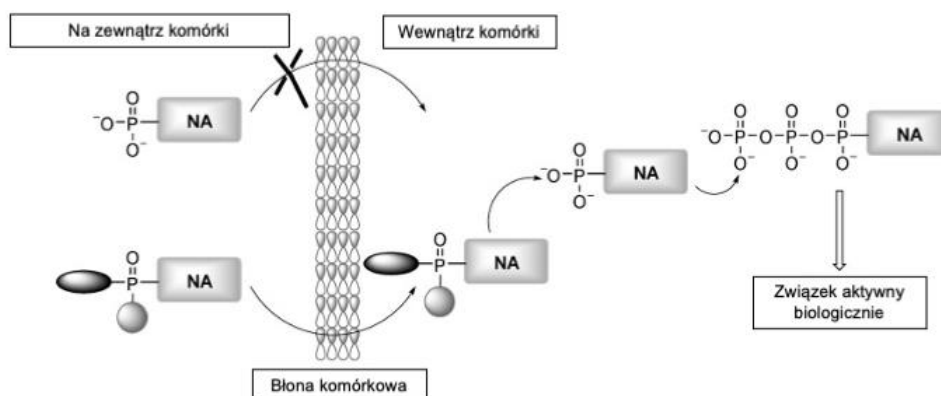
deoksyrybonukleotydów, które mogą w niektórych przypadkach zastąpić rybonukleotydy. Brak grupy hydroksylowej w pozycji 2'-O znacząco ułatwia selektywne wprowadzenie modyfikacji w obrębie pozycji 3'-O. Jedną z przykładowych modyfikacji wprowadzanych w pozycji 3'-O 2'-deoksyrybonukleotydów jest wprowadzenie grupy alkilowej, dzięki której możliwe jest wyznaczenie takich nukleotydów. Sfunkcjonalizowane grupą alkinową 2'-deoksyrybonukleotydy mogą być również wykorzystywane do ligacji oligonukleotydów DNA⁸⁷, a także chimer RNA-DNA.

II.8 Pronukleotydy – koń trojański w świecie komórek

Środki terapeutyczne pochodzenia nukleotydowego są stosowane głównie w chorobach wirusowych. Ich formą aktywną są 5'- mono- di- oraz trifosforany nukleozydów, które są stosowane jako inhibitory kompetycyjne enzymów wirusowych, uniemożliwiając dalsze funkcjonowanie wirusa w organizmie⁸⁸. Analogi nukleotydów mogą również hamować proces replikacji materiału genetycznego wirusa. Podczas etapu replikacji analogi nukleotydów są wbudowywane do DNA lub RNA, co hamuje proces wydłużania (elongacji) łańcucha DNA lub RNA⁸⁹.

Poważnym ograniczeniem środków terapeutycznych pochodzenia nukleotydowego jest ich wprowadzenie do wnętrza komórek. Ograniczenia te wynikają z niestabilności chemicznej (zwłaszcza 5'-trifosforanów nukleozydów) oraz z polarnego (jonowego) charakteru pochodnych 5'-fosforanów nukleozydów⁹⁰. Rozwiązaniem tego ograniczenia jest wykorzystanie modyfikowanych nukleozydów. Analogi nukleozydów są związkami znacznie mniej polarnymi i są w stanie przenikać przez lipidową błonę komórkową. Po pokonaniu bariery błony komórkowej, modyfikowane nukleozydy są fosforylowane przez enzymy – kinazy, do mono-, a następnie trifosforanów, które są formą aktywną potencjalnego terapeutyku^{91, 92}. Niestety podejście to również ma ograniczenia. Największym ograniczeniem jest często obserwowana niska konwersja nukleozydu w 5'-monofosforan nukleozydu. Etap ten jest etapem limitującym uzyskania formy aktywnej terapeutyku⁸⁸. Wszystkie wymienione ograniczenia doprowadziły do powstania pronukleotydów. Pronukleotydy (*ang. ProTides: Prodrug + nucleotide*) są to terapeutyki pochodzenia nukleotydowego, których mechanizm działania opiera się o technologię proleków (*ang. Prodrugs*), czyli nieaktywnych farmakologicznie związków (prekursorów leków), które po dostaniu się do wnętrza komórki są metabolizowane do formy aktywnej farmakologicznie⁹³. Pionierem technologii pronukleotydów był profesor Chris McGuigan, który zaproponował syntezę amidofosforanowych pochodnych nukleozydów. Związki otrzymane przez McGuigana rozwiązywały dwa główne ograniczenia terapeutyków pochodzenia nukleotydowego. Po pierwsze, zastosowanie amidofosforanów nukleozydów zamaskowało ujemny ładunek zlokalizowany, w przypadku naturalnych nukleotydów, na grupie fosforanowej. Zamaskowanie ładunku grupy fosforanowej sprawiło, że

związki te zyskały zdolność przenikania przez błonę komórkową, umożliwiając tym samym swobodne wnikanie do wnętrza komórek. Po drugie, dostarczony do wnętrza komórki związek, ulegał przemianom metabolicznym, które prowadziły do uwolnienia 5'-monofosforanu nukleozydu. W odróżnieniu od nukleozydów, 5'-monofosforan nukleozydu znacznie szybciej ulega fosforylacji przez odpowiednie kinazy do formy aktywnej terapeutyku – 5'-trifosforanu nukleozydu (Rysunek 25)⁹⁴⁻⁹⁶.



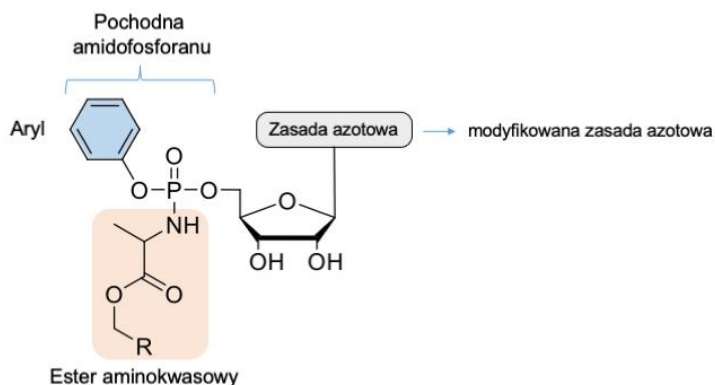
Rysunek 25. Schemat przedstawiający koncepcyjne działania pronukleotydów. Skrót „NA” na rysunku oznacza dowolny nukleozyd. Rysunek zaczerpnięto z pracy Mehellou Y. i wsp.⁹⁶.

Badania profesora Chrisa McGugaina dotyczące amidofosforanowych pronukleotydów zapoczątkowały rozwój tej technologii. Jednym z przykładów obecnie stosowanego terapeutyku jest tenofowir będący fosfonianowymi analogiem nukleotydu. Jest on inhibitorem odwrotnej transkryptazy – lekiem stosowanym przeciwko retrowirusom⁹⁷. Tenofowir dystrybuowany jest w postaci proleku, w którym grupa fosfonianowa została zamaskowana dwiema resztami izopropylloksykarbonyloksymetylowymi⁹⁸. Innymi koncepcjami wykorzystywanymi w technologii pronukleotydów jest koncepcja SATE czy CycloSal. W pierwszej z nich, SATE zastosowanymi grupami maskującymi jest grupa S-acylo-tioetylowa⁹⁹. Koncepcja CycloSal, z kolei, wykorzystuje pochodną alkoholu salicylowego, za pomocą którego grupa fosforanowa jest maskowana. Koncepcja CycloSal, w przeciwieństwie wcześniej wymienionych koncepcji, zakłada jednoetapowy etap aktywacji nukleotydu¹⁰⁰. Odminną koncepcję pronukleotydów przedstawił zespół profesora Chrisa Meiera. Koncepcja ta zakłada syntezę di- oraz trifosforanów nukleozydów, w których reszty fosforanowe zostały zamaskowane poprzez długie alifatyczne łańcuchy. Przewagą tej technologii, względem wcześniej wymienionych, jest wprowadzenie związku, który po usunięciu łańcuchów maskujących staje się od razu formą aktywną leku¹⁰¹.

II.8.1 Budowa amidofosforanowych pronukleotydów

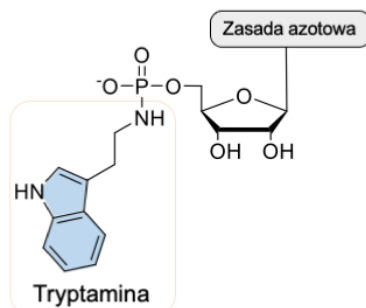
Najbardziej znanym rodzajem pronukleotydów są te zaproponowane przez McGugaina. Są one zbudowane z analogu nukleozydu (wykazującego aktywność farmakologiczną po ufosforylowaniu do mono- lub trifosforanu) oraz grupy amidofosforanowej.

Grupą amidofosforanową, wykorzystywaną w pronukleotydach, jest pochodna amidofosforanu, do której wiązaniem amidowym przyłączony jest ester aminokwasu, najczęściej L-alaniny. Dodatkowo, wolna grupa -OH amidofosforanu jest zabezpieczona arylem – fenolem lub jego pochodną (Rysunek 26).



Rysunek 26. Ogólny wzór struktury pronukleotydów McGugaina

Inny przykład amidofosforanowych pronukleotydów został opracowany przez zespół profesora Carstona R. Wagnera. Wagner do syntezy amidofosforanowych pronukleotydów wykorzystał tryptaminę – biogenną aminę (Rysunek 27)¹⁰². Tryptaminowe pronukleotydy, dzięki zamaskowaniu ujemnego ładunku, zlokalizowanego na reszcie fosforanowej nukleotydu, mogą przenikać przez błonę komórkową do jej wnętrza¹⁰².



Rysunek 27. Ogólny wzór pronukleotydów Wagnera

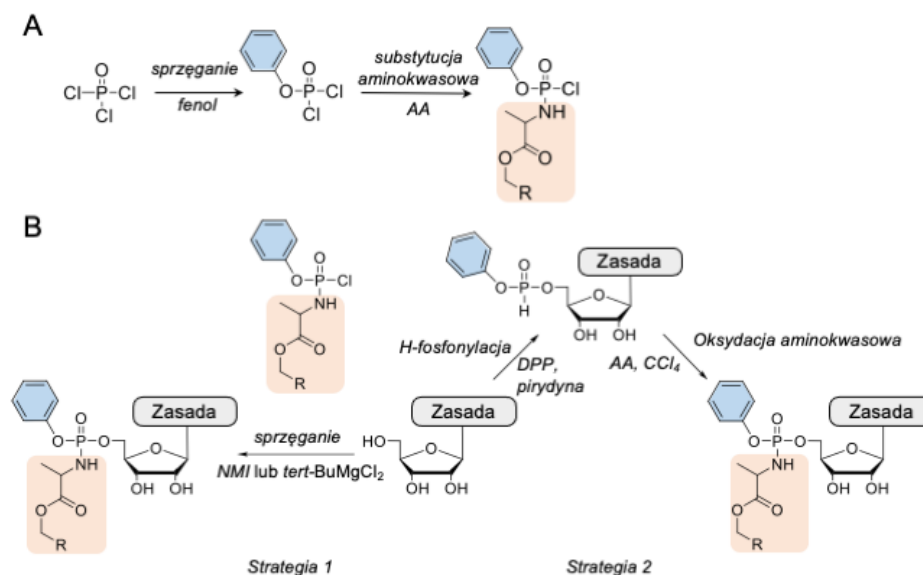
II.8.2 Synteza pronukleotydów

Amidofosforanowe pronukleotydy są najczęściej wykorzystywaną strategią służącą do dostarczania pochodnych 5'-monofosforanów nukleozydów do wnętrza komórek. Z tego względu, strategię syntezy pronukleotydów McGugaina są bardzo dobrze opisane w literaturze.

Pierwsza strategia, która została wykorzystana do syntezy pierwszych pronukleotydów, opiera się na reakcji sprzęgania modyfikowanego nukleozydu z chloropochodną amidofosforanu. Strategię tę można podzielić na dwa główne etapy – synteze

odpowiedniej chloropochodnej amidofosforanu oraz reakcję sprzęgania. Synteza chloropochodnej amidofosforanu (reagenta do reakcji sprzęgania z nukleozydem) przebiega dwuetapowo. Pierwszy etap obejmuje sprzęganie arylu z trichlorkiem fosforu, który jest związkiem wyjściowym tej syntezy, po czym następuje substytucja aminokwasu (Rysunek 28A). Po otrzymaniu chloropochodnej amidofosforanu, następuje reakcja sprzęgania z odpowiednim nukleozydem, w obecności *N*-metyloimidazolu (NMI) lub odczynnika Grignarada – chlorku *tert*-butylomagnezu (*tert*-BuMgCl₂), które pełnią rolę zasady. Odczynniki pełniące rolę zasady w reakcji sprzęgania, dobiera się w zależności od nukleozydu, który jest podstawą pronukleotydu (Rysunek 28B)^{90, 95}.

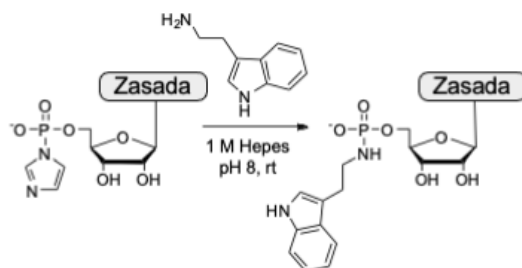
Alternatywna ścieżka syntetyczna, otrzymywania amidofosforanowych pronukleotydów, zakłada wykorzystania chemii H-fosfonianów. Punktem wyjściowym tej syntezy jest modyfikowany nukleozyd, który przekształca się w 5'-H-fosfonian nukleozydu. Reakcję H-fosfonylacji przeprowadza się w obecności fosfonianu difenyłu (*ang. diphenyl phosphite, DPP*). Rozpuszczalnikiem w tej reakcji jest pirydyna, pełniąca funkcję zasady. W przypadku zachowania warunków bezwodnych, w wyniku reakcji uzyskuje się 5'-H-fosfonian nukleozydu z jedną grupą fenylową. Drugim etapem tej syntezy jest reakcja oksydacji aminokwasowej, podczas której wytwarzany jest amidofosforan. Reakcja oksydacji prowadzona jest w warunkach bezwodnych w obecności utleniacza – np. tetrachlorku węgla (CCl₄) (Rysunek 28B)¹⁰³.



Rysunek 28. Strategie syntezy amidofosforanowych pronukleotydów (McGugaina). **A.** Synteza chloropochodnej amidofosforyny; **B.** Dwie strategii syntezy pronukleotydów.

Synteza tryptaminowych pronukleotydów opierała się na reakcji substytucji nukleofilowej pomiędzy tryptaminą a *P*-imidazolową pochodną modyfikowanego nukleozydu,

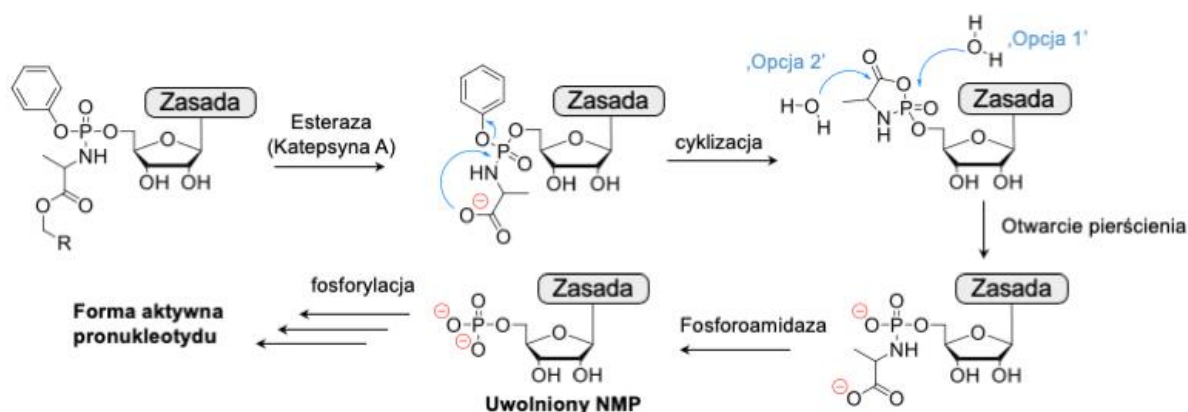
gdzie grupa imidazolowa jest grupą odchodzącą (elektrofil). Reakcja sprzęgania nie wymaga udziału mediatorów (Rysunek 29)¹⁰⁴.



Rysunek 29. Syntezy pronukleotydów tryptaminowych. Rysunek przygotowany na podstawie publikacji S. Gołojuch i wsp.¹⁰⁴

II.8.3 Metabolizm pronukleotydów

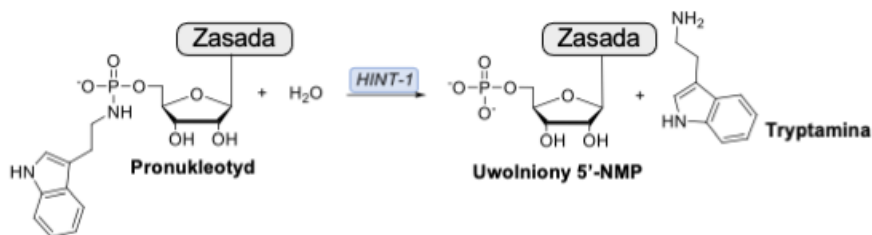
Mechanizm uwalniania 5'-monofosforanu nukleozydu przedstawia Rysunek 30. Metabolizm pronukleotydu McGugaina jest złożonym procesem, który obejmuje reakcje z udziałem enzymów oraz przekształcenia chemiczne. W pierwszym etapie, po wprowadzeniu pronukleotydu do wnętrza komórki, Katepsyna A – enzym należący do esteraz, hydrolizuje w części aminokwasowej wiązanie estrowe, czego produktem jest aminokwas w formie zjonizowanej. Ujemnie naładowana reszta aminokwasowa inicjuje proces spontanicznej cyklizacji, atakując atom fosforu. W wyniku spontanicznej cyklizacji, z zabezpieczonej reszty amidofosforanowej zostaje usunięta grupa arylowa. Po usunięciu grupy arylowej, powstały pierścień (tlenek oxaazafosolidynonu) zostaje otwarty w wyniku hydrolizy. Ostatnim etapem uwolnienia pronukleotydu jest hydroliza wiązania fosfoamidowego, za którą odpowiedzialny jest enzym fosfoamidaza. W zależności od mechanizmu działania leku, uwolniony 5'-monofosforan może być formą aktywną leku lub może zostać przekształcony w 5'-trifosforan nukleozydu na drodze reakcji fosforylacji katalizowanej przez kinazy (Rysunek 30)^{95, 96}.



Rysunek 30. Uwalniania pronukleotydu po przedostaniu się do wnętrza komórki. Rysunek został przygotowany na podstawie schematu opublikowanego w publikacji Youcef Mehellou i wsp.⁹⁵.

Uwalnianie 5'-monofosforanu nukleozydu z tryptaminowego pronukleotydu zachodzi według innego mechanizmu. Wewnątrz komórki reszta aminowa pronukleotydu jest

hydrolizowana przez enzym HINT-1 (ang. Histidine triad nucleotide-binding protein 1, HINT-1). Produktami tej reakcji enzymatycznej jest 5'-monofosforan nukleozydu (forma aktywna pronukleotydu) oraz amina (Rysunek 31)^{102, 105}



Rysunek 31. Schemat przedstawiający reakcję enzymatyczną, podczas której uwalniany jest pronukleotyd tryptaminowy wewnątrz komórki. Rysunek przygotowany na podstawie publikacji^{102, 105}.

II.9 Zastosowanie reakcji typu click chemisty w chemii nukleotydów

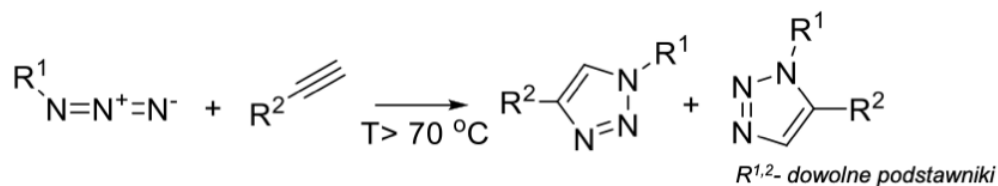
Termin „click chemistry” został po raz pierwszy zaproponowany przez profesora K.B. Sharplessa w 2001 roku. Mianem „*click chemistry*” określa się reakcje, które zachodzą szybko, z wysoką wydajnością, w łagodnych warunkach, są stereospecyficzne, produkty tych reakcji są nietoksyczne i łatwe do wyizolowania metodami chromatograficznymi. Reakcje typu „click chemistry” wykorzystywane są do syntezy nowych związków poprzez połączenie dwóch nieaktywnych biologicznie molekuł, które po połączeniu mogą nabrać nowych właściwości i stać się biomolekułą czynną biologicznie. W farmacji reakcje typu „click” są wykorzystywane do syntezy dużych bibliotek związków. W niniejszym rozdziale przedstawię najpopularniejsze przykłady reakcji typu „*click*” oraz przykłady zastosowań „*click chemistry*” w chemii nukleotydów, nukleotydów oraz kwasów nukleinowych.

II.9.1 Reakcje typu „click chemistry”

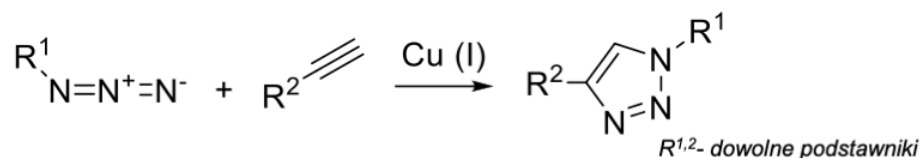
Klasycznym przykładem reakcji typu „click chemistry” jest reakcja azydkowo-alkinowej cykloaddycji katalizowanej jonami miedzi (I) – CuAAC (ang. *Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*). Reakcja CuAAC jest wariantem reakcji cykloaddycji Huisgena – 1,3 dipolarnej cykloaddycji, która zachodzi pomiędzy grupą azydkową oraz terminalną grupą alkinową, tworząc pierścień 1,2,3-triazolowy. Standardowa reakcja cykloaddycji Huisgena, bez udziału katalizatora, polega na indukowanej temperaturą kondensacji organicznych azydków z grupami alkinowymi. W jej wyniku powstają dwa regioizomery – 1,4 oraz 1,5 podstawiony pierścień triazolowy (Rysunek 32A). Reakcja cykloaddycji Huisgena jest powolna i wymaga wysokiej temperatury (> 70 °C), co znacznie ograniczyło jej stosowalność. Dodanie katalizatora do reakcji cykloaddycji Huisgena całkowicie zmieniło jej przebieg, co zostało odkryte równolegle przez grupy Sharplessa oraz Moedala^{106, 107}. W obecności katalizatora

reakcja cykloaddycji Huisgena nie wymaga wysokich temperatur, a czas jej trwania znacząco się skraca. Jednak największą korzyścią wynikającą z dodania jonów miedzi (Cu^+) do reakcji jest zmiana jej mechanizmu, co pozwala na otrzymywanie selektywnie jednego regioizomeru – izomeru 1,4 ([Rysunek 32B](#)). Pierwsze predykcje mechanizmu reakcji CuAAC zakładały powstanie kompleksu grupy alkinowej z jedną cząsteczką miedzi, co rozpoczyna proces cykloaddycji. Badania opublikowane przez Fokina i wsp., pokazały, że faktycznie reakcję cykloaddycji katalizują dwie cząsteczki miedzi, które oddziałują z grupą alkinową, obniżając energię aktywacji o 4-6 kcal/mol¹⁰⁸. W mechanizmie zaproponowanym w pracy Worrella i wsp., w pierwszej kolejności dwie cząsteczki miedzi tworzą kompleks z ugrupowaniem alkinowym. W kolejnym etapie następuje pierwszy atak nukleofilowy na grupę azydkową przez potrójne wiązanie grupy alkinowej tworząc pierwsze wiązanie kowalencyjne C–N. Drugie wiązanie kowalencyjne wytwarzane jest przez atak nukleofilowy azotu z grupy azydkowej na podwójne wiązanie C=C, co skutkuje zamknięciem pięcioczłonowego 1,2,3 – pierścienia triazolowego. ([Rysunek 32C](#))¹⁰⁸.

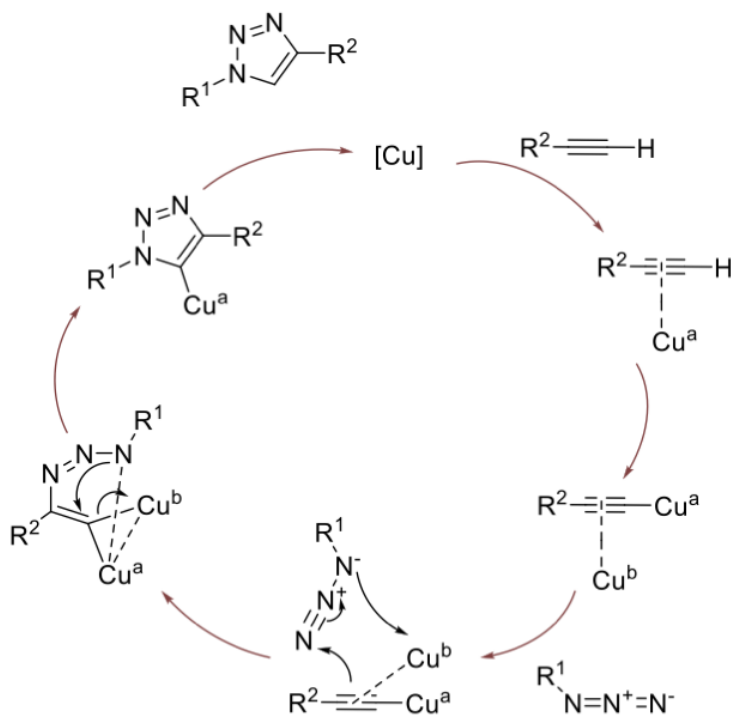
A 1,3 dipolarna azydkowo-alkinowa cykloaddycja Huisgena



B 1,3 dipolarna azydkowo-alkinowa cykloaddycja katalizowana jonami miedzi (I) - CuAAC



C Mechanizm reakcji CuAAC

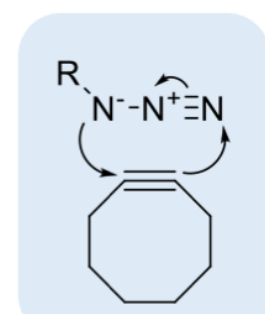
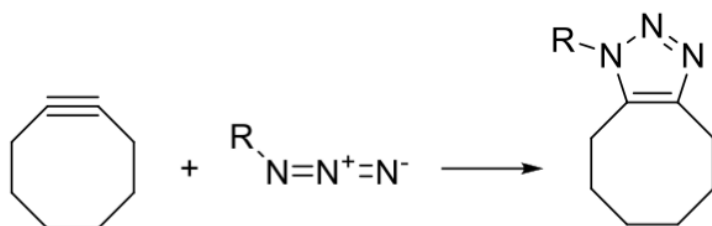


Rysunek 32. Click chemistry - reakcja azydkowo-alkinowej cykloaddycji. **A.** 1,3 dipolarna azydkowo-alkinowa cykloaddycja Huisgena - reakcja bez udziału katalizatora. **B.** Reakcja azydkowo-alkinowej cykloaddycji katalizowana jonami miedzi (I) - CuAAC. **C.** Mechanizm reakcji CuAAC z udziałem dwóch atomów miedzi zaproponowany przez Worrella i wsp. ¹⁰⁸.

Reakcja CuAAC, zaproponowana przez Sharplessa oraz Moedala, stała się niezastąpionym narzędziem służącym do selektywnej modyfikacji biomolekuł – kwasów nukleinowych, białek czy wirusów. Niestety konieczność użycia toksycznych jonów miedzi ograniczyła stosowalność reakcji CuAAC jedynie do warunków *in vitro*. Problem ten został rozwiązany przez grupę profesor Bertozzi, która w 2004 roku zaproponowała nowy rodzaj reakcji typu „click chemistry” – SPAAC – reakcja [3+2] cykloaddycji azydkowo-alkinowej promowana naprężeniami (*ang.* Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition, SPAAC).

Reakcja SPACC zachodzi bez dodatku katalizatora. Donorem grupy alkinowej, w reakcji SPAAC, jest cyklooktyn, którego naprężenia w szkielecie ułatwiają proces cykloaddycji. Naprężenia w szkielecie cyklooktynu obniżają jego energię aktywacji w porównaniu do terminalnych grup alkinowych, co sprawia, że reakcja SPAAC jest równie wydajna jak reakcja CuAAC (Rysunek 33)¹⁰⁹. Reakcja SPAAC jest klasycznym przykładem reakcji stosowanej w chemii bioortogonalnej.

Reakcja SPAAC



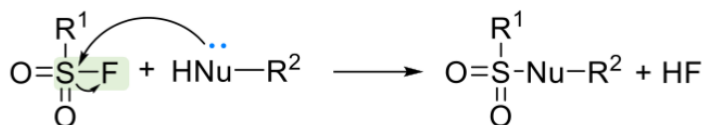
Mechanizm reakcji

Rysunek 33. Mechanizm reakcji SPAAC (ang. *Strain-Promoted Azide Alkyne Cycloaddition*), należącej do reakcji typu „click chemistry”

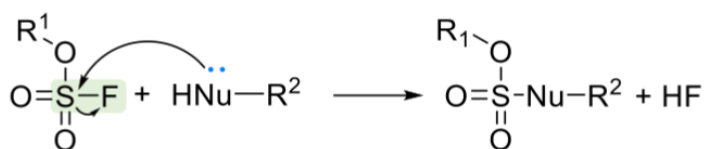
Jednym z najnowszych przykładów reakcji wpisującej się w filozofię „click chemistry” jest reakcja SuFEx (ang. *Sulfur-Fluoride Exchange*). Reakcje SuFEx zostały zaproponowane przez Sharplessa i jego współpracowników w 2014 roku¹¹⁰. Reakcja typu SuFEx opiera się na wysokiej reaktywności organicznego fluorosulfonylu ($R^1\text{-SO}_2\text{F}$) oraz fluorosulfonianu ($R^1\text{-SO}_3\text{F}$) z nukleofilami ($Nu\text{-}R^2$). Reakcja SuFEx jest reakcją substytucji nukleofilowej, w której wolna para elektronowa nukleofila przeprowadza atak na atom siarki grupy $R^1\text{-SO}_2\text{F}$ lub $R^1\text{-SO}_3\text{F}$, w wyniku czego powstaje trwałe wiązanie kowalencyjne pomiędzy atomem siarki a nukleofilem (Rysunek 34). Reakcja typu SuFEx, dzięki łagodnym warunkom reakcji, nietoksyczności oraz trwałości substratów, jest mocno eksplorowana pod kątem tworzenia nowych kowalencyjnych inhibitorów, znakowania białek i kwasów nukleinowych oraz do sieciowania (ang. *cross-linking*) biomolekuł^{111, 112}.

Reakcja typu SuFEx

Reakcja z udziałem fluorosulfonylu



Reakcja z udziałem fluorosulfonianu



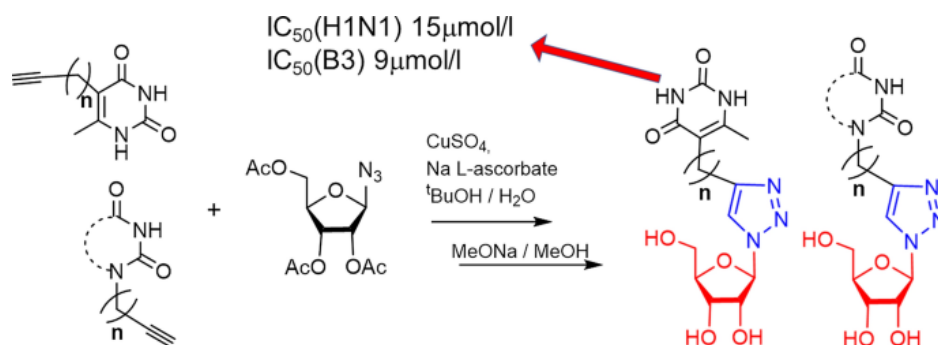
Nu – nukleofil: -NH₂, -OH, -SH

R^{1,2} – podstawniki

Rysunek 34. Schemat i mechanizm reakcji "click chemistry" typu SuFEx

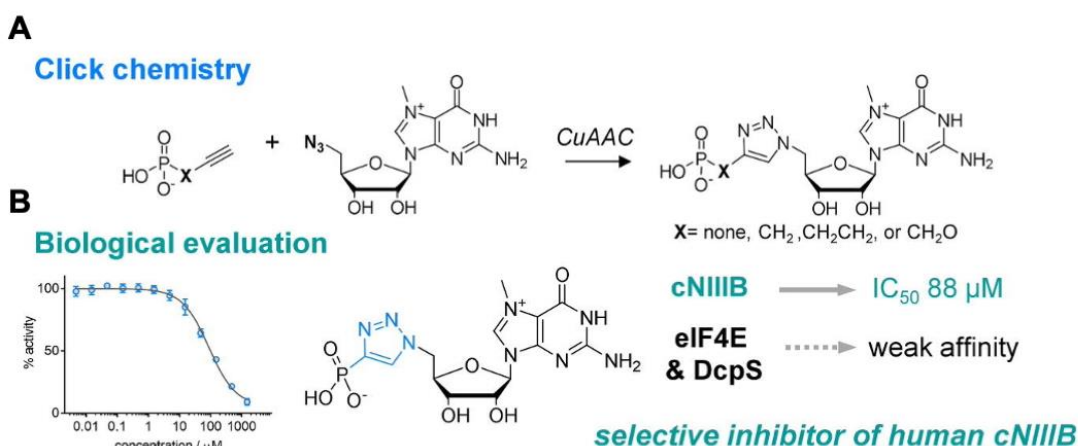
II.9.2 Przykłady zastosowań reakcji typu click chemistry w syntezie modyfikowanych nukleozydów i nukleotydów

Reakcja CuAAC, pomimo że została odkryta przeszło 20 lat temu, jest wciąż najczęściej stosowaną reakcją typu „click chemistry”. Reakcja CuAAC znalazła również zastosowanie w chemii nukleozydów i nukleotydów. Zastosowanie reakcji CuAAC umożliwia w łatwy i szybki sposób wprowadzenie w obrębie szkieletu nukleozydów i nukleotydów różnorodnych podstawników, modulujących właściwości fizykochemiczne i biologiczne modyfikowanych nukleozydów i nukleotydów. Biblioteki modyfikowanych, za pomocą reakcji CuAAC, nukleozydów i nukleotydów wykorzystywane są w wysokoprzepustowych *screeningach* w celu poszukiwań nowych leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Jednym z przykładów są związki opisane przez Olgę V. Andreevę i wsp.¹¹³. W pracy tej autorzy przy użyciu reakcji CuAAC zsyntezowali bibliotekę modyfikowanych nukleozydów – pochodnych uracylu oraz tyminy, w których standardowe wiązanie *N*-glikozydowe zostało zastąpione alifatycznymi łącznikami. Otrzymane związki zostały przetestowane pod kątem ich przeciwwirusowych aktywności względem jednego ze szczepów wirusa grypy.



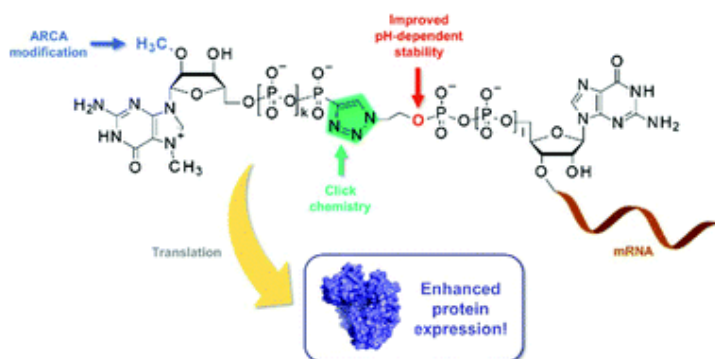
Rysunek 35. Przykłady modyfikowanych nukleozydów o właściwościach przeciwwirusowych, otrzymanych przy użyciu reakcji CuAAC. Rysunek zaczerpnięto z pracy Olga V. Andreeva i wsp.¹¹³.

Innym przykładem wykorzystania reakcji CuAAC, była opracowana przez autora niniejszej rozprawy synteza pochodnych m⁷GMP, w których wiązanie 5'-fosfoestrowe, powszechnie występujące w nukleotydach, zastąpiono pierścieniem triazolowym. Tak otrzymane związki zbadano pod kątem inhibicji, 5'-nukleotydazy cN-IIIB, której rola szerzej została opisana w poprzednich rozdziałach (Rozdział II.2.2.1.). Zastąpienie wiązania 5'-fosfoestrowego pierścieniem triazolowym sprawiło, że związki stały się odporne na degradację enzymatyczną (Rysunek 36)⁵³.



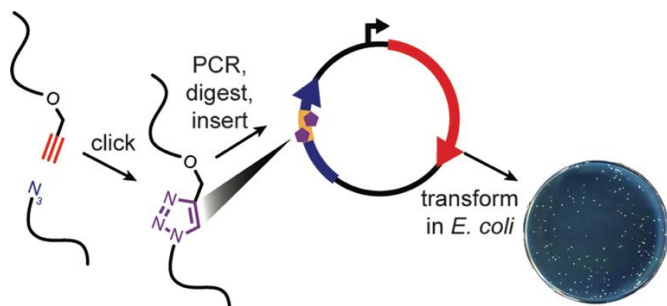
Rysunek 36. Przykład zastosowania reakcji CuAAC do syntezy pochodnych m⁷GMP wykorzystanych jako inhibitory enzymu cN-IIIB. Rysunek zaczerpnięty z pracy Kozarski i wsp.⁵³

Reakcję CuAAC można również wykorzystać do modyfikacji większych molekuł. Możliwe jest np. połączenie ze sobą kilku nukleotydów, poprzez zastąpienie naturalnie występującego wiązania łącznikami triazolowymi. Fakt ten wykorzystano w pracy Walczak i wsp., w której autorzy zsyntezowali obszerną bibliotekę dinukleotydowych analogów kapu. Analogi te posiadały łącznik triazolowy w obrębie mostka 5',5'-trifosforanowego. Badania opisane w tej pracy pokazały, że pomimo wprowadzenia dość obszernego pierścienia triazolowego w kluczowym miejscu z punktu widzenia oddziaływania z białkami kap-zależnymi, możliwe jest znalezienie związków o właściwościach biologicznych porównywalnych z właściwościami biologicznymi niemodyfikowanych analogów kapu (Rysunek 37)^{81, 114}



Rysunek 37. Przykład zastosowanie reakcji CuAAC w łączeniu dwóch nukleotydów tworząc funkcjonalny analog kapu. Rysunek zaczerpnięty z pracy Walczak S. i wsp.¹¹⁴

Ciekawym zastosowaniem reakcji CuAAC w kontekście chemii nukleotydów, jest ligacja fragmentów kwasów nukleinowych. Pionierem tego typu zastosowania chemii „click” jest profesor Tom Brown. Jest on autorem wielu prac prezentujących modyfikowane polimery DNA, w których naturalnie występujące wiązanie 3',5' fosfodiesterowe zastąpiono łącznikiem triazolowym. Zastosowanie reakcji CuAAC w przypadku syntezy polimerów DNA umożliwiło chemiczną ligację fragmentów DNA i przesunięcie limitu długości łańcucha DNA możliwego do otrzymania na drodze wyłącznie syntezy chemicznej. Pomimo znaczących modyfikacji łańcucha, „triazolowe” DNA jest w pełni funkcjonalną biomolekułą ulegającą charakterystycznym procesom biologicznym, takim jak replikacja DNA czy transkrypcja (Rysunek 38)^{115, 116}



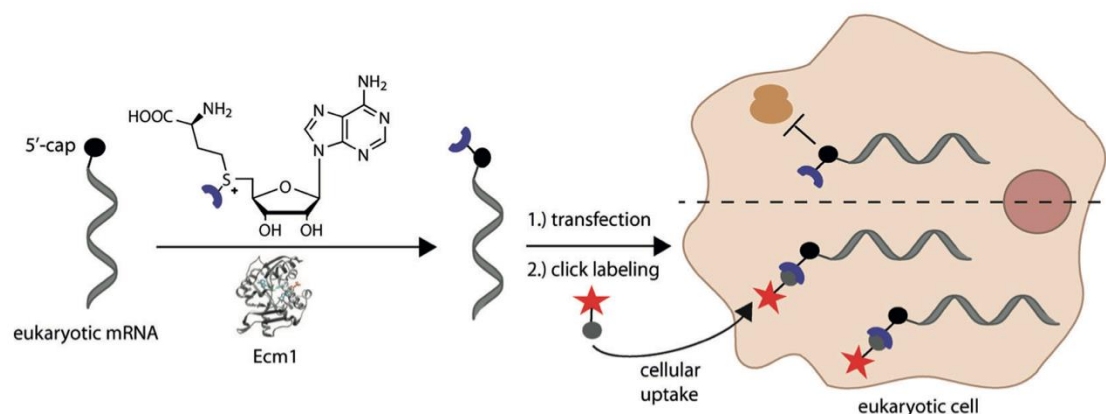
Rysunek 38. Przykład zastosowania reakcji CuAAC w ligacji kwasów nukleinowych. Rysunek zaczerpnięty z publikacji Brown i wsp.¹¹⁶

Opisane przykłady zastosowań reakcji CuAAC, zwłaszcza dotyczące syntezy analogów kapu oraz ligacji kwasów nukleinowych, stały się inspiracją do badań zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Reakcję CuAAC z powodzeniem wykorzystuje się również do selektywnego znakowania kwasów nukleinowych i ich metabolitów. Znakowanie to jest możliwe, dzięki zastosowaniu odpowiednio sfunkcjonalizowanych kwasów nukleinowych, grupą azydkową lub alkinową, oraz barwników fluorescencyjnych i połączeniu ich ze sobą za pomocą reakcji CuAAC. Wyznakowane fluorescencyjnie biomolekuły wykorzystuje się jako sondy fluorescencyjne w przesiewowych badaniach biofizycznych^{117, 118}. Znakowane

fluorescencyjnie kwasy nukleinowe przy użyciu reakcji CuAAC, wykorzystuje się do ich monitorowania wewnątrz komórek^{119, 120}. Z powodu toksyczności jonów miedzi (I) przeprowadzenie reakcji CuAAC w żywych komórkach było przez długi czas niemożliwe. Obecnie w literaturze można znaleźć prace mówiące o reakcji CuAAC w warunkach *in vivo*. W tym celu stosuje się specjalne nanocząsteczki lub polimery, które są nośnikami Cu(I)¹²¹. Pomimo dostępności nanocząsteczek miedzi, reakcja CuAAC w warunkach *in vivo* nie jest powszechnie stosowaną metodą w przypadku modyfikacji i znakowania kwasów nukleinowych.

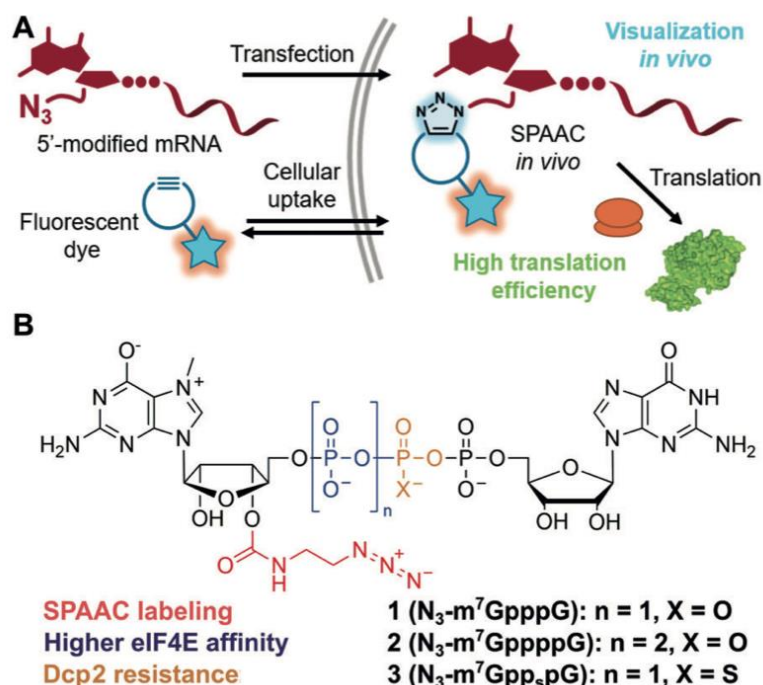
Alternatywną metodą służącą do znakowania kwasów nukleinowych wewnątrz żywych komórek jest wspomniana w rozdziale II.9.1. reakcja SPAAC, która nie wymaga jonów miedzi (I). Przykład jej zastosowania opisano w pracy J.M. Holstein i wsp., w której autorzy enzymatycznie zmodyfikowali koniec 5' mRNA, wprowadzając w obrębie jego struktury ugrupowanie azydkowe. Zmodyfikowane grupą azydkową mRNA wprowadzili do wnętrza komórek, gdzie następnie zostało ono wyznakowane za pomocą reakcji cykloaddycji SPAAC przy użyciu barwnika fluorescencyjnego posiadającego cyklooktyn. Wyznakowanie mRNA wewnątrz komórki umożliwiło obserwowanie wprowadzonego mRNA za pomocą mikroskopii laserowej (Rysunek 39)¹²².



Rysunek 39. Przykład zastosowania reakcji SPAAC w znakowaniu mRNA wewnątrz żywych komórek. Rysunek zaczerpnięto z pracy J.M. Holstein i wsp.¹²²

Podobne zastosowanie reakcji SPAAC do tej opisanej w pracy J.M. Holstein i wsp. przedstawiono w pracy Mamota i wsp.¹²³. W pracy tej autorzy zsyntezowali chemicznie modyfikowane analogi końca 5' mRNA, do których wprowadzono łącznik w obrębie rybozy posiadający terminalną grupę azydkową. Tak zmodyfikowane analogi końca 5' mRNA autorzy pracy wprowadzili do mRNA ko-transkrypcyjnie. Otrzymane modyfikowane mRNA wprowadzono do wnętrza żywych komórek, a następnie wyznakowano przy użyciu reakcji SPAAC *in vivo*. Następnie mRNA obrazowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Warto uwagi jest to, że znakowane mRNA, pomimo wprowadzonych modyfikacji, było aktywne

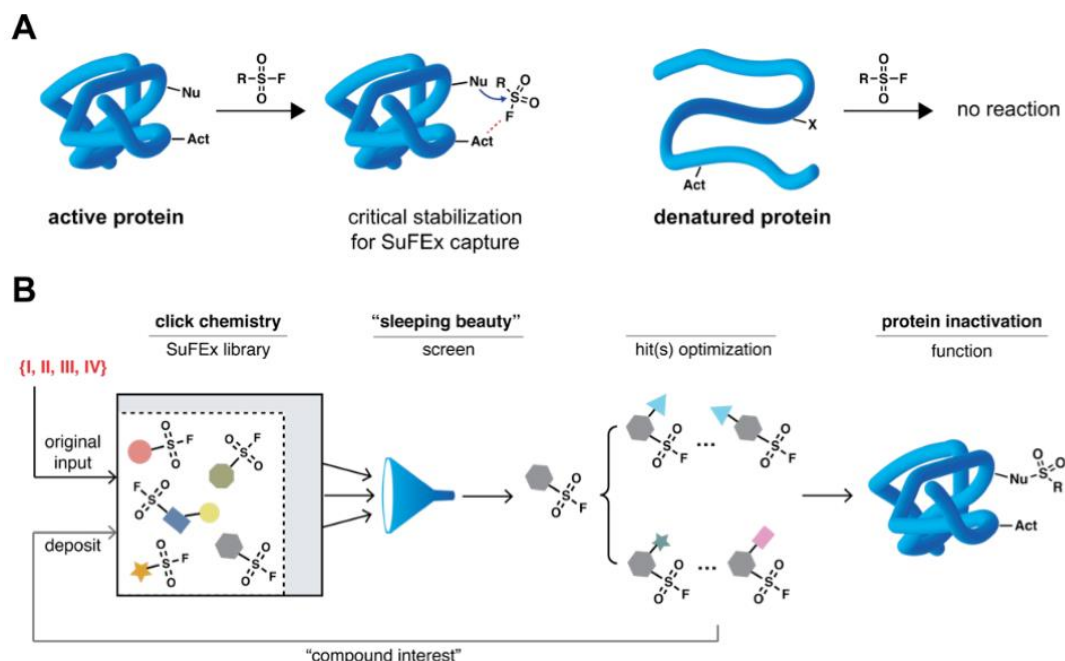
biologicznie i ulegało procesowi translacji zarówno w ekstraktach komórkowych jak i w żywych komórkach. Aktywność biologiczna oraz możliwość obrazowania takiego mRNA z w czasie rzeczywistym sprawia, że może być ono wykorzystywane jako narzędzie biotechnologiczne ukierunkowane w badanie procesu translacji (Rysunek 40)¹²³.



Rysunek 40. Przykład zastosowanie reakcji SPAAC w znakowaniu mRNA *in vivo* zaprezentowany w pracy Mamot i wsp., z której to pracy został zaczerpnięty rysunek ¹²³.

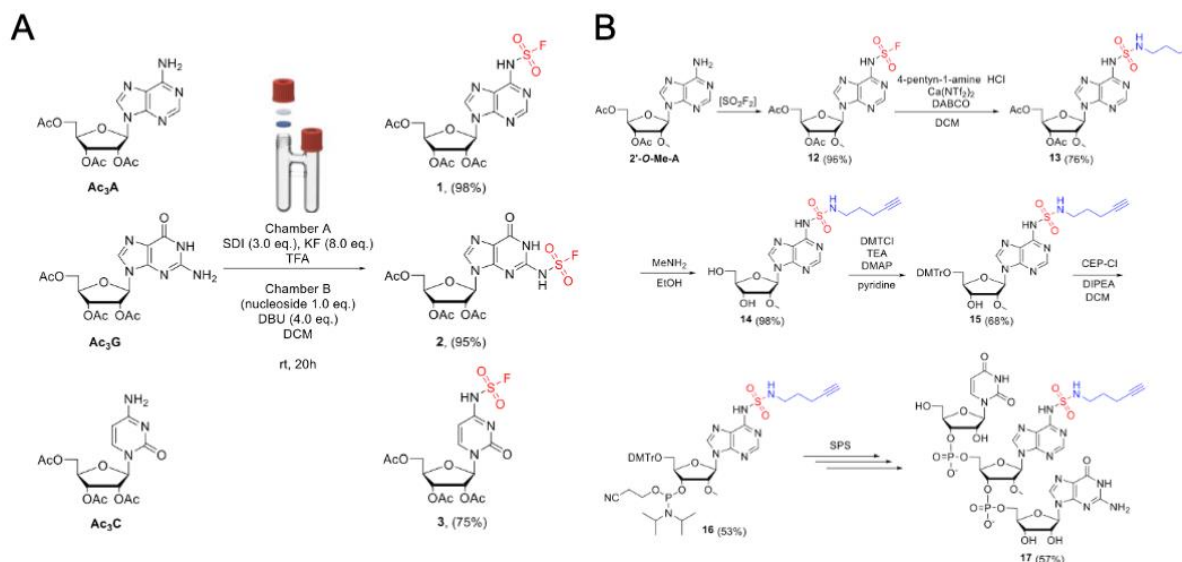
Ostatnią reakcją zaliczaną do reakcji typu „click chemistry” przytoczoną w niniejszej rozprawie doktorskiej jest wspomniana wcześniej reakcja SuFEx. Obecnie reakcja SuFEx uważana jest za najbardziej obiecującą reakcję typu „click chemistry” wykorzystywaną w chemii biologicznej ¹¹². Jednym z przykładów wykorzystania reakcji typu SuFEx w chemii biologicznej jest praca grupy Sharplessa, dotycząca odkrycia selektywnych i kowalencyjnych inhibitorów ludzkiego enzymu – elastazy neutrofilowej (*ang. human neutrophil elastase – hNE*) ¹²⁴. Autorzy zsyntezowali bibliotekę małych cząsteczkowych związków posiadających reaktywną grupę SO₂F, dzięki której związki te mogły ulegać reakcji SuFEx. W pracy tej związki te zdefiniowano jako związki SuFExable ¹²⁴. Związki te zaprojektowano w ten sposób, aby mogły trwale wiązać się z enzymem hNE wiązaniem kowalencyjnym utworzonym podczas reakcji SuFEx zachodzącej pomiędzy badanym inhibitorem a nukleofilem znajdującym się w łańcuchach bocznych aminokwasów. Utworzenie trwałego wiązania kowalencyjnego potencjalnego inhibitora z enzymem miało na celu zahamowanie aktywności hNE. Interesującym odkryciem było to, że wyselekcjonowane inhibitory wiązały się selektywnie wyłącznie z formą natywną enzymu hNE, co wskazywało, że reakcja indukowana jest

zbliżeniem następującym w momencie związania inhibitora w miejscu aktywnym enzymu (Rysunek 41)¹²⁴.



Rysunek 41. Rysunek przedstawiający zasadę działania związków *SuFExable* z enzymem oraz schematycznie przedstawia ideę przeprowadzonych eksperymentów przez grupę profesora Sharpless. Rysunek zaczerpnięto z pracy Qinheng Zheng i wsp.¹²⁴

Odkrycie reakcji *SuFEx* miało ogromny wpływ na rozwój działu chemii biologicznej i medycznej zajmującego się poszukiwaniem nowych narzędzi biotechnologicznych oraz leków bazujących na związkach reaktywnych^{103, 111, 125}. We współczesnej literaturze, pomimo rosnącego zainteresowania reakcją *SuFEx*, występuje znikoma liczba publikacji mówiących o zastosowaniu reakcji typu *SuFEx* w kontekście modyfikacji nukleozydów, nukleotydów oraz kwasów nukleinowych. W 2022 roku, w pracy Chromiński i wsp., opracowano metodę modyfikacji rybonukleotydów przy użyciu generowanego *ex situ*, fluorkiem sulfonylu (SO_2F)¹²⁶. Grupę SO_2F autorzy pracy wprowadzili w obręb zasady azotowej trzech nukleozydów – adenozy, guanozy oraz cytozyny. Nukleozydy, które sfunkcjonalizowano grupą sulfonową nazwano *SuFNucs* (ang. *Sulfamoyl Functionalized Nucleosides*). W obecności pierwszorzędowych amin, *SuFNucs* ulegały reakcji *SuFEx* tworząc wiązanie sulfamidowe. Związki, które uległy reakcji *SuFEx* zostały nazwane przez autorów pracy *SulfamNucs* (ang. *Sulfamide Nucleosides*). Otrzymane przez autorów *SulfamNucs* posłużyły również jako substraty do syntezy 3' amidofosforynu *SufamNucs*, który z powodzeniem zostały wykorzystany do syntezy oligonukleotydu przy użyciu syntezy na podłożu stałym (Rysunek 42)¹²⁶.



Rysunek 42. Przykład zastosowania reakcji *SuFEx* w chemii nukleotydów. **A.** Synteza modyfikowanych grupą SO_2F nukleotydów. **B.** Zastosowanie *SuFNucs*. Rysunek zaczerpnięto z pracy Chromiński i wsp.¹²⁶

Badania opisane w przytoczonej pracy otwierają wiele nowych możliwości w chemii nukleotydów oraz nukleotydów. Nowe *SuFNucs* analogi nukleotydów i nukleotydów mogą być wykorzystane jako inhibitory białek rozpoznających struktury nukleotydów i nukleotydów oraz jako narzędzia molekularna do badania procesów, w które te białka są zaangażowane.

II.10 Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia molekularne do badania mRNA

Od dekad nukleozydy i nukleotydy są punktem wyjściowym do projektowania leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych, a także są wykorzystywane jako narzędzia molekularne służące do badań wielu kluczowych procesów komórkowych, w których kwasy nukleinowe biorą udział. Mnogość zastosowań modyfikowanych nukleotydów i nukleotydów sprawia, że są one coraz częściej wykorzystywane w dziedzinach takich jak biofizyka, biologia molekularna czy biotechnologia. W niniejszym rozdziale przedstawię przykłady zastosowań modyfikowanych nukleotydów, nukleotydów oraz kwasów nukleinowych jako narzędzi molekularnych.

II.10.1 Wykorzystanie modyfikowanych nukleotydów jako narzędzi do badania metabolizmu mRNA

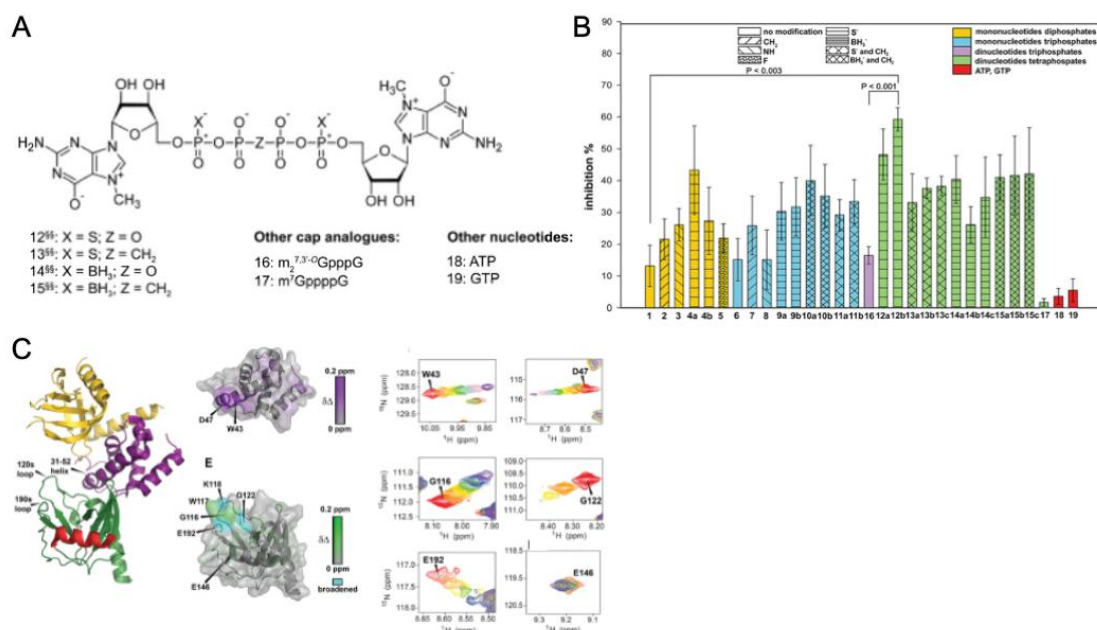
Głównym zagadnieniem rozpatrywanym w niniejszej rozprawie doktorskiej było badanie metabolizmu końca 5' mRNA – translacji mRNA zależnej od kapu oraz degradacji kapu i jego pochodnych. W tej części przeglądu literaturowego skupię swoją uwagę na przedstawieniu „narzędzi” służących do badania procesów związanych z metabolizmem mRNA. Słowo „narzędzie”, w tym konkretnym przypadku, jest rozumiane jako nukleotydy, do których wprowadzono modyfikacje modulujące ich właściwości biologiczne i fizykochemiczne. Modyfikowane nukleotydy-narzędzia są wykorzystywane jako inhibitory białek czy enzymów,

jako sondy molekularne do śledzenia różnych procesów komórkowych oraz do syntezy oligonukleotydów i w pełni funkcjonalnych kwasów nukleinowych, nadając tym biomolekułom nowe właściwości biologiczne.

II.10.2 Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia do badania degradacji końca 5' mRNA i jego metabolitów

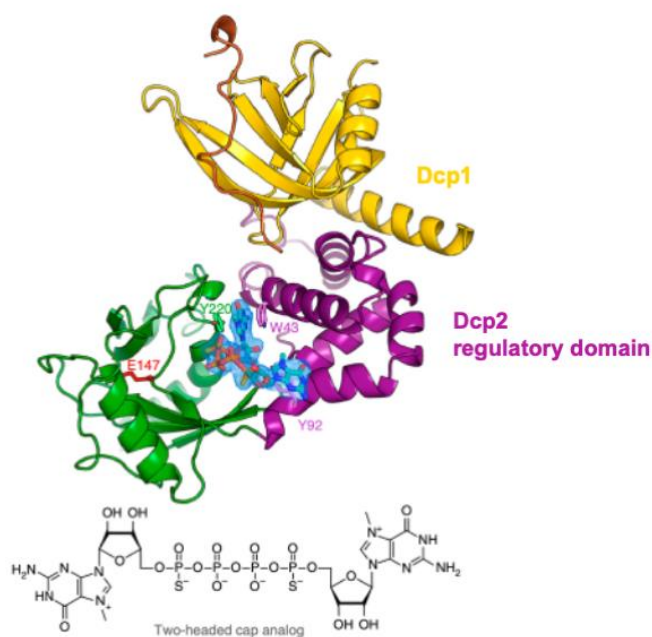
Eukariotyczny kompleks Dcp1/2 oraz enzym DcpS są głównymi enzymami odpowiedzialnymi za proces degradacji końca 5' mRNA (kapu)¹²⁷⁻¹²⁹. Proces degradacji 5' kapu jest istotnym procesem z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania komórki. Zaburzenie tego procesu, spowodowane nieprawidłową aktywnością enzymów Dcp1/2 lub DcpS, może niekorzystnie wpływać na proces ekspresji genu, skutkując rozwojem chorób¹³⁰. Z tego powodu zaczęto poszukiwać narzędzi molekularnych do badania procesów związanych z aktywnością enzymów Dcp1/2 oraz DcpS.

Pierwszym przykładem nukleotydowych narzędzi wykorzystywanych do badania enzymu Dcp1/2 jest praca Ziemniaka i wsp., w której autorzy wykorzystali analogi mono- i dinukleotydów jako inhibitory kompleksu Dcp1/2. W tej pracy zsyntezowano bibliotekę związków – analogów 7-metyloguanozyny posiadających modyfikacje w obrębie łańcucha fosforanowego, a następnie wykorzystano je do monitorowania aktywności kompleksu Dcp1/2, hamując proces degradacji końca 5' mRNA ([Rysunek 43A,B](#))¹³¹. Autorzy pracy odkryli, że jeden z syntezowanych przez nich analogów kapu, m⁷Gp_sppp_sm⁷G, wiąże się z domeną Dcp2, 20-krotnie silniej niż naturalnie występujący kap (m⁷GpppG). Fakt ten wykorzystano do stworzenia mapy strukturalnej pokazującej sposób oddziaływania analogu kapu z Dcp2. Mapa ta została stworzona z pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego ([Rysunek 43C](#))¹³¹.



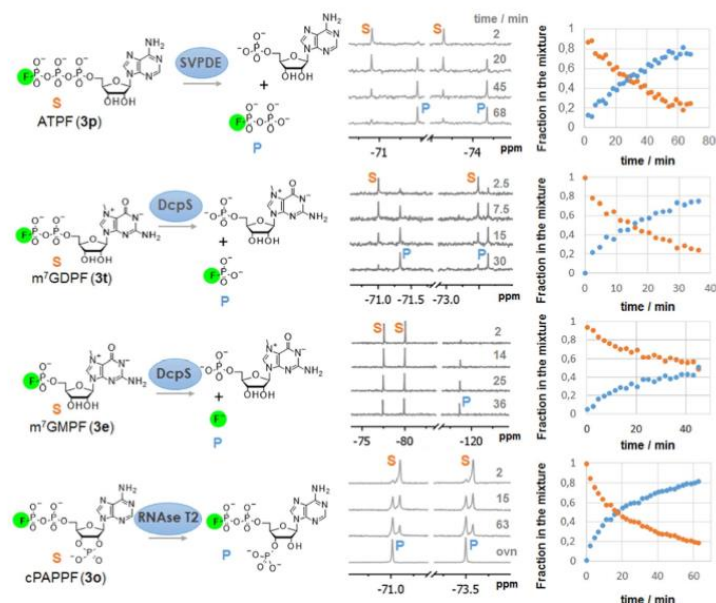
Rysunek 43. Przykład zastosowania analogów końca 5' mRNA jako narzędzi do badania aktywności kompleksu Dcp1/2. **A.** Zsyntezowana biblioteka analogów końca 5' mRNA; **B.** Badanie procesu inhibicji kompleksu Dcp1/2 za pomocą zsyntezowanych analogów końca 5' mRNA; **C.** Strukturalna mapa oddziaływań analogu końca 5' mRNA z kompleksem Dcp1/2 stworzona za pomocą magnetycznego rezonansu jądowego. Rysunek zaczerpnięty z pracy Ziemiak i wsp. ¹³¹.

Odkrycie silnego nukleotydowego inhibitora kompleksu Dcp1/2¹³¹ przyczyniło się do uzyskania pierwszej struktury krystalograficznej kompleksu Dcp1/2 wraz z ligandem¹²⁷. Struktura krystalograficzna Dcp1/2 w kompleksie z m⁷Gp_sppp_sm⁷G ujawniła nową konformację Dcp1/2 wyjaśniającą sposób wiązania nukleotydów przez badany enzym. Otrzymana struktura Dcp1/2 jest spójna z wynikami uzyskanymi metodą NMR ¹³¹ i potwierdza, że za wiązanie kapu odpowiedzialna jest zarówno domena regulatorowa enzymu, jak i domena Nudix DCP2 (Rysunek 44)¹²⁷. Opisane badania były kluczowe dla zrozumienia sposobu wiązania struktury końca 5' mRNA podczas procesu dekapowania mRNA^{127, 131}. Znajomość struktury krystalograficznej Dcp1/2 oraz mechanizmu działania otwiera drogę do projektowania nowych, silniejszych inhibitorów tego enzymu.



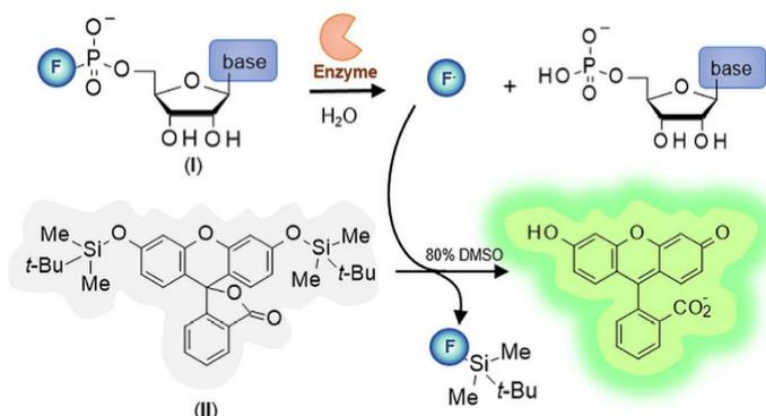
Rysunek 44. Struktura krystalograficzna Dcp1/2 wraz ze związanym ligandem - analogiem końca 5' mRNA - $m^7Gp_sppp_s m^7G$. Rysunek zaczerpnięto z pracy Mugridge i wsp.¹²⁷

Inny przykład zastosowania modyfikowanych nukleotydów wykorzystywanych jako narzędzia do badania procesów związanych z degradacją końca 5' mRNA opisano w pracy Baranowskiego i wsp.¹³². Autorzy zsyntezowali 5'-fluorofosforanowe pochodne nukleozydów i wykorzystali je jako sondy molekularne do badań ^{19}F NMR. Jednym z opisanych zastosowań nukleotydów znakowanych ^{19}F , było wykorzystanie ich do monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznych przy użyciu ^{19}F NMR (Rysunek 45)¹³². Za pomocą ^{19}F NMR autorzy pracy obserwowali konwersje substratów w produkty podczas prowadzenia reakcji enzymatycznej, m.in. reakcję katalizowaną przez enzym DcpS.



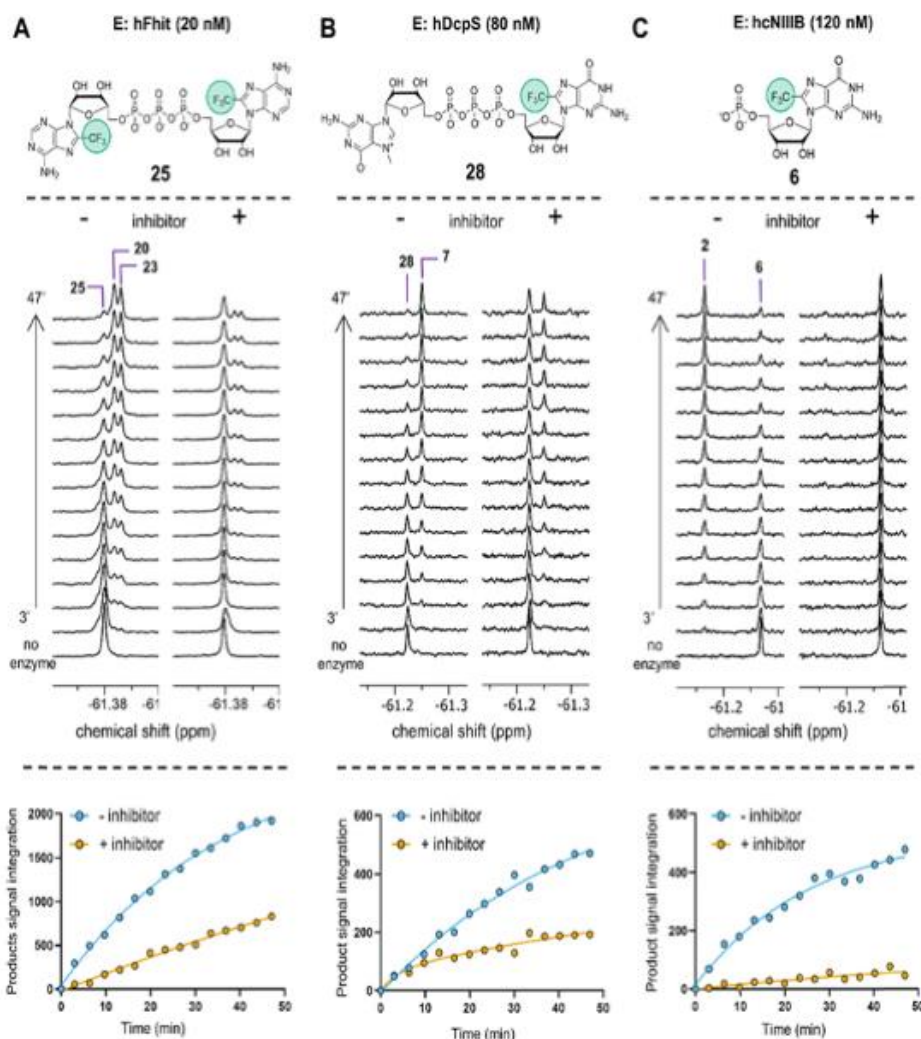
Rysunek 45. Przykład zastosowania 5'-fluorofosforanów nukleozydów do monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznej przy użyciu ^{19}F NMR. Rysunek zaczerpnięto z pracy Baranowski i wsp.¹³²

Autorzy przytoczonej powyżej pracy (Barankowski i wsp.), wykorzystali nukleotydy znakowane atomem fluoru (5'-fluorofosforany nukleozydów) do opracowania wysokoprzepustowej metody przesiewowej (*ang. high-throughput screening, HTS*) służącej do poszukiwania inhibitorów enzymu DcpS¹³³. Metoda ta wykorzystywała sondę typu *turn-on*, którą była fluoresceina zabezpieczona grupami siliłowymi. Tak zabezpieczona fluoresceina nie posiadała właściwości fluorescencyjnych. Pod wpływem jonów fluorkowych uwalnianych z 5'-fluorofosforanu nukleozydu podczas reakcji enzymatycznej z udziałem enzymu DcpS, siliłowe grupy zabezpieczające były usuwane, co skutkowało zmianą układu π -elektronowego fluoresceiny i „uwolnieniem” jej właściwości fluorescencyjnych. Za pomocą pomiaru fluorescencji, oznaczano ilość uwolnionych jonów fluorkowych podczas reakcji enzymatycznej w obecności DcpS oraz jego potencjalnego inhibitora. Określenie ilości uwolnionych jonów fluorkowych pozwalała na względne określenie aktywności DcpS w obecności potencjalnego inhibitora (Rysunek 46)¹³³. Metoda opracowana przez Baranowski i wsp. umożliwia przeszukiwanie dużych bibliotek związków w dość krótkim czasie, co jest kluczowe dla rozwoju chemii medycznej i projektowania nowych leków.



Rysunek 46. Przykład zastosowania nukleotydów jako narzędzi molekularnych do badania degradacji końca 5' mRNA. Sposób działania fluorescencyjnej HTS. Rysunek zaczerpnięto z pracy Baranowski i wsp.¹³³

Kolejny przykład zastosowania modyfikowanych nukleotydów jako narzędzi do badania degradacji końca 5' mRNA został opisany w pracy Chromińskiego i wsp. w 2020 roku¹³⁴. W pracy tej, tak jak w poprzednich przykładach, wykorzystano nukleotydy znakowane fluorem. W przeciwieństwie do poprzednich przykładów zsyntezowane analogi nukleotydów posiadały jednak modyfikacje w obrębie zasady azotowej. Modyfikacją tą było podstawienie w pozycji C8 grupy trifluorometylowej (CF₃). Grupa CF₃ posiada trzy równocenne atomy fluoru, co zwiększa czułość analizy za pomocą ¹⁹F NMR. Autorzy pracy wykorzystali otrzymane trifluorometylowe analogi nukleotydów do monitorowania reakcji enzymatycznych, porównując przesunięcia chemiczne na widmie ¹⁹F NMR. Przesunięcia chemiczne ¹⁹F, pochodzące od substratów oraz produktów reakcji enzymatycznych różniły się, dzięki czemu możliwe było badanie aktywności enzymów (Rysunek 47)¹³⁴. Jednym z badanych enzymów, był ludzki enzym cN-IIIB, który był tematem badań przeprowadzonych w niniejszej rozprawie doktorskiej.



Rysunek 47. Przykład zastosowania nukleotydów modyfikowanych grupą CF_3 . Modyfikowane nukleotydy wykorzystano do monitorowania aktywności enzymów: **A.** hFhit; **B.** hDcpS; **C.** hcN-IIIB. Rysunek zaczerpnięto z pracy Chromiński i wsp.¹³⁴

II.10.3 Analogi końca 5' mRNA jako narzędzia do badania translacji mRNA

Translacja informacyjnego RNA (*ang. Messenger RNA, mRNA*) jest najważniejszym procesem ekspresji genu, podczas którego dochodzi do syntezy białka. Z tego powodu translacja jest ściśle kontrolowana przez szereg procesów komórkowych¹³⁵. Modulowanie wydajności translacji syntetycznych mRNA możliwe jest dzięki zastosowaniu narzędzi molekularnych. Przykładami takich narzędzi są chemicznie zmodyfikowane pochodne końca 5' mRNA, które są wykorzystywane do badania metabolizmu i translacji mRNA. Pierwsze prace dotyczące wykorzystania analogów końca 5' mRNA (kapu) jako narzędzi do badania oraz modulowania właściwości mRNA pochodzą z lat 80 XX wieku¹³⁶⁻¹³⁸. Od tego czasu nastąpił ogromny rozwój narzędzi molekularnych opartych o strukturę analogów kapu. Analogi końca 5' mRNA znalazły swoje zastosowanie nie tylko jako narzędzia do badania metabolizmu mRNA, ale również w medycynie, gdzie mogą być wykorzystywane w terapiach

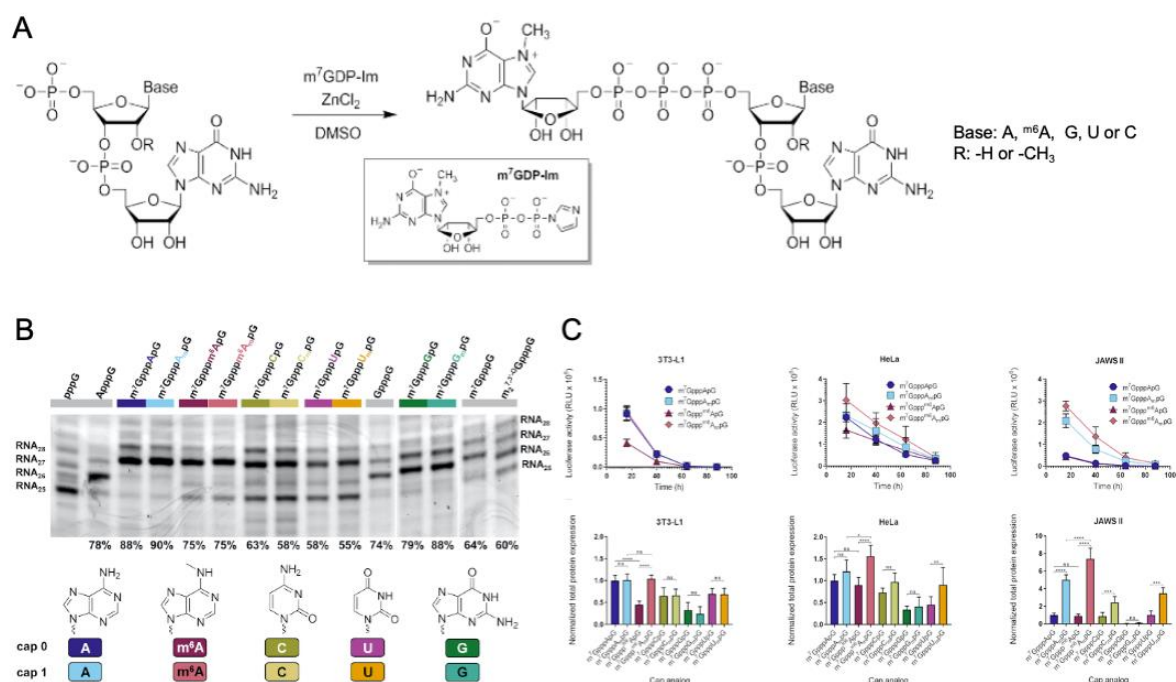
przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych^{79, 139, 140}. Rozwój tej technologii przyczynił się również do powstania szczepionek mRNA przeciwko COVID-19¹⁴¹.

Przykład wykorzystania chemicznie modyfikowanych pochodnych końca 5' mRNA został opisany w pracy Grudzień i wsp., której autorzy wykorzystali analog kapu typu ARCA (*ang. Anti-reverse cap analog*) do badania stabilności i translacji mRNA¹⁴². Badania pokazały, że mRNA posiadające na swoim końcu 5' kap typu ARCA nie tylko jest bardziej stabilne w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, ale również ulega wydajniej procesowi translacji w porównaniu do mRNA zakończonego naturalnie występującym kapem. Wyniki uzyskane dla kapu typu ARCA dały początek nowym odkryciom. W 2007 roku ukazał się pierwsza praca przedstawiająca syntezę oraz właściwości analogu kapu ARCA posiadającego tiofosforanową modyfikację w obrębie mostku 5',5'-trifosforanowego^{80, 142, 143}. Analog kapu ARCA z modyfikacją tiofosforanową został nazwany β -S-ARCA. W 2010 roku mRNA zakończone na końcu 5' analogiem β -S-ARCA zostały wykorzystane do badań w komórkach dendrytycznych. Badania przeprowadzone przez Kuhn A.N. i wsp., pokazały, że zastąpienie kapu ARCA w mRNA kapem β -S-ARCA, znacznie zwiększa stabilność takiego mRNA. Ponadto mRNA zakończone β -S-ARCA w warunkach *in vivo*, ulega translacji 4-krotnie wydajniej niż mRNA zakończone kapem typu ARCA⁸⁰.

Przełomowym odkryciem w kontekście badania translacji było zastosowanie trinukleotydowych analogów kapu o wzorze ogólnym $m^7GpppN^1pN^2$. Trinukleotydowe analogi kapu zostały po raz pierwszy zaprezentowane w publikacji pokonferencyjnej w 2009 roku¹⁴⁴. Technologia trinukleotydowych analogów kapu zaproponowana przez Ishikawe i wsp., nie była eksplorowana do 2017 roku, kiedy to firma biotechnologiczna *Trilink Biotechnology* zaimplementowała tę technologię do syntezy kapowanego mRNA. Zastosowanie trinukleotydowych analogów kapu umożliwiło syntezę 5' kapowanego mRNA – zakończonego kap1 (metylacja w pozycji 2'-O pierwszego transkrybowanego nukleotydu) ko-transkrypcyjnie, za pomocą reakcji transkrypcji *in vitro* (IVT)¹⁴⁴. W miarę zrozumienia istotnej roli tej metylacji w procesach immunologicznych, technologia trinukleotydowych analogów kapu zaczęła być bardziej eksplorowana w kontekście wykorzystania jej do badania procesów związanych z metabolizmem mRNA.

Sikorski i wsp. zbadali zestaw trinukleotydowych analogów kapu w wersji kap0 – bez metylacji w pozycji 2'-O pierwszego transkrybowanego nukleotydu) oraz kap1 – z grupą metylową w pozycji 2'-O pierwszego transkrybowanego nukleotydu ([Rysunek 48A](#))⁸. Zsyntezowane trinukleotydowe analogi kapu wykorzystano jako narzędzie do badania procesu transkrypcji *in vitro* (IVT) – syntezy kapowanego mRNA, badając przy tym wydajność kapingu. Wydajność kapingu zdefiniowano jako stosunek ilości kapowanego mRNA do całkowitej ilości otrzymanego mRNA ([Rysunek 48B](#)). Wykorzystując otrzymane analogi kapu autorzy pracy

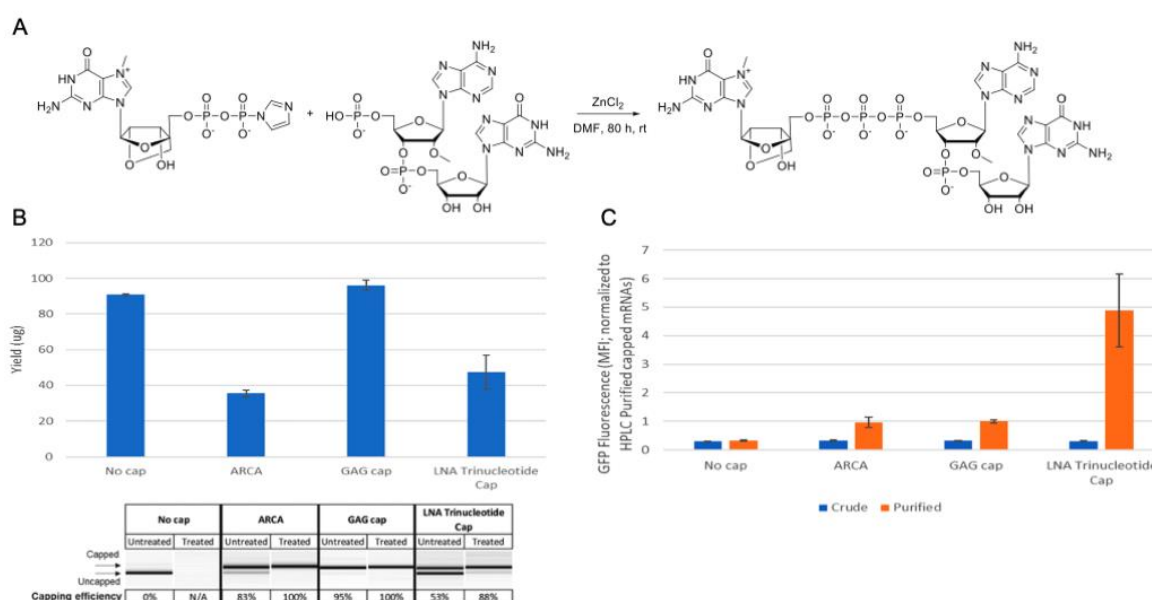
zbadali również jak na proces translacji mRNA, otrzymanego w reakcji *IVT*, wpływa rodzaj zasady azotowej oraz obecność metylacji w pozycji 2'-OH pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Badania wskazały, że wprowadzenie zmian w obrębie pierwszego transkrybowanego nukleotydu znacząco wpływają na poziom ekspresji mRNA w żywych komórkach. Pokazano również, że poziom ekspresji tego samego mRNA różni się w zależności od linii komórkowej. Modyfikacja kapu dającą największy efekt biologiczny jest 2'-O-metylo adenozyna oraz N⁶, 2'-O-dimetylo adenozyna występująca jako pierwszy transkrybowany nukleotyd (Rysunek 48)⁸.



Rysunek 48. Wpływ trinukleotydowych analogów kapu na proces syntezy i translacji mRNA. **A**. Uproszczony schemat syntezy trinukleotydowych analogów kapu; **B**. Badanie wydajności ko-transkrypcyjnego kapingu mRNA podczas reakcji *IVT*; **C**. Badanie procesu ekspresji mRNA w trzech liniach komórkowych: 3T3-L1, HeLa oraz JAWS II. Rysunek zaczerpnięty z pracy Sikorski i wsp.⁸.

Inną pracą wykorzystującą technologię trinukleotydowych analogów kapu jest praca opublikowana w 2021 roku przez Senthilvelana A. i wsp.¹⁴⁵. W pracy tej autorzy zsyntezowali nowy trinukleotydowy analog kapu posiadający modyfikację w obrębie rybozy 7-metyloguanozyny. Modyfikacja ta polegała na zastąpieniu rybozy, naturalnie występującej w nukleotydach, zablokowanym kwasem nukleinowym (*ang.* *Locked Nucleic Acid, LNA*) (Rysunek 49A). Miało to na celu zwiększenie biostabilności struktury kapu oraz mRNA zakończonego takim analogiem kapu. W pierwszej kolejności otrzymany *LNA* trinukleotydowy analog kapu (*LNA*-tricap) wykorzystano do zsyntezowania mRNA kodującego białko GFP za pomocą reakcji *IVT*. Otrzymane wydajności syntezy porównano z wydajnościami reakcji *IVT* przeprowadzonej w obecności kapu ARCA, kap1 (CleanCap) oraz reakcji *IVT* prowadzonej bez kapu (Rysunek 49B). Uzyskane wyniki wskazują, że wprowadzona modyfikacja – *LNA*-tricap, obniża wydajność syntezy mRNA względem CleanCap. Dodatkowo wydajność kapingu

mRNA dla *LNA-tricap* jest znacząco niższa niż dla CleanCap oraz ARCA (53% vs. 95% vs. 83%). Wyniki te świadczą o tym, że wprowadzona modyfikacja zaburza oddziaływanie *LNA-tricap* z polimerazą T7, wykorzystywaną w reakcji IVT do syntezy mRNA. Po przeprowadzeniu wstępnych badań *in vitro*, kolejnym krokiem wykonanym przez autorów pracy było sprawdzenie wydajności translacji mRNA modyfikowanego *LNA-tricap*. Wydajność translacji zbadano w komórkach dendrytycznych JAWS II. Co ciekawe, mRNA zakończone *LNA-tricap* ulegało translacji znacznie wydajniej (5-krotnie wydajniej) niż mRNA zakończone ARCA oraz CleanCap (Rysunek 49C). Przytoczona praca pokazuje, że modyfikacja struktury trinukleotydu analogu kapu od strony 7-metyloguanozyny istotnie wpływa na poziom ekspresji mRNA w komórkach. Wysoka wydajność translacji mRNA w komórkach może mieć przełożenie na wzmożoną ekspresję białka w żywych organizmach, co z punktu widzenia projektowania szczepionek mRNA jest bardzo istotnym czynnikiem.

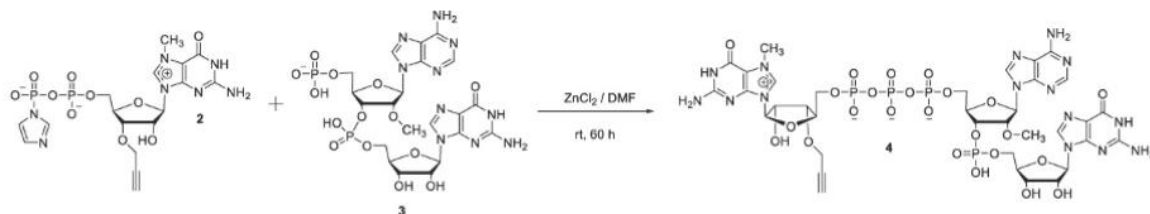


Rysunek 49. Przykład zastosowania *LNA-tricap* do badania metabolizmu mRNA. **A.** Schemat syntezy *LNA-tricap*; **B.** Porównanie wydajności syntezy mRNA w obecności kapu ARCA, *CleanCap*, *LNA-tricap* oraz bez udziału kapu; **C.** Wydajność translacji mRNA w komórkach dendrytycznych JAWS II. Rysunek zaczerpnięto z pracy Senthilvelan i wsp.¹⁴⁵.

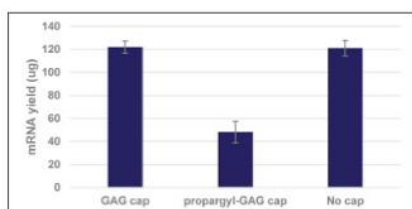
W 2023 roku ci sami autorzy opublikowali nową pracę dotyczącą modyfikacji trinukleotydu analogów kapu¹²⁰. Tym razem zsyntezowali trinukleotydu analog kapu posiadający modyfikację propargilową w obrębie rybozy 7-metyloguanozyny. Grupa propargilowa została przyłączona bezpośrednio do rybozy w pozycji 3'OH (Rysunek 50A). Grupa propargilowa została wprowadzona z myślą o wykorzystaniu trinukleotydu kapu do reakcji *click chemistry*. W pierwszej kolejności zostały zbadane podstawowe właściwości biologiczne otrzymanego kapu. Tak jak w przypadku poprzedniej pracy, autorzy zbadali wpływ modyfikacji na wydajność reakcji IVT, wydajność kapingu mRNA oraz wydajność ekspresji kapowanego mRNA. Trinukleotydu analog kapu z ugrupowaniem propargilowym obniżył

wydajność reakcji *IVT* o połowę, względem niemodyfikowanego trinukleotyduowego kapu (CleanCap). Ko-transkrypcyjna wydajność kapingu mRNA była również niższa. Modyfikowany grupą propargilową analog kapu wbudowywał się do mRNA z wydajnością 76%, podczas gdy wydajność kapingu mRNA niemodyfikowanym trinukleotyduowym kapem wynosiła 95% (Rysunek 50B). Pomimo że propargilowy analog kapu wbudowywał się mniej wydajnie do mRNA, to ostatecznie mRNA zakończone tym analogiem kapu, ulegało ekspresji 1.3-razy wydajniej niż mRNA zakończone CleanCap (Rysunek 50C)¹²⁰.

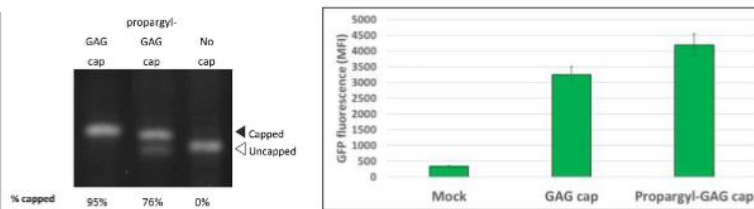
A



B

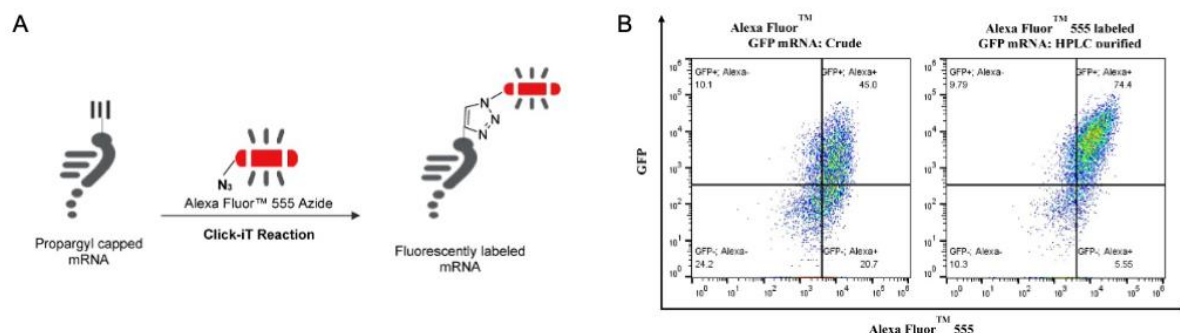


C



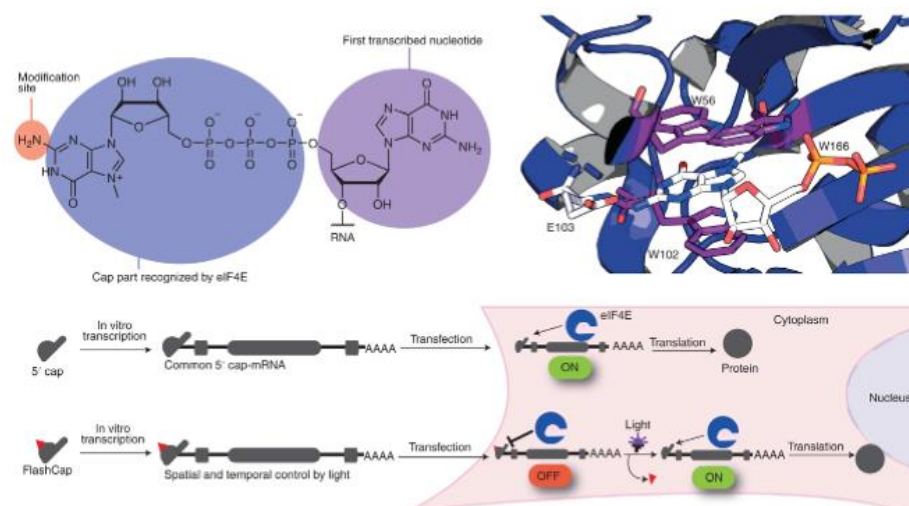
Rysunek 50. Synteza oraz zastosowanie trinukleotyduowego analogu kapu do badania metabolizmu mRNA. **A.** Schemat syntezy; **B.** Badanie wpływu modyfikacji propargilowej na wydajność reakcji *IVT* oraz wydajność kapingu mRNA; **C.** Badanie translacji mRNA w linii komórkowej A549. Rysunek zaczerpnięto z pracy Senthilvelan i wsp.¹²⁰.

Najważniejszą cechą trinukleotyduowego analogu kapu zsyntezowanego przez Senthilvelan i wsp., była obecność propargilowej grupy funkcjonalnej, umożliwiającej dalsze modyfikacje mRNA przy użyciu reakcji typu *click chemistry*¹²⁰. W celu sprawdzenia, czy mRNA zakończone sfunkcjonalizowanym analogiem kapu ulega dalszym reakcjom, autorzy pracy przeprowadzili reakcję *click chemistry* pomiędzy mRNA a barwnikiem fluorescencyjnym posiadającym grupę azydkową. Do wyznakowania mRNA autorzy pracy wykorzystali komercyjnie dostępny reagent – Alexa Fluor™ 555 Picolyl Azide. Wyznakowane fluorescencyjnie mRNA zostało wykorzystane do śledzenia stabilności mRNA i jego właściwości translacyjnych w komórkach A549 (Rysunek 51A,B)¹²⁰.



Rysunek 51. Przykład zastosowania sfunkcjonalizowanego trinukleotydowego analogu kapu do znakowania mRNA za pomocą znaczników fluorescencyjnych. **A.** Schemat reakcji znakowania mRNA przy użyciu reagenta - Alexa FluorTM 555 Azide; **B.** Badanie stabilności i aktywności znakowanego mRNA przy użyciu cytometrii przepływowej. Rysunek zaczerpnięto z pracy Senthilvelan i wsp.¹²⁰.

Trinukleotydowe analogi kapu (w tym CleanCap) są obecnie najbardziej zaawansowaną technologią wykorzystywaną do produkcji kapowanego mRNA za pomocą reakcji IVT oraz narzędzi molekularnych służących do badania procesów związanych z metabolizmem mRNA^{146, 147}. Pomimo fenomenu trinukleotydowych analogów kapu, dinukleotydowe analogi kapu są wciąż powszechnie eksplorowane pod kątem wykorzystania ich jako narzędzi molekularnych. Przykładem pracy, w której dinukleotydowe analogi kapu wykorzystano do modulowania translacji mRNA jest praca Klöcker i wsp. z 2022 roku¹⁴⁸. Autorzy tej pracy wykorzystali modyfikowane dinukleotydowe analogi kapu do kontrolowania procesu translacji przy użyciu światła. Wykorzystane analogi kapu (*FlashCaps*) posiadały modyfikacje w obrębie zasady azotowej – 7 metyloguanozyny. Zastosowanymi modyfikacjami były światłoczułe grupy funkcyjne – grupy zabezpieczające, które w wyniku działania na nie światłem o odpowiedniej długości, mogły zostać usunięte ze struktury kapu (Rysunek 52). Wprowadzenie tych grup w obrębie 7-metyloguanozyny powodowało zawadę sterczyną, która uniemożliwiała związanie końca 5' mRNA przez białko eIF4E, inicjujące proces translacji mRNA. Usunięcie światłoczułej grupy funkcyjnej ze struktury kapu, przywracało jego naturalną strukturę, co z kolei umożliwiało związanie końca 5' mRNA przez białko eIF4E (Rysunek 52).



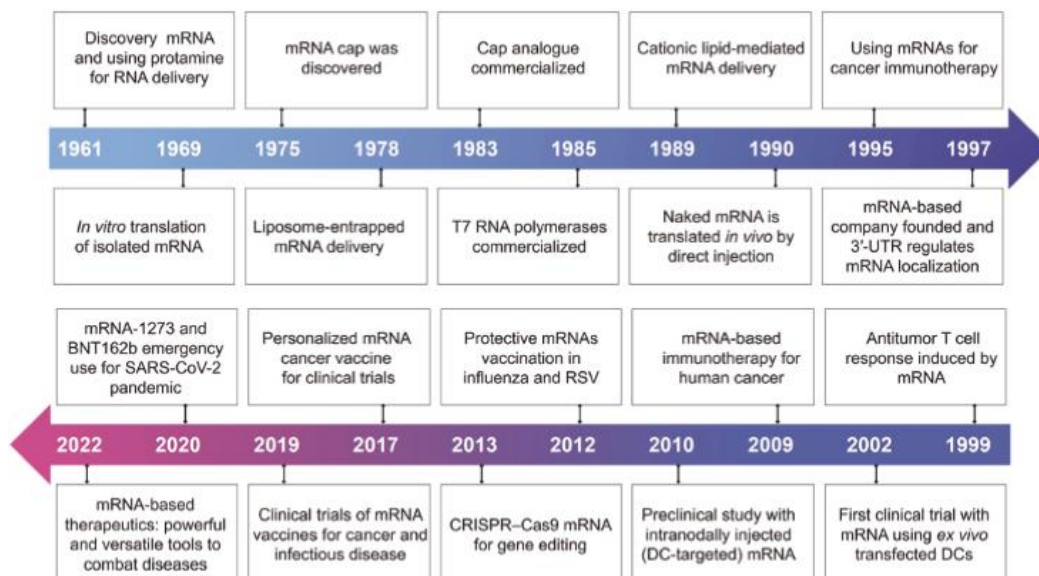
Rysunek 52. Ilustracja przedstawiająca koncepcję wykorzystania *FlashCaps* do modulowania translacji mRNA przy użyciu światła. Rysunek zaczerpnięto z pracy Klöcker i wsp.¹⁴⁸

Autorzy pracy pokazali, że *FlashCaps* mogą być stosowane z powszechnymi technikami biologii molekularnej wykorzystywanej do syntezy mRNA. W swojej pracy pokazali, że mRNA zakończone *FlashCaps* nie jest aktywne translacyjnie do czasu „uwolnienia” go przy użyciu światła. Zaletą *FlashCaps*-mRNA jest to, że powstałe mRNA nie jest immunogenne oraz nie posiada trwałych zmian w swojej sekwencji¹⁴⁸. Technologia opracowana przez Klöcker i wsp. jest jednym z przykładów zastosowania dinukleotydowych analogów kapu pozwalającym efektywnie kontrolować ekspresję egzogennej mRNA, co może być wykorzystane w kolejnych generacjach terapeutyków wykorzystujących kwasy nukleinowe.

II.11 Terapeutyczne mRNA – przyszłość terapii przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych

Od przeszło 50 lat analogi nukleozydów i nukleotydów są stosowane w terapiach pacjentów z nowotworami lub chorobami wirusowymi^{91, 149}. Obecnie jednak największą nadzieję pokłada się w terapiach wykorzystujących mRNA. Wybuch pandemii koronawirusa w 2019 roku znacznie przyspieszył rozwój szczepionek wykorzystujących technologię mRNA, jednak badania dotyczące mRNA oraz jego zastosowania w terapiach rozpoczęto pod koniec XX wieku. Rozwój technologii mRNA można podzielić na trzy główne etapy, którym towarzyszyły przełomowe badania z dziedziny mRNA. Pierwszy etap rozwoju terapeutycznego mRNA trwał do 1990 roku. W tym czasie opracowano syntezę mRNA w warunkach *in vitro* oraz podjęto pierwsze próby wprowadzania mRNA do wnętrza komórek. Drugi etap, trwający aż do 2019 roku, skupiał się na próbach wykorzystania mRNA do badań mających na celu zgromadzeniu wiedzy na temat mRNA oraz wykorzystaniu go w terapiach przeciwnowotworowych oraz przeciwwirusowych. Trzeci etap rozwoju technologii mRNA trwa obecnie i rozpoczął się wraz z dopuszczeniem na rynek szczepionek

mRNA przeciw SARS-CoV-2, które jednocześnie są pierwszymi dopuszczonymi do stosowania terapiami na bazie mRNA (Rysunek 53)¹⁵⁰.



Rysunek 53. Oś czasu z kluczowymi odkryciami przyczyniającymi się do rozwoju technologii mRNA. Rysunek zaczerpnięto z pracy Qin i wsp.¹⁵⁰

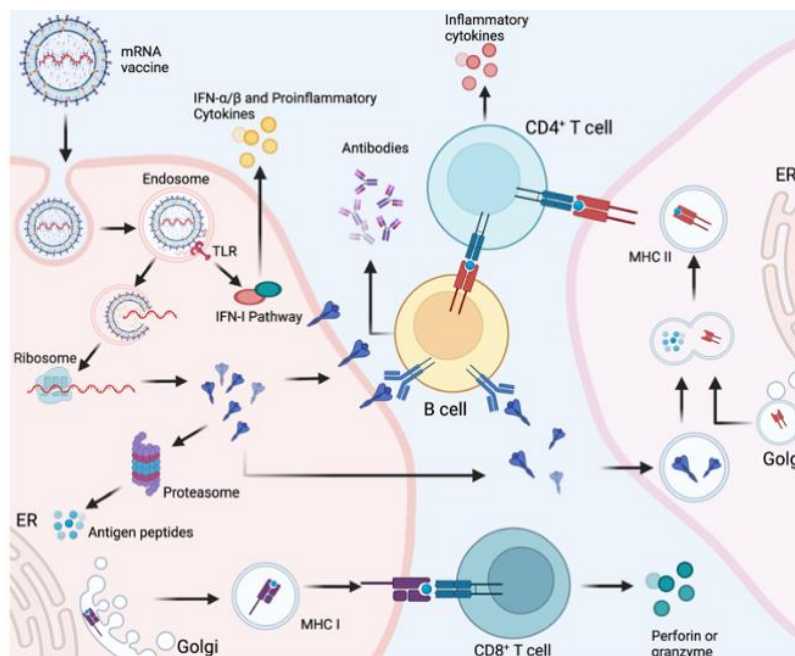
II.11.1 Rodzaje terapii wykorzystujące technologię mRNA

Technologia mRNA obecnie wykorzystywana jest w trzech obszarach terapeutycznych. Tymi obszarami terapeutycznymi są: immunoterapia, terapie zastępcze (*ang. protein replacement therapy*) oraz medycyna regeneracyjna. Technologię mRNA można również wykorzystać do edycji genomu za pomocą techniki CRISPR-Cas¹⁵¹. Ogólna zasada działania terapeutycznego mRNA jest taka sama, niezależnie od obszaru terapeutycznego. mRNA dostarczone do wnętrza komórki jest matrycą dla maszyneryi komórkowej do syntezy funkcjonalnego białka, którego sekwencja była zakodowana w sekwencji wprowadzonego mRNA. Powstałe białko jest „formą aktywną” terapeutyku, który oddziałuje na organizm pacjenta. W zależności od obszaru terapeutycznego, odpowiedź ta jest różna.

II.11.1.1 Immunoterapia mRNA

Zadaniem immunoterapii opartej o technologię mRNA jest pobudzenie układu immunologicznego organizmu. W immunoterapii mRNA, mRNA wprowadzane do wnętrza komórek zawiera sekwencję kodującą białko antygenowe. Po etapie translacji mRNA, syntezowany antygen, który następnie jest prezentowany na powierzchni komórek prezentujących antygen (*ang. Antigen-presenting cells, APC*) za pomocą cząsteczek głównego układu zgodności tkanek (*ang. Major Histocompatibility Complex, MHC*). Komórki te, pobudzają wrodzony układ immunologiczny, limfocyty T (*ang. T-cells*) do produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko danemu antygenowi (Rysunek 54). Immunoterapia mRNA skierowana jest przeciwko chorobom nowotworowym i wirusowym¹⁴⁷. Została wykorzystana w

szczepionkach mRNA przeciwko SARS-CoV-2, w których to mRNA zawierało sekwencję kodującą białka Spike znajdującego się na powierzchni koronawirusa¹⁵². Immunoterapia mRNA odnajduje również swoje zastosowanie w leczeniu chorób alergicznych wywołanych przez immunoglobulinę E (IgE)¹⁵³.



Rysunek 54. Komórkowa i humoralna odpowiedź immunologiczna indukowana za pomocą szczepionki mRNA. Rysunek zaczerpnięto z pracy Fang E. i wsp.¹⁴¹

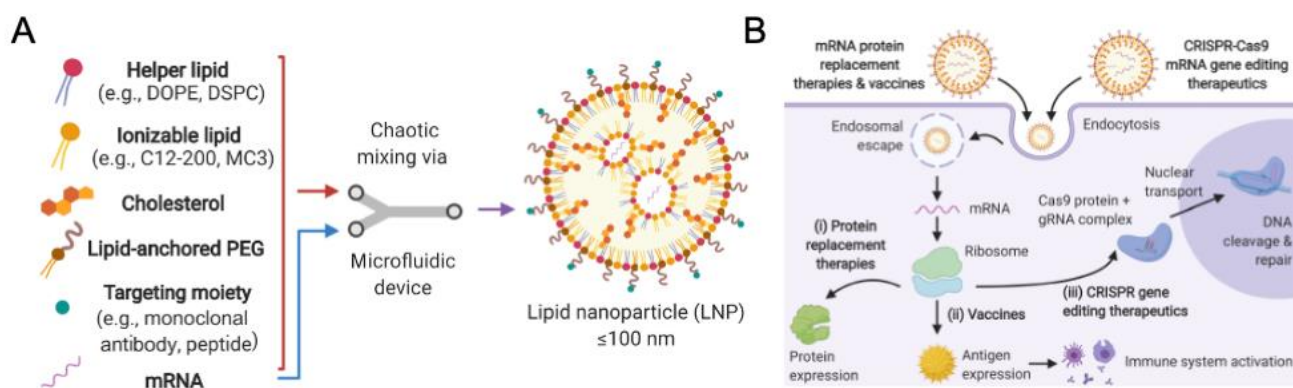
II.11.1.2 Terapia zastępcza

Poza immunoterapią, w której mRNA kodujące transkrypt wywołujący odpowiedź immunologiczną przeciwko wybranym komórkom, terapeutyczne mRNA może być wykorzystane w terapii zastępczej (*ang. protein-replacement therapy*) oraz w terapiach regeneracyjnych. Terapia zastępcza jest terapią wykorzystywaną w chorobach genetycznych, podłożem których jest wadliwa struktura białka lub brak jego występowania. W terapii zastępczej do wnętrza komórek wprowadza się mRNA kodujące białko, które z powodu choroby nie jest produkowane w komórce bądź jest wadliwe. W porównaniu do konwencjonalnych leków białkowych, stosowanych w tego typu schorzeniach, terapia mRNA jest znacznie wydajniejsza, gdyż z jednej cząsteczki mRNA powstaje więcej białka¹⁵⁴.

II.11.2 Ograniczenia terapii bazujących na technologii mRNA

Pomimo wszechstronności i wielu zastosowań terapii mRNA technologia ta posiada niestety kilka ograniczeń. Ograniczenia te wynikają głównie z samej struktury mRNA. Pierwszym poważnym ograniczeniem technologii mRNA jest brak możliwości swobodnego przenikania przez błonę komórkową do wnętrza komórek, gdzie ulega ono translacji. mRNA jest długim polimerem zbudowanym z nukleotydów połączonych ze sobą resztą fosforanową. Reszta fosforanowa jest najbardziej polarnym fragmentem mRNA, dodatkowo w

warunkach komórkowych jest ona ujemnie naładowana. Taka budowa cząsteczki mRNA uniemożliwia jej przejście przez lipidową błonę komórkową, co znaczenie utrudnia proces dostarczania terapeutycznego mRNA¹⁵⁵. Jednym z rozwiązań, umożliwiającym podanie nagiego mRNA, jest podanie go bezpośrednio w iniekcjach śródskórnych lub wewnątrz węzłowych, gdzie niedojrzałe komórki dendrytyczne mogą pobierać nagie mRNA¹⁵⁶. Innym rozwiązaniem, dającym więcej możliwości terapeutycznych, jest zastosowanie lipidowych nanocząsteczek (*ang. Lipid Nanoparticles, LNP*). LNP są zbudowane z czterech typów lipidów: lipidów kationowych (lub jonizowalnych), cholesterolu, fosfolipidów oraz glikolu polietylenowego (PEG) (*Rysunek 55A*). Dzięki swojej złożonej budowie LNP może jednocześnie zamykać polarną cząsteczkę mRNA wewnątrz nanocząsteczek oraz swobodnie przenikać przez hydrofobową błonę komórkową. Po wnikięciu do wnętrza komórki mRNA zamknięte w LNP jest z nich uwalnianie przez endosomy (*Rysunek 55B*)¹⁵⁷. Jest to obecnie najwydajniejszy i najbardziej zaawansowany system dostarczania terapeutycznych mRNA do wnętrza komórek¹⁵⁸.

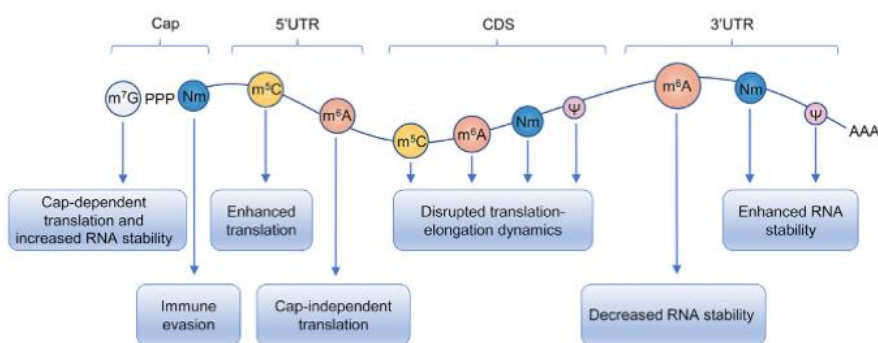


Rysunek 55. Struktura oraz mechanizm wnikania do wnętrza komórek lipidowych nanocząsteczek wraz z zamkniętym wewnątrz mRNA. A. Budowa LNP wraz z lipidami budującymi nanocząsteczkę; B. Mechanizm wnikania LNP oraz etap uwalniania mRNA w cytoplazmie. Rysunek zaczerpnięto z Swingle i wsp.¹⁵⁹.

Kolejnym ograniczeniem technologii mRNA jest stabilność mRNA wewnątrz komórki oraz jego biokompatybilność. mRNA po wnikięciu do wnętrza komórki musi ulegać procesom komórkowym, takim samym jak mRNA naturalnie występujące w komórce. W przypadku terapeutycznego mRNA kluczowym etapem jest translacja. Na wydajność produkcji białka wpływa wiele czynników, jednym z nich jest stabilność mRNA w cytoplazmie. Stabilne mRNA, które długo będzie utrzymywać się w komórce, będzie ulegać translacji dłużej, niż niestabilne transkrypty. Bezpośredni wpływ na stabilność i wydajność translacji terapeutycznego mRNA mają jego cechy strukturalne, tj. obecność i rodzaj kapu na końcu 5' mRNA, długość ogona poli(A) oraz sekwencje regionów nieulegających translacji (*ang. untranslated regions, UTRs*)¹⁶⁰.

Wprowadzanie modyfikacji, w obrębie wymienionych cech strukturalnych mRNA, można znacząco wpłynąć na właściwości biologiczne terapeutycznego mRNA. Wbudowanie na końcu 5' mRNA chemicznie modyfikowanych analogów kapu może znacząco zwiększyć

stabilność oraz wydajność translacji terapeutycznego mRNA⁷⁹. Podobne zastosowanie mają modyfikacje wprowadzone w obrębie ogona poli(A)¹⁶¹. Innym rodzajem wprowadzanych modyfikacji jest zastąpienie naturalnie występujących w sekwencji mRNA nukleotydów modyfikowanymi nukleotydami. Ogólna korzyścią takich modyfikacji jest wpływ na biokompatybilność terapeutycznego mRNA (Rysunek 56). Modyfikowane nukleotydy, znajdujące się w sekwencji terapeutycznego mRNA, obniżają immunogenność mRNA poprzez obniżenie poziomu dwuniciowego RNA (*dsRNA*), które powstaje podczas reakcji *in vitro* transkrypcji. Przykładami modyfikowanych nukleotydów używanych do syntezy terapeutycznego mRNA są *Pseudourydyna* (ψ), *N¹-metylpseudourydyna* ($m^1\psi$) czy *N⁶-metyloadenozyna* (m^6A). Wysoka immunogenność niemodyfikowanego mRNA aktywuje wrodzony układ immunologiczny, co skutkuje przedwczesną degradacją terapeutycznego mRNA⁷⁰.

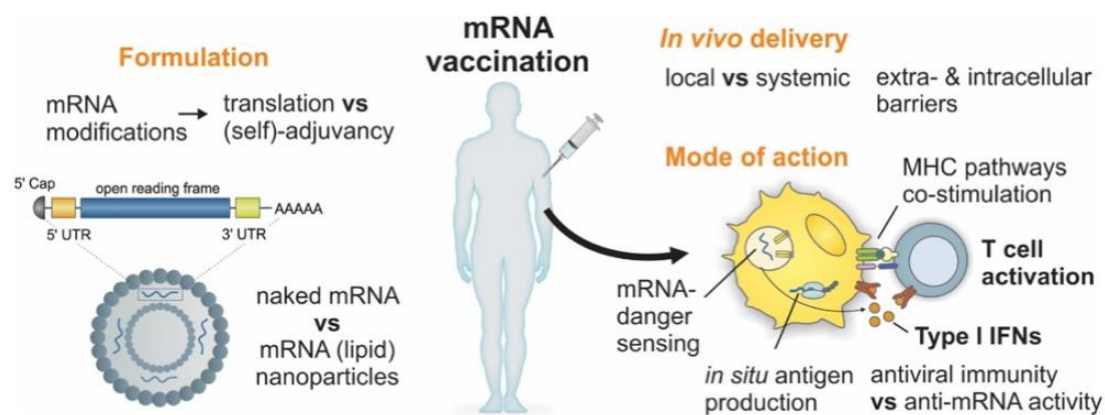


Rysunek 56. Syntetycznie modyfikowane terapeutyczne mRNA. Wpływ modyfikacji na stabilności i biokompatybilność mRNA. Rysunek zaczerpnięto z pracy Gao i wsp.¹⁶²

II.12 Perspektywy rozwoju terapii mRNA

Szybki rozwój oraz dopuszczenie szczepionek mRNA na całym świecie, spowodowany pandemią SARS-Cov-2, pokazał ogromny potencjał technologii mRNA¹⁶³. Pojawienie się pierwszych szczepionek mRNA przeciwko SARS-Cov-2 sprawiło, że większość firm biotechnologicznych oraz farmaceutycznych zaczęło rozwijać technologię mRNA zarówno pod kątem szczepionek przeciwwirusowych, jak również przeciwko chorobom nowotworowym. Liczba badań klinicznych wykorzystujących technologię mRNA ciągle rośnie. Kluczowym krokiem dla rozwoju terapii mRNA było zoptymalizowanie metod dostarczania mRNA do wnętrza komórek za pomocą lipidowych nanocząsteczek. Co więcej, w literaturze pojawia się coraz więcej prac dotyczących optymalizacji syntezy mRNA oraz zwiększenia stabilności oraz translacji dostarczanych mRNA przy użyciu modyfikowanych nukleotydów. Na tę chwilę największym wyzwaniem wydaje się być optymalizacja procesu oczyszczania mRNA oraz obejście problemu dotyczącego immunogenności terapeutycznego mRNA, szczególnie w kontekście terapii chorób przewlekłych, które wymagają wielokrotnego podawania leku (Rysunek 57).

Wydaje się, że terapie oparte o technologię mRNA są przyszłością medycyny nie tylko pod kątem szczepionek przeciwwirusowych i nowotworowych, ale także spersonalizowanych terapii ukierunkowanych na choroby genetyczne¹⁶⁴.



Rysunek 57. Rozwój terapii wykorzystujących technologię mRNA. Rysunek zaczerpnięto z pracy Verbeke i wsp.¹⁶⁵

III Badania własne

W rozdziale tym zostaną omówione wyniki uzyskane w ramach realizowanego przeze mnie projektu doktorskiego. Prowadzone przeze mnie badania były częścią dwóch dużych projektów dotyczących badania procesu degradacji jednego z metabolitów końca 5' mRNA oraz procesu translacji mRNA. W niniejszym rozdziale zostaną również opisane i przedyskutowane przeze mnie wyniki badań uzyskane przez inne osoby, których celem była ewaluacja otrzymanych przeze mnie związków lub stworzenie podwalin do ich ulepszenia. Badania te były przeprowadzone z wykorzystaniem otrzymanych przeze mnie narzędzi molekularnych i są dopełnieniem niniejszego projektu. Wyniki uzyskane przeze mnie i osoby zaangażowane w powyższe projekty stały się przedmiotem publikacji naukowych wymienionych na stronie piątej rozprawy.

III.1 Motywacja do badań

Informacyjny RNA jest jedną z najważniejszych biomolekuł biorących udział w procesie biosyntezy białka. O strukturze mRNA i procesach, w które mRNA jest zaangażowane oraz o białkach oddziałujących z mRNA wiemy bardzo dużo. Jednak mnogość zastosowań mRNA sprawia, że procesy związane z jego aktywnością są wciąż intensywnie badane. Jednym z najbardziej eksplorowanych zagadnień związanych z mRNA i jego pochodnymi jest wykorzystanie ich do celów terapeutycznych. Obecnie mRNA wykorzystywane jest do projektowania szczepionek mRNA, których zadaniem jest aktywowanie swoistego układu odpornościowego. Do zaprojektowania dobrze działającej szczepionki mRNA, konieczne jest szczegółowe poznanie procesów komórkowych, którym wprowadzone do komórki mRNA będzie podlegać. Tymi procesami są przede wszystkim translacja i degradacja mRNA. Za przebieg tych procesów odpowiedzialne są białka kap-zależne, a ich badanie jest możliwe dzięki starannie zaprojektowanym narzędziom molekularnym. Takimi narzędziami są pochodne informacyjnego RNA, w szczególności pochodne jego końca 5', czyli pochodne kapu.

W ramach mojego projektu doktorskiego zajmowałem się poszukiwaniem chemicznie modyfikowanych pochodnych struktury kapu, które mogły być wykorzystane jako narzędzia molekularne do badania procesu degradacji i translacji mRNA. Białkami, ścisłym kręgu moich zainteresowań było białko eIF4E ([rozdział I.1., 1.4.3.](#)), odpowiedzialne za proces inicjacji translacji oraz ludzka cytozolowa 5'-nukleotydaza IIIB (cN-IIIB), której substratem jest jeden z metabolitów końca 5' mRNA - m⁷GMP.

W niniejszej rozprawie doktorskiej część badań dotyczących enzymu cN-IIIB jest kontynuacją projektu rozpoczętego przeze mnie na studiach I stopnia. W ramach pracy licencjackiej

zsyntezowałem, przy użyciu chemii typu click, szereg analogów m^7GMP , które posiadały modyfikacje w obrębie reszty fosforanowej. Spośród otrzymanych przeze mnie związków, jeden okazał się selektywnym inhibitorem enzymu cN-IIIB. Wedle naszej wiedzy był to pierwszy znany inhibitor enzymu cN-IIIB. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2017 roku, a projekt dotyczący enzymu cN-IIIB był kontynuowany przeze mnie na studiach II stopnia. Dodatkowo, podczas studiów II stopnia kontynuowałem badania mające na celu znalezienie silnych i odpornych na degradację inhibitorów enzymu cN-IIIB. Wyniki badań uzyskane przeze mnie podczas studiów licencjackich i magisterskich zostaną w skrócie opisane w rozdziale III.3. Nadrzędnym celem tej części rozprawy doktorskiej było znalezienie silnych i selektywnych inhibitorów enzymu cN-IIIB i wykorzystanie ich jako narzędzi molekularnych służących do poznania roli tego w enzymu w procesie degradacji metabolitów końca 5' mRNA.

Druga część mojego projektu doktorskiego dotyczyła zaprojektowania i syntezy nowych triazolowych analogów kapu, które wykorzystano do badania procesu translacji. Triazolowe analogi kapu zostały po raz pierwszy opracowane w naszym zespole i opublikowane w 2017 roku⁸¹. Triazolowe analogi kapu są otrzymywane z wykorzystaniem chemii typu *click*, co znacznie ułatwia i przyspiesza syntezę. Niektóre z otrzymanych analogów były odporne na degradację enzymatyczną oraz wykazywały wyższe powinowactwo do białka eIF4E niż niemodyfikowany kap (m^7GpppG). Niestety badania pokazały, że triazolowe analogi kapu oparte na strukturze dinukleotydu często wbudowują się do mRNA w odwrotnej orientacji, co skutkuje otrzymaniem niefunkcjonalnego mRNA. Połączenie modyfikacji triazolowej z modyfikacją typu ARCA skutkowało znacznym obniżeniem wydajności kapingu. Pomimo niskiej wydajności kapingu, mRNA posiadające triazolowe analogi kapu typu ARCA, ulegało procesowi translacji wydajniej niż mRNA posiadające na końcu 5' niemodyfikowany kap (m^7GpppG). Badania nad triazolowymi analogami kapu były kontynuowane, a wyniki tych badań zostały opisane w publikacji w 2018 roku¹¹⁴. Przedstawiono wówczas nowe triazolowe analogi kapu, które posiadały znacznie wyższe powinowactwo do białka eIF4E niż naturalny kap (m^7GpppG). Po wbudowaniu otrzymanych analogów kapu do mRNA okazało się, że jeden z otrzymanych analogów zwiększa wydajność translacji takiego mRNA, pomimo niskiej wydajności kapingu oraz braku odporności na degradację przez enzymy hDcp2. Dostępność syntetyczna triazolowych analogów kapu oraz ich dobre właściwości biologiczne spowodowały, że stały się one interesującym obiektem do dalszych badań na procesem translacji mRNA. W celu poprawy właściwości biologicznych triazolowych analogów kapu, technologię triazolową połączyłem z technologią trinukleotydowych analogów kapu. Trinukleotydowe analogi kapu wbudowują się do mRNA z wysoką wydajnością i w poprawnej orientacji. Dodatkowo, mRNA zakończone trinukleotydowym kapem ulega translacji znacznie

wydajnej niż mRNA z dinukleotydowym kapem. Co więcej, zastosowanie technologii trinukleotydowej umożliwia wprowadzanie modyfikacji w pozycjach, których nie można modyfikować za pomocą dinukleotydów (np. w obrębie pierwszego transkrybowanego nukleotydu i wiązania fosfodiesterowego). Niestety synteza trinukleotydowych analogów kapu jest bardziej wymagająca, a proces oczyszczania może być czasochłonny. Założeniem niniejszego projektu było opracowanie metody syntezy trinukleotydowych analogów kapu z wykorzystaniem chemii typu *click*. Zastosowanie tych dwóch technologii miało na celu przyspieszenie syntezy trinukleotydowych analogów kapu przy jednoczesnym poprawieniu właściwości biologicznych triazolowych analogów kapu.

III.2 Cel badań

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza oraz ewaluacja narzędzi molekularnych do badania procesu degradacji metabolitów końca 5' mRNA oraz procesu translacji mRNA. W ramach mojego projektu doktorskiego zajmowałem się:

1. Poszukiwaniem inhibitorów ludzkiej cytozolowej 5'-nukleotydazy IIIB, w tym:

- Badaniem własności inhibitorowych benzytowych analogów 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny
- Wyznaczaniem parametru IC_{50} potencjalnych inhibitorów enzymu cN-IIIB za pomocą testu z użyciem zieleni malachitowej
- Wyznaczeniem powinowactwa (równowagowej stałej asocjacji, K_{as}) wybranych inhibitorów enzymu cN-IIIB względem białka eIF4E przy użyciu sond fluorescencyjnych
- Wyznaczaniem parametru IC_{50} dla wybranych inhibitorów enzymu cN-IIIB względem ludzkiej cytozolowej 5'-nukleotydazy IIIA
- Syntezą wyselekcjonowanych inhibitorów enzymu cN-IIIB w wersji pronukleotydów
- Badaniem właściwości inhibitorowych oraz selektywności analogów m^7GMP ulegających reakcjom typu SuFEX względem enzymu cN-IIIB

2. Badaniem wpływu modyfikacji triazolowej wprowadzonej do tri- i tetranukleotydowych analogów kapu na proces translacji mRNA, w tym:

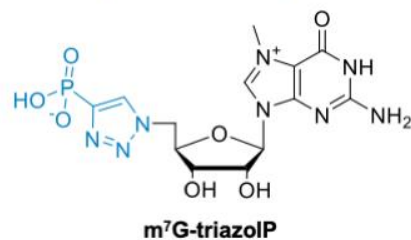
- Projektowaniem oraz syntezą tri- i tetranukleotydowych analogów kapu z wykorzystaniem chemii typu *click*
- Syntezą mRNA zawierających na końcu 5' zsyntezowane przeze mnie tri- i tetranukleotydowe analogi kapu
- Badaniem wpływu modyfikacji końca 5' mRNA na wydajność procesu transkrypcji *in vitro* oraz kapingu mRNA
- Badaniem wpływu modyfikacji końca 5' mRNA na wydajności translacji otrzymanych transkryptów w lizacie komórkowym z retikulocytów króliczych oraz w komórkach dendrytycznych JAWS II
- Syntezą nowych trinukleotydowych triazolowych analogów z modyfikacjami w obrębie zasady azotowej pierwszego transkrybowanego nukleotydu
- Wpływem zastosowanych modyfikacji zasady azotowej na wydajność translacji mRNA w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych

Uzyskane przeze mnie wyniki badań zostaną szczegółowo opisane w kolejnych rozdziałach niniejszej rozprawy doktorskiej. W poniższych rozdziałach zostaną dodatkowo przedstawione i omówione wyniki badań uzyskane przez inne osoby, które wspólnie ze mną były zaangażowane w oba projekty.

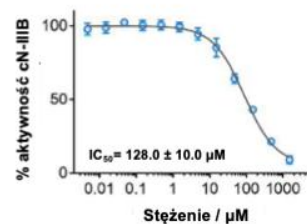
III.3 Pochodne 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny jako narzędzia służące do badania aktywności ludzkiego enzymu cN-IIIB

Poznanie roli enzymu możliwe jest dzięki odpowiednim narzędziom takim jak specyficzne inhibitory. Poszukiwanie inhibitorów enzymu, którego rola i struktura są nie do końca poznana jest czasochłonnym procesem. Jedną z metod poszukiwania inhibitorów nowo odkrytych białek jest metoda SAR (*ang. Structure-Activity Relationship*). Metoda SAR jest metodą iteracyjną, w której na podstawie wstępnych wyników badań wybiera się struktury wiodące. Struktury wiodące są modelami służącymi do projektowania nowych związków. Kluczowym etapem w metodzie SAR jest dobór odpowiednich związków budujących bibliotekę potencjalnych inhibitorów. Najczęstszym wyborem są pochodne substratów, do których chemicznie wprowadza się grupy funkcyjne potencjalnie zwiększające powinowactwo do danego enzymu. W przypadku enzymu cN-IIIB, punktem wyjściowym do projektowania jego inhibitorów była struktura substratu tego enzymu, czyli m^7GMP . W poszukiwaniu nowych inhibitorów enzymu cN-IIIB wsparciem były wyniki uzyskane w ramach pierwszej pracy autora niniejszej rozprawy, dotyczące inhibitorów enzymu cN-IIIB (Kozarski i wsp., 2018)⁵³. W przytoczonej pracy opisano strukturę pierwszego inhibitora enzymu cN-IIIB. Tym inhibitorem była pochodna 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny (m^7GMP), w której naturalnie występujące, w nukleotydach, wiązanie 5'-fosfoestrowe zostało zastąpione ugrupowaniem fosfortriazolowym – związek m^7G -triazolP ([Rysunek 58](#))⁵³. m^7G -triazolP jest mikromolarnym inhibitorem enzymu cN-IIIB. Wyznaczona wartość parametru IC_{50} wyniosła $128 \pm 10 \mu M$. Dodatkowo, m^7G -triazolP jest selektywny w kontekście innych białek rozpoznających strukturę 7-metyloguanozyny, tzn. wiąże się do nich ze stosunkowo niewielkim powinowactwem. Wartości parametrów inhibicji lub wiązania otrzymane w testach biochemicznych i biofizycznych dla DcpS ($IC_{50} = 244 \pm 39 \mu M$) i eIF4E ($K_{D,app} = 5.9 \pm 0.5 \mu M$)⁵³ były znacznie niższe w porównaniu do wartości otrzymanych dla m^7GMP (DcpS: $IC_{50} = 42.2 \pm 7.7 \mu M$, eIF4E: $K_{D,app} = 2.0 \pm 0.2 \mu M$).

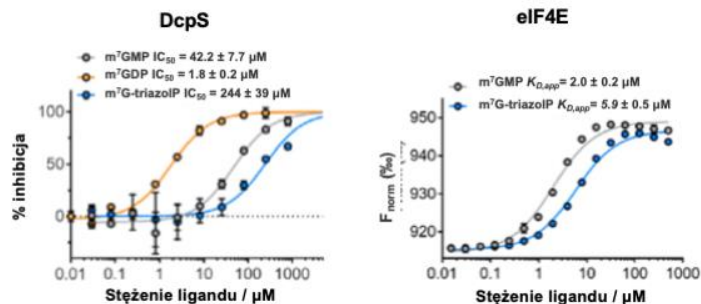
Pierwszy inhibitor enzymu cN-IIIB



Aktywność względem cN-IIIB



Selektywność inhibitora względem DcpS i eIF4E



Rysunek 58. Struktura chemiczna pierwszego inhibitora enzymu cN-IIIB oraz jego właściwości biologiczne. Rysunek przygotowany na podstawie publikacji Kozarski i wsp.⁵³

III.4 Badanie właściwości substratowych i inhibitorowych analogów 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny względem ludzkiego enzymu cNIIIB

III.4.1 Badania wstępne

Badanie właściwości substratowych i inhibitorowych ludzkiego enzymu cN-IIIB zbadano wykorzystując bibliotekę związków stworzoną przeze mnie i dr Dorotę Kubacką. Biblioteka związków wykorzystana do badania aktywności enzymu cN-IIIB składała się z ponad 40 związków pochodzenia nukleotydowego. Część związków pochodziła z zasobów Laboratorium Chemii Biologicznej i Biofizycznej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego oraz Centrum Nowych Technologii UW, pozostałe otrzymałem osobiście. Biblioteka ta zawierała zarówno naturalne nukleozydy i nukleotydy, jak i modyfikowane nukleotydy. Modyfikowanymi nukleotydami były głównie pochodne 5'-mono- oraz 5'-difosforanów 7-metyloguanozyny posiadające modyfikacje w obrębie reszty fosforanowej, rybozy oraz zasady azotowej (Rysunek 59A). W pierwszym etapie badań zbadano właściwości substratowe wybranych związków. W tym celu mierzyłem stopień hydrolizy enzymatycznej wybranych związków w obecności enzymu cN-IIIB. Stopień hydrolizy enzymatycznej był monitorowany za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z kolumną analityczną w odwróconych fazach z detekcją UV przy długości fali 254 nm. Przebieg reakcji enzymatycznej był możliwy dzięki różnicy w polarności substratu (5'-monofosforanu nukleozydu) i produktu (nukleozydu) powstałego w czasie trwania reakcji. Zbiórce wyniki

przedstawiłem w Tabeli 1 oraz na rysunku 59B. Wyniki hydrolizy przedstawiłem normalizując otrzymane wartości względem wartości otrzymanej dla m⁷GMP (dla którego względny stopień hydrolizy określiłem jako 100%). Badania potwierdziły, że bardzo dobrym substratem enzymu cN-IIIB jest, oprócz m⁷GMP (100%), 5'-monofosforan cytozyny (CMP) (169%). Enzym cN-IIIB z wysoką wydajnością hydrolizuje również 5'-monofosforan 2'-deoksytymidyny (2'-dTMP) (153%), 5'-monofosforan 2'-deoksycytydyny (2'-dCMP) (104%), a także 5'-difosforan 7-metyloguanozyny (m⁷GDP) (98%), który w pierwszej kolejności degradowany jest do m⁷GMP. Enzym cN-IIIB z niższą wydajnością, względem naturalnych substratów, hydrolizował 5'-monofosforan inozyny (IMP) (24%). Natomiast 5'-trifosforan 7-metyloguanozyny (m⁷GTP) oraz dinukleotyd m⁷GpppG, zgodnie z oczekiwaniami, nie ulegały hydrolizie enzymatycznej. W przypadku chemicznie modyfikowanych analogów m⁷GMP, wszystkie związki posiadające modyfikacje w obrębie reszty fosforanowej, z wyjątkiem wcześniej zidentyfikowanego związku (**S17**) (122%), były odporne na hydrolizę enzymatyczną przez enzym cN-IIIB lub były przez niego nierozpoznawane. Co ciekawe, to samo zjawisko zaobserwowałem w przypadku związków z modyfikacją w pozycji N7 zasady azotowej (**S19-21**). Natomiast związek (**S23**), posiadający modyfikację w pozycji N1 guanozyny był rozpoznawany przez enzym cN-IIIB jako substrat i ulegał hydrolizie (73%). Połączenie modyfikacji propargilowej w pozycji N1 z modyfikacją reszty fosforanowej sprawiło, że związek (**S24**) był odporny na hydrolizę enzymatyczną. Na tym etapie badań, uzyskane wyniki dla związku (**S24**) sugerowały, że może on być dobrym inhibitorem enzymu cN-IIIB. Prawie 60% związków posiadających modyfikacje w obrębie rybozy ulegało hydrolizie w obecności enzymu cN-IIIB. Związkami nieulegającymi hydrolizie przez enzym cN-IIIB były związki (**S29-32**). Związki te posiadały obszerne podstawniki łańcuchowe (**S29-31**) lub biotynę (**S32** pozycjach 2' lub 3' rybozy.). Tak obszerne podstawniki powodują prawdopodobnie zawadę steryczną, uniemożliwiając tym samym wiązanie do kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB. Obserwacje te sugerowały, że możliwe jest wprowadzenie niewielkich modyfikacji w obręb rybozy nie zaburzając znacząco oddziaływania z enzymem.

Kolejnym krokiem moich badań było wstępne określenie właściwości inhibitorowych zebranych w bibliotece związków. W tym celu przeprowadziłem reakcje enzymatyczne, w której monitorowano stopień przereagowania m⁷GMP w obecności enzymu cN-IIIB oraz jednego stężenia (100 μM) potencjalnego inhibitora (Rysunek 59). Do określenia właściwości inhibitorowych testowanych związków, ponownie wykorzystałem analizę przy użyciu RP HPLC. W przypadku hydrolizowanych analogów nukleozydów, za pomocą RP HPLC możliwe było obserwowanie zarówno 7-metyloguanozyny (produkt hydrolizy m⁷GMP) oraz nukleozydu powstałego w wyniku hydrolizy testowanego modyfikowanego nukleotydu. Na podstawie otrzymanych wyników wytypowałem siedem struktur wiodących (związki **S1**, **S3**, **S14**, **S18**,

S19, S20 i S21) (Rysunek 59A). Spośród wybranych związków wybrałem trzy związki, które posiadały najsilniejsze właściwości inhibitorowe. Był to odkryty przeze mnie wcześniej inhibitor enzymu cN-IIIB, związek (**S14**), w obecności którego m^7GMP ulegało hydrolizie w 35% związek (**S19**), posiadający modyfikację benzylową w pozycji N7 guanozyny, w obecności którego enzym cN-IIIB hydrolizował m^7GMP zaledwie w 23% oraz 5'-difosforan 7-benyzloguanozyny (**S20**), który hamował proces hydrolizy m^7GMP w 42% Badania wstępne dotyczące pierwszej biblioteki inhibitorów enzymu cN-IIIB zostały wykonane we współpracy z dr Dorotą Kubacką.

W celu uproszczenia analizy wyników, otrzymane wyniki zostały znormalizowane względem hydrolizy m⁷GMP przez enzym cN-IIIB, dla której przypisano 100% aktywności. Rysunek na podstawie pracy Kubacka & Kozarski i wsp.¹⁶⁶ Wartości numeryczne zebrano w Tabeli 1.

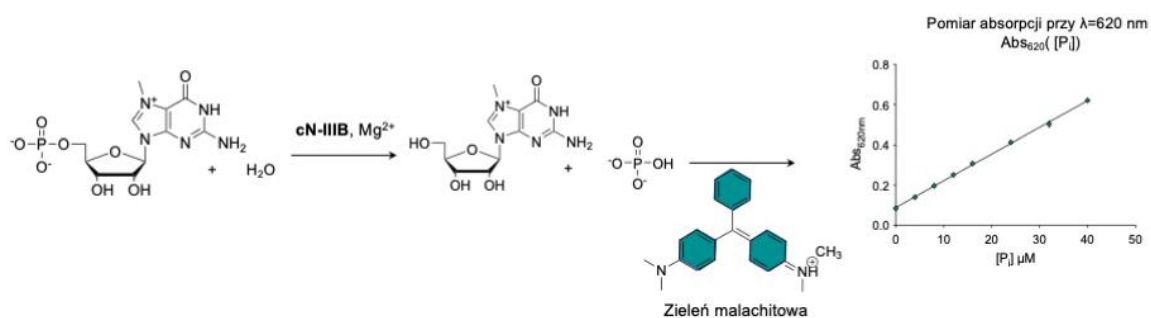
Tabela 1. Podatność na hydrolizę enzymatyczną oraz właściwości inhibitorowe względem ludzkiego enzymu cN-IIIB, ponad 40 związków pochodzenia nukleotydowego, względem ludzkiego enzymu cN-IIIB. Wyniki hydrolizy przedstawiono w %, normalizując wyniki względem m⁷GMP. Stopień inhibicji enzymu cN-IIIB odniesiono względem reakcji bez udziału inhibitora.

	Związek	Podatność na hydrolizę (%)	Inhibicja hydrolizy m ⁷ GMP przy stężeniu 100 μM (%)
	woda	0	100
Naturalne nukleotydy	m ⁷ Guo	0	93
	m ⁷ GMP	100	106
	m ⁷ GDP	98	92
	m ⁷ GTP	0	86
	m ⁷ GpppG	0	101
	5'-IMP	24	100
	5'-CMP	169	93
	2'-dCMP	104	96
	5'-TMP	153	103
Analogi m ⁷ GMP i m ⁷ GDP z modyfikacją w obrębie reszty fosforanowej	S1	0	82
	S2	0	96
	S3	0	68
	S4	0	106
	S5	0	101
	S6	0	101
	S7	0	92
	S8	0	99
	S9	0	98
	S10	0	99
	S11	0	99
	S12	0	80
	S13	0	80
	S14	0	35
	S15	0	99
	S16	0	102
	S17	122	99
	S18	0	52
Analogi m ⁷ GMP z modyfikacją w obrębie zasady azotowej	S19	0	23
	S20	0	58
	S21	0	38
	S22	0	105
	S23	73	100
	S24	0	92
	S25	0	90

Analogi m ⁷ GMP z modyfikacją w obrębie rybozy	S26	60	100
	S27	58	99
	S28	33	98
	S29	0	97
	S30	0	105
	S31	20	83
	S32	0	116

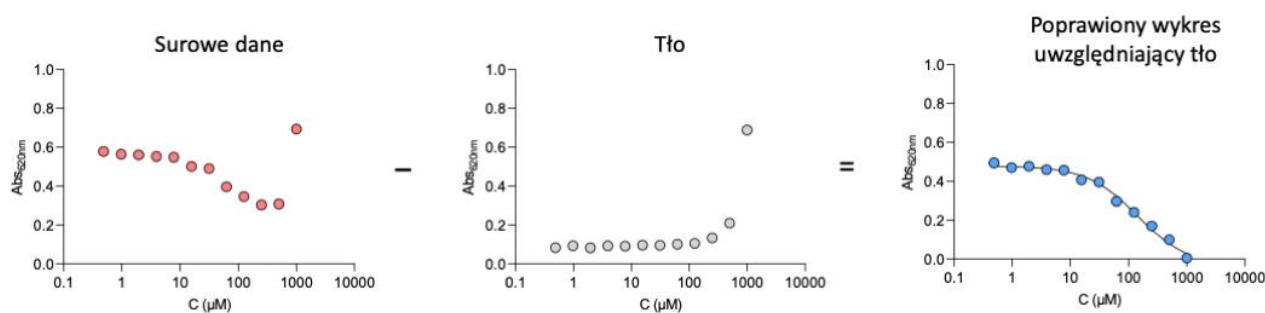
III.4.2 Badanie aktywności enzymu przy użyciu metody kolorymetrycznej – analiza zieleni malachitową

Analiza zieleni malachitową jest jedną metodą kolorymetryczną umożliwiającą detekcję nieorganicznego fosforanu. Detekcja oraz określenie stężenia nieorganicznego fosforanu jest możliwa dzięki zmianie intensywności absorpcji zieleni malachitowej, która jest spowodowana utworzeniem kompleksu z nieorganicznym fosforanem. Wzrost intensywności absorpcji zieleni malachitowej jest wprost proporcjonalny do stężenia nieorganicznego fosforanu i jest opisany zależnością liniową (Rysunek 60).



Rysunek 60. Przebieg reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym cN-IIIb monitorowany przy użyciu analizy zieleni malachitową.

Analiza zieleni malachitową jest bardzo szybką i dokładną metodą, dzięki której w krótkim czasie można wykonać analizy dla dużych bibliotek związków. Metody tej, w odróżnieniu do wcześniej opisanej analizy przy użyciu HPLC w odwróconych fazach, nie można wykorzystać w przypadku związków, które ulegają hydrolizie enzymatycznej, ponieważ uwolniony nieorganiczny fosforan uniemożliwia wyznaczenia faktycznego stopnia przereagowania m⁷GMP. Innym ograniczeniem tej metody jest niespecyficzne oddziaływanie zieleni malachitowej z badanymi związkami w wysokich stężeniach. Oddziaływanie to zaburza pomiar stężenia rzeczywistego stężenia nieorganicznego fosforanu uwolnionego podczas enzymatycznej hydroliz m⁷GMP. W celu rozwiązania tego problemu, podczas badań, przeprowadzałem dodatkowe reakcje kontrolne, obecności termicznie dezaktywowanego enzymu cN-IIIb. Pomiar reakcji kontrolnych miał na celu ustalenie poziomu tła wynikającego z oddziaływania potencjalnego inhibitora z zielenią malachitową. Wyniki tych pomiarów były odejmowane od wartości uzyskiwanych dla właściwych reakcji enzymatycznych (Rysunek 61).



Rysunek 61. Przykładowe krzywe IC₅₀ otrzymane za pomocą analizy zieleni malachitowej. Uwzględnienie poprawki wynikającej z niespecyficznego oddziaływania inhibitora z zielenią malachitową

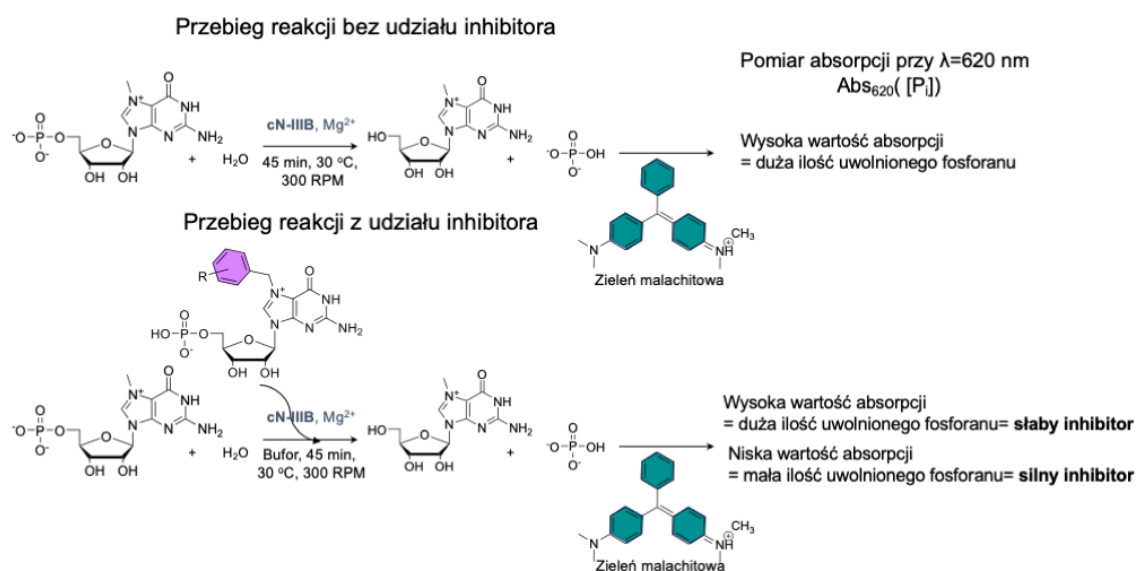
W dalszej części niniejszej rozprawy doktorskiej, analizę zieleni malachitową wykorzystywałem do badania właściwości substratowych i inhibitorowych nowo otrzymanych bibliotek związków. Metoda ta zastąpiła wcześniej opisaną metodę przy użyciu HPLC w odwróconych fazach. Analizę zieleni malachitową wykorzystałem również do wyznaczeniu potencjału inhibitorowego badanych bibliotek związków przy użyciu parametru IC₅₀ (*ang. the half maximal inhibitory concentration*). Wartość parametru IC₅₀ mówi o właściwościach inhibitorowych badanego związku. Parametr to jest zdefiniowany jako stężenie inhibitora, które jest potrzebne do zahamowania aktywności enzymu w 50%. W ogólności, im wartość parametru IC₅₀ jest niższa, tym dany związek silniej hamuje aktywność badanego enzymu. Wartości parametru IC₅₀, dla związków badanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, względem enzymu cN-IIIB badałem w obecności 80 nM enzymu cN-IIIB, 100 μM m⁷GMP oraz 12 różnych stężeń potencjalnego inhibitora. Początkowe stężenia inhibitorów były wybierane opierając się na wynikach wstępnych badaniach dotyczących właściwości inhibitorowych badanych związków. Reakcje enzymatyczne prowadziłem w roztworze buforowym: 20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl z dodatkiem 5 mM MgCl₂ w przezroczystych płytkach 96-dółkowych. Reakcje prowadziłem przez 45 min w 30 °C. Ilość uwolnionego fosforanu w reakcji była mierzona poprzez pomiaru absorpcji przy 620 nm za pomocą czytnika mikropłytek (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek), po wcześniejszym dodaniu 20 μl odczynnika z zielenią malachitową (Sigma-Aldrich, Malachite Green Phosphate Assay). Parametr IC₅₀ został obliczony w programie GraphPad Prims 9, poprzez dopasowanie modelu (krzywej) [inhibitory] vs. Response (three parameters) do zebranych danych (absorpcja przy 620 nm). Model na podstawie, którego obliczono wartości IC₅₀ opisany był równaniem:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \frac{x}{IC_{50}}} \quad (1)$$

, gdzie parametry **A**₁ i **A**₂ to odpowiednio dolne i górne plateau, **x** to stężenie inhibitora, a **y** odpowiada absorpcji przy 620 nm, które jest tożsame ze stężeniem uwolnionego fosforanu w czasie trwania reakcji.

III.4.3 Wyznaczanie wartości parametru IC_{50} dla potencjalnych inhibitorów z pierwszej biblioteki związków względem enzymu cN-IIIB

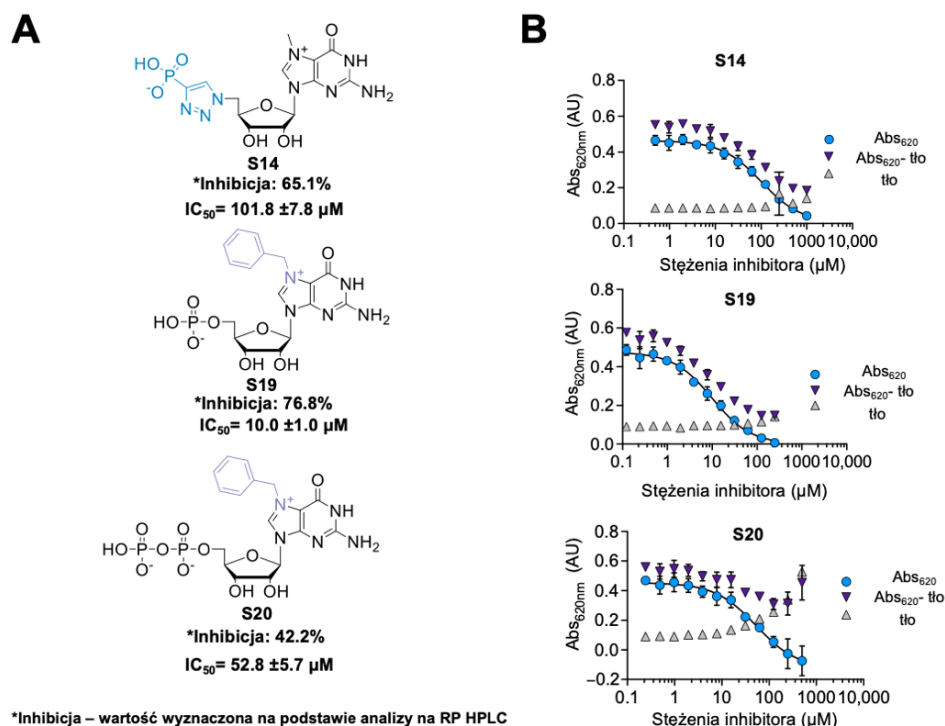
Wytypowane, na podstawie wstępnych badań, najsilniejsze znalezione inhibitory enzymu cN-IIIB (m^7G -triazolP (**S14**), Bn^7GMP (**S20**) oraz Bn^7GDP (**S20**)) wykorzystałem do dalszych badań. Kolejnym krokiem było wyznaczenie ich potencjału inhibitorowego przy użyciu parametru IC_{50} , do którego wyznaczenia wykorzystałem metodę kolorymetryczną – analizę zieleni malachitową (Rysunek 62). W celu wyznaczenia parametru IC_{50} dla związków (**S14**, **S19** oraz **S20**) (Rysunek 63A) przeprowadziłem reakcje enzymatyczne w warunkach opisanych w rozdziale III.4.2.. Jako początkowe stężenie inhibitorów ustaliłem 1 mM (kolejne rozcieńczenia inhibitorów przygotowałem metodą połowicznych rozcieńczeń). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 63B.



Rysunek 62. Przebieg reakcji enzymatycznej bez udziału oraz z udziałem inhibitora oraz sposób monitorowania reakcji enzymatycznej przy użyciu zieleni malachitowej.

Porównując wartości otrzymanych parametrów IC_{50} można stwierdzić, że najsilniejszym inhibitorem enzymu cN-IIIB był związek **S19** (Bn^7GMP). Wartość parametru IC_{50} dla związku Bn^7GMP wyniosła $10.0 \pm 1.0 \mu M$. Wartość ta jest 10-krotnie niższa niż wartość otrzymana dla wcześniej zidentyfikowanego inhibitora enzymu cN-IIIB (m^7G -triazolP), która wyniosła w tym eksperymencie $101.8 \pm 7.8 \mu M$. Z kolei wartość parametru IC_{50} dla związku **S20** wyniosła $52.8 \pm 5.7 \mu M$. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że grupa benzylowa znajdująca się w pozycji N7 guaniny, pomimo dużo rozmiaru, silnie hamuje aktywność enzymu. Co ciekawe, związek **S19**, pomimo braku modyfikacji w obrębie reszty fosforanowej, jest odporny na degradację enzymatyczną katalizowaną przez enzym cN-IIIB. Wynik ten sugeruje, że związek **S19** może być wiązany przez enzym cN-IIIB w inny sposób niż m^7GMP . Porównując wartości parametru IC_{50} związków **S19** i **S20** można przypuszczać, że dodatkowa

grupa fosforanowa, obecna w związku **S20**, zaburza wiązanie tego związku przez enzym cN-IIIB, co może być spowodowane zawadą steryczną. Jednak pomimo, potencjalnego wystąpienia zawady sterycznej, Bn⁷GDP dwukrotnie silniej hamował aktywność enzymu cN-IIIB niż związek m⁷G-triazolP. Związek m⁷G-triazolP (**S14**), Bn⁷GMP (**S19**) oraz Bn⁷GDP (**S20**) wytypowałem jako najlepsze inhibitory enzymu cN-IIIB, a ich struktury wykorzystałem do zaprojektowania nowych potencjalnych inhibitorów enzymu cN-IIIB.



Rysunek 63. A. Struktury najsilniejszych inhibitorów enzymu cN-IIIB wytypowanych z pierwszej biblioteki związków. B. Krzywe inhibicji zależności intensywności absorpcji przy 620 nm w funkcji stężenia inhibitora. Przedstawione wyniki są średnią z powtórzeń.

Tabela 2. Wartości IC₅₀ uzyskane dla najsilniejszych inhibitorów enzymu cN-IIIB z pierwszej biblioteki inhibitorów. Otrzymane wartości są średnią z trzech powtórzeń.

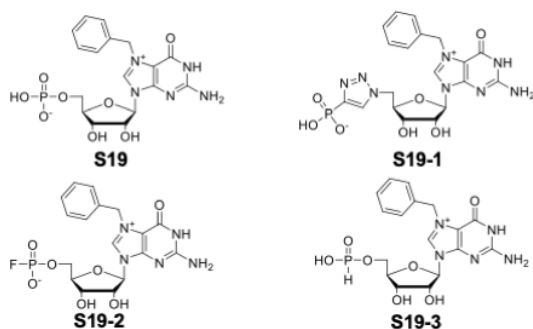
Związek	Wartość IC ₅₀ (μM)
m ⁷ G-triazolP (S14)	101.8 ± 7.8
Bn ⁷ GMP (S19)	10.0 ± 1.0
Bn ⁷ GDP (S20)	52.8 ± 5.7

III.4.4 Nowe analogii m⁷GMP jako potencjalne inhibitory enzymu cN-IIIB

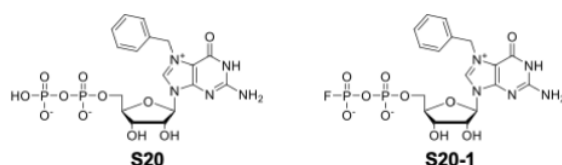
Na podstawie struktur wiodących (związki **S14**, **S19** i **S20**) zaprojektowałem i zsyntezowałem nowe analogi m⁷GMP, w których połączono modyfikację benzyłową z modyfikacjami w obrębie rybozy oraz reszty fosforanowej. Połączenie to miało na celu zwiększenie powinowactwa do kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB oraz dodatkowo uodpornienie analogów na degradację enzymatyczną. Z kolei wprowadzenie niewielkich

modyfikacji w obrębie rybozy, w pozycji 2' lub 3', dawało nadzieję na możliwość dalszych modyfikacji przy zachowaniu wysokiego powinowactwa do enzymu cN-IIIB ([Rysunek 64](#)).

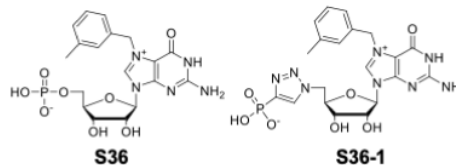
Analogi Bn⁷GMP z modyfikacją reszty fosforanowej



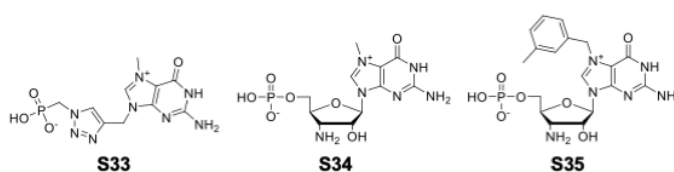
Analogi Bn⁷GDP z modyfikacją reszty fosforanowej



Nowy analog 3Me-Bn⁷GMP i jego pochodne



Nowy analog m⁷GMP z modyfikacją rybozy

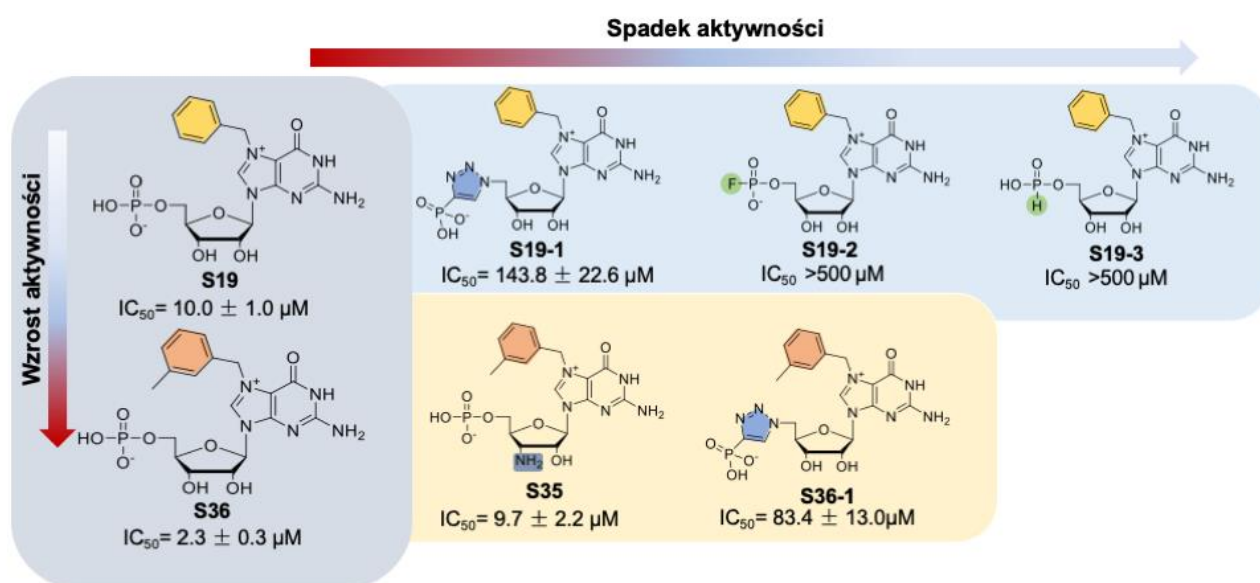


Rysunek 64. Biblioteka potencjalnych inhibitorów enzymu cN-IIIB zaprojektowanych na podstawie pierwszego screeningu analogów m⁷GMP (rozdział III.4.1.)

Nowe analogi m⁷GMP zbadano pod kątem ich właściwości substratowych i inhibitorowych. Wszystkie otrzymane związki były odporne na hydrolizę przez enzym cN-IIIB oraz większość z nich była dobrymi inhibitorami tego enzymu. Badania związków z biblioteki analogów m⁷GMP pozwoliły określić, które modyfikacje wpływają na aktywności enzymu cN-IIIB względem m⁷GMP. Benzylowe analogi m⁷GMP (Bn⁷GMP **S19-S19-3**), do których wprowadzono dodatkową modyfikację w obrębie reszty fosforanowej posiadały niższe wartości parametru IC₅₀ względem enzymu cN-IIIB niż Bn⁷GMP (**S19**). Wartość parametru IC₅₀ dla związku **S19** wyniosła 10 ± 1.0 μM podczas gdy, wartość parametru IC₅₀ wyznaczona dla związku (**S19-1**, Bn⁷G-triazolP), posiadającego dodatkową modyfikację triazolową w obrębie grupy fosforanowej, wyniosła 143.8 ± 22.6 μM. Pozostałe związki z tej rodziny związków (**S19-2** i **S19-3**) nie hamowały aktywności enzymu cN-IIIB, o czym świadczy brak lub niewielka inhibicja przy maksymalnym badanym stężeniu (500 μM). Wynik ten sugeruje, że ładunek zlokalizowany na reszcie fosforanowej jest kluczowy dla tworzenia kompleksu enzym-inhibitor ([Rysunek 64](#)). Uzyskane wyniki pokazały również, że duży wpływ na rozpoznanie inhibitorów przez enzym cN-IIIB mają grupy hydroksylowe rybozy. Zastąpienie rybozy pierścieniem triazolowym (**S33**) spowodowało, że związek nie był rozpoznawany przez enzym cN-IIIB, o czym świadczy brak inhibicji w badanych stężeniach (IC₅₀>500 μM). Z kolei zastąpienie grupy 3' hydroksylowej (3'-OH) w m⁷GMP grupą aminową (3'-NH₂) (**S34**) miało odmienny efekt. Związek z modyfikacją 3'-NH₂ (**S34**) był odporny na hydrolizę enzymatyczną przez cN-IIIB oraz istotnie hamował aktywność enzymu cN-IIIB względem m⁷GMP (**S34**, IC₅₀= 20.9 ± 3.8 μM).

Przy próbie wyjaśnienia tych obserwacji, istotny wydaje się fakt, że grupa aminowa, jest silniejszym donorem wiązania wodorowego niż grupa hydroksylowa, w szczególności w formie sprotonowanej. Prawdopodobnie utworzenie dodatkowego wiązania wodorowego zmieniło ułożenie związku (**S34**) w kieszeni wiążącej białka cN-IIIB odciągając tym samym, grupę fosforanową od miejsca katalicznego. Największą aktywność inhibitorową względem enzymu cN-IIIB wykazał związek (**S36**), w którym zastąpienie grupy N7 benzylowej grupą N7-(3-metylo)benzylową spowodowało znaczne zwiększenie aktywności względem enzymu cN-IIIB. Wartość parametru IC_{50} dla związku (**S36**) wyniosła $2.3 \pm 0.3 \mu M$ i była prawie 60-krotnie niższa niż ta dla pierwszego inhibitora enzymu cN-IIIB (m^7G -triazolP, $IC_{50} = 101.8 \pm 7.8 \mu M$). Połączenie modyfikacji N7-(3-metylobenzylowej) z dodatkową modyfikacją w obrębie reszty fosforanowej (modyfikacją triazolową) w związku (**S36-1**, 3Me-Bn⁷G-triazolP) pod wartość parametru IC_{50} do $83.4 \pm 13.0 \mu M$. Wynik ten jest tożsamy z wynikiem uzyskanym dla związku Bn⁷G-triazolP (**S19-1**), dla którego wartość IC_{50} wzrosła względem związku Bn⁷GMP (związek bez modyfikacji w obrębie fosforanu). Wyniki ten ponownie potwierdza istotną rolę ładunku zlokalizowanego reszty fosforanowej na wiązanie do kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB.

Również połączenie modyfikacji (3-metylo)benzylowej z modyfikacją 3'-NH₂ obniżyło aktywność związku (**S35**, $IC_{50} = 9.7 \pm 2.2 \mu M$), względem związku niemodyfikowanego (**S36**), co może wynikać z faktu, że związki z modyfikacjami benzylowymi przyjmują inną konformację w kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB niż związki z grupą N7 metylową. Inna konformacja związków (**S19** i **S36**) może tłumaczyć ich odporność na degradację przez enzym cN-IIIB.



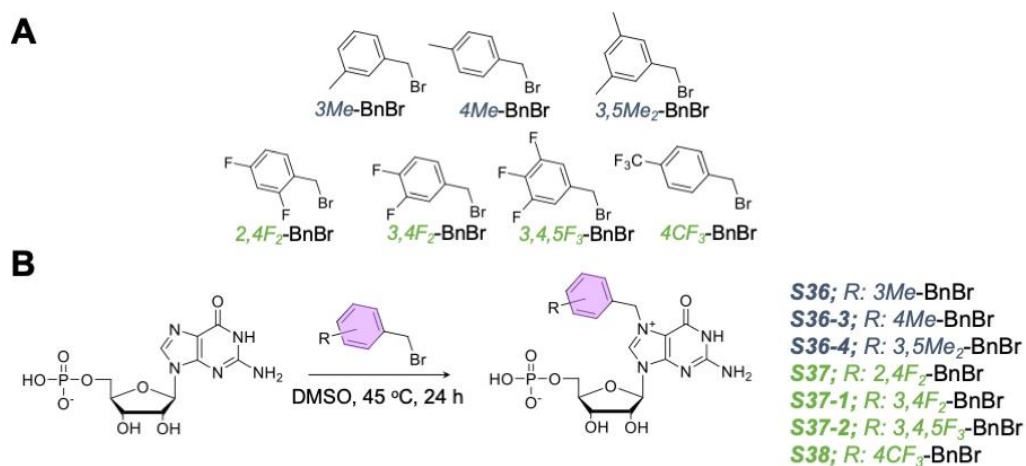
Rysunek 65. Wpływ podstawników benzylowych oraz modyfikacji reszty fosforanowej na powinowactwo do enzymu cN-IIIB.

III.4.5 Podsumowanie badań wstępnych dotyczących aktywności enzymu cN-IIIB

Wstępne badania opisane w poprzednim rozdziale dostarczyły wielu cennych informacji na temat preferencji substratowych i inhibitorowych enzymu cN-IIIB. Najistotniejszym odkryciem był wpływ podstawników w pozycji N7 guanozyny na aktywność względem enzymu cN-IIIB. Największy wpływ na wiązanie białko-ligand zaobserwowano dla podstawników benzytowych, które znacząco zwiększały potencjał inhibitorowy względem enzymu cN-IIIB. Najsilniejszym zidentyfikowanym do tego momentu inhibitorem enzymu cN-IIIB był 5'-monofosforan N7-(3-metylo)benzyloguanozyny (3-Me-Bn⁷GMP, **S36**, IC₅₀=2.3 ± 0.3 μM). Odkrycie silnego inhibitora enzymu cN-IIIB stały się motywacją do dalszych badań mających na celu odkrycie nowych, silniej hamujących aktywność enzymu cN-IIIB, pochodnych Bn⁷GMP oraz wykorzystanie tych związków jako narzędzi do badania procesów, w które enzym cN-IIIB może być zaangażowany.

III.5 Benzyłowe analogi m⁷GMP jako nowe potencjalne inhibitory enzymu cN-IIIB

Wyniki opisane w rozdziale „badania wstępne” (rozdział III.4) wskazują, że benzyłowe analogi m⁷GMP – związki Bn⁷GMP (**S19**) oraz 3Me-Bn⁷GMP (**S36**), silnie hamują aktywność enzymu cN-IIIB. Z tego powodu, w dalszym etapie badań, postanowiłem więc szerzej przyjrzeć się benzyłowym analogom m⁷GMP jako potencjalnym inhibitorom enzymu cN-IIIB. W tym celu stworzyłem nową bibliotekę analogów Bn⁷GMP. Zebrane w nowej bibliotece związki posiadały dodatkowe podstawniki w obrębie grupy benzyłowej. Podstawnikami tymi były ugrupowania metylowe, fluorowe oraz trifluorometylowe (CF₃) w różnych pozycjach pierścienia benzyłowego znajdującego się w N7 pozycji guanozyny. Zaproponowane przeze mnie związki zostały zsyntezowane w Laboratorium Chemii Biologicznej przez dr Marka Baranowskiego oraz Radosława Wójcika (Rysunek 66).

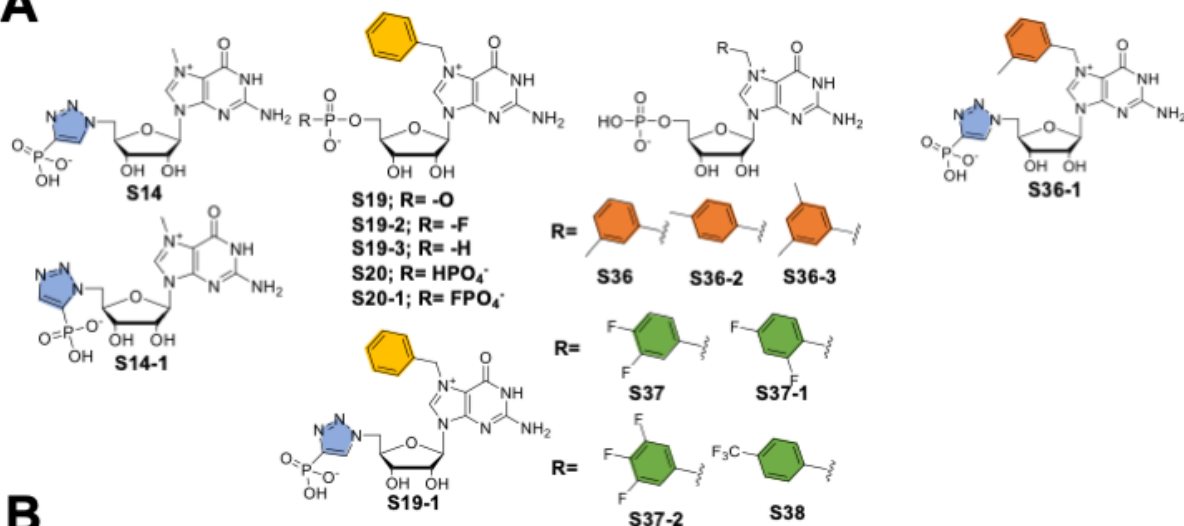


Rysunek 66. Ogólny schemat syntezy analogów Bn⁷GMP. **A.** Pochodne bromków benzyłu wykorzystane w reakcji alkilacji. **B.** Ogólny schemat syntezy.

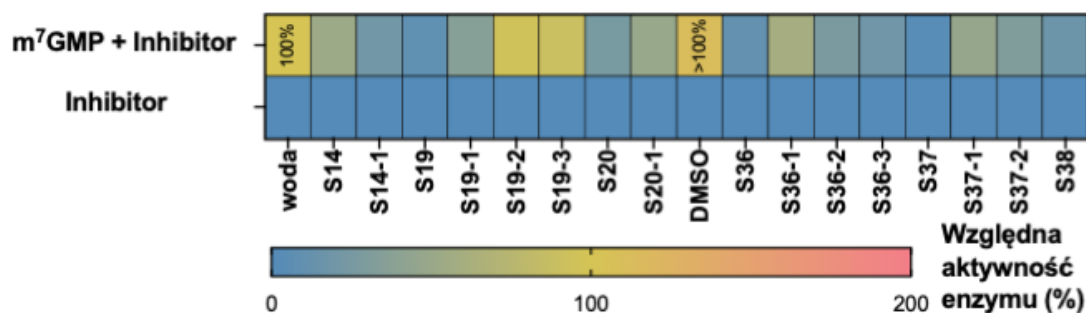
III.5.1 Właściwości substratowe oraz inhibitorowe biblioteki związków benzytowych względem enzymu cN-IIIB

Zebraną bibliotekę związków benzytowych ([Rysunek 66](#)) wykorzystałem do zbadania wpływu podstawników metylowych, fluorowych oraz CF_3 w obrębie grupy benzyłowej na oddziaływanie białko-ligand. Wstępne właściwości substratowe i inhibitorowe związków z biblioteki związków benzytowych sprawdziłem stosując analizę zielenią malachitową, zgodnie z warunkami opisanymi w [rozdziale III.4.2.](#) Uzyskane wyniki zestawilem na [rysunku 67](#) oraz [Tabeli 3](#) wraz z wynikami uzyskanymi dla związków testowanych w ramach badań wstępnych ([Rysunek 64](#), [rozdział III.4.4.](#)). W testowanych warunkach, związki z biblioteki związków benzytowych były całkowicie odporne na degradację enzymatyczną przez enzym cN-IIIB. Ponadto, wszystkie benzyłowe analogi Bn^7GMP hamowały proces degradacji m^7GMP przez enzym cN-IIIB. W przypadku związków z podstawnikami grup metylowych w obrębie pierścienia benzyłowego ($3\text{Me-Bn}^7\text{GMP}$ (**S36**), $4\text{Me-Bn}^7\text{GMP}$ (**S36-2**) oraz $3,5\text{-Me}_2\text{Bn}^7\text{GMP}$ (**S36-3**)) największą aktywność względem enzymu cN-IIIB wykazywał wcześniej zidentyfikowany związek $3\text{Me-Bn}^7\text{GMP}$. W obecności tego związku, jedynie 10% m^7GMP ulegało hydrolizie enzymatycznej. Podstawienie grupy metylowej w pozycji *para*, osłabiło właściwości inhibitorowe związku $4\text{Me-Bn}^7\text{GMP}$ (hydroliza m^7GMP 26%). Podobne właściwości inhibitorowe do związku $4\text{Me-Bn}^7\text{GMP}$ posiadał związek $3,5\text{Me}_2\text{-Bn}^7\text{GMP}$ (hydroliza m^7GMP 19%). Pośród związków posiadających podstawniki fluorowe ($3,4\text{diF-Bn}^7\text{GMP}$, $2,4\text{diF-Bn}^7\text{GMP}$ oraz $3,4,5\text{triF-Bn}^7\text{GMP}$), najlepsze właściwości inhibitorowe posiadał związek $3,4\text{diF-Bn}^7\text{GMP}$, w którego obecności m^7GMP było hydrolizowane jedynie w 2%. Co ciekawe, związek $3,4,5\text{triF-Bn}^7\text{GMP}$, posiadający aż 3 grupy fluorowe w obrębie pierścienia benzyłowego mogące tworzyć zawadę steryczną, hamował aktywność cN-IIIB silniej niż $2,4\text{diF-Bn}^7\text{GMP}$. Potencjalnie dobrym inhibitorem enzymu cN-IIIB okazał się być związek $4\text{CF}_3\text{-Bn}^7\text{GMP}$ (**S38**), posiadający w pozycji *para* pierścienia benzyłowego spory podstawnik trifluorometylowy. W zastosowanych warunkach względna aktywność enzymu wyniosła 17%.

A



B



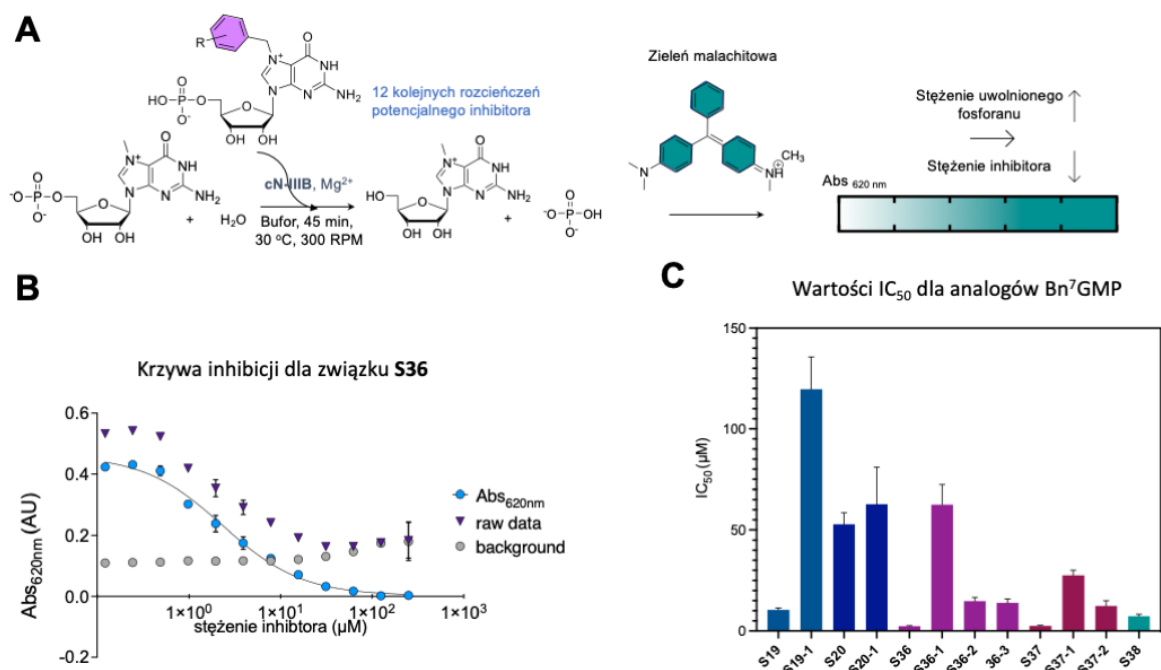
Rysunek 67. A. Biblioteka nowych potencjalnych inhibitorów enzymu cN-IIIb wraz z biblioteką II generacji związków (rozdział III.4.4.). B. Właściwości substratowe i inhibitorowe testowanych związków zmierzone przy użyciu analizy zieleni malachitową

Tabela 3. Podatność na hydrolizę enzymatyczną związków z biblioteki benzytowych analogów Bn⁷GMP oraz ich właściwości inhibitorowe względem enzymu cN-IIIb.

	Związek	Podatność na hydrolizę (%)	Inhibicja hydrolizy m ⁷ GMP przy stężeniu 100 μM (%)
Związki zbadane w ramach badań wstępnych	m ⁷ G-triazolP (1,4) (S14)	0	52
	m ⁷ G-triazolP (1,5) (S14-1)	0	20
	Bn ⁷ GMP (S19)	0	8
	Bn ⁷ G-triazolP (1,4) (S19-1)	0	59
	Bn ⁷ GMPF (S19-2)	0	94
	Bn ⁷ GMPH (S19-3)	0	89
	Bn ⁷ GDP (S20)	0	25
	Bn ⁷ GDPF (S20-1)	0	49
Nowe analogi Bn ⁷ GMP	3-Me-Bn ⁷ GMP (S36)	0	10
	3-Me-Bn ⁷ G-triazolP (S36-1)	0	36
	4-Me-Bn ⁷ GMP (S36-2)	0	26
	3,5-Me ₂ -Bn ⁷ GMP (S36-3)	0	19
	3,4diF-Bn ⁷ GMP (S37)	0	2

2,4diF-Bn ⁷ GMP (S37-1)	0	47
3,4,5triF-Bn ⁷ GMP (S37-2)	0	31
4CF ₃ -Bn ⁷ GMP (S38)	0	17

Kolejnym krokiem pozwalającym wyłonić z biblioteki benzytowych związków najsilniejsze inhibitory enzymu cN-IIIB było wyznaczenie parametru IC₅₀. Parametr wyznaczyłem zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.4.2.. Na podstawie uzyskanych wartości parametru IC₅₀ dla analogów Bn⁷GMP (Rysunek 68) można wyciągnąć kilka wniosków dotyczących preferencji enzymu cN-IIIB.). Otrzymane wyniki zebrałem w Tabeli 4. Porównując otrzymane wartości parametru IC₅₀ możliwe jest określenie wpływu podstawników metylowych, fluorowych i trifluorometylowych, znajdujących się w obrębie pierścienia benzyłowego, na powinowactwo danego związku do enzymu cN-IIIB. W przypadku analogów Bn⁷GMP z podstawnikiem metylobenzyłowym, najlepszymi właściwościami inhibitorowymi cechował się związek (**S36**), posiadający grupę metylową w pozycji *meta*. Wartość parametru IC₅₀ dla tego związku wynosiła 2.32 ± 0.31 μM i była ona prawie 5-krotnie niższa niż dla związku (Bn⁷GMP, **S19**), który nie posiadał dodatkowych podstawników w obrębie grupy benzyłowej. Z kolei, podstawienie grupy metylowej w pozycji *para* (4Me-Bn⁷GMP, **S36-2**) zmniejsza powinowactwo do enzymu cN-IIIB. Wyznaczona wartość parametru IC₅₀ dla (4Me-Bn⁷GMP, **S36-2**) wyniosła 14.28 ± 1.81 μM. Efekt zmniejszania powinowactwa do enzymu cN-IIIB zaobserwowałem również w przypadku podstawienie pierścienia benzyłowego dwoma grupami metylowymi w pozycjach *meta* (pozycje 3,5) (3,5Me₂-Bn⁷GMP, **S36-3**). Spośród związków posiadających modyfikację fluorobenzyłową najlepszymi właściwościami inhibitorowymi cechował się związek (3,4diF-Bn⁷GMP, **S37**), którego wyznaczona wartość IC₅₀ wyniosła 2.54 ± 0.24 μM. Wartość ta jest porównywalna z wartością parametru IC₅₀ wyznaczoną dla 3Me-Bn⁷GMP (**S36**). Podstawienie atomów fluoru w pozycjach *orto* i *para* (pozycje 2,4) (**S37-2**) oraz *orto*, *meta* i *para* (pozycje 3,4,5) zmniejsza powinowactwo do kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB. Wyznaczone parametry IC₅₀ dla związków (**S37-1** i **37-2**) wyniosły kolejno 27.6 ± 2.5 μM oraz 12.7 ± 2.6 μM. Co ciekawe, podstawianie pierścienia grupą trifluorometylową w pozycji *para* (**S38**) powoduje zwiększenie powinowactwa (**S38**) do enzymu cN-IIIB. Wyznaczona wartość parametru IC₅₀ dla związku (**S38**) wyniosła 7.3 ± 0.9 μM, co czyni go trzecim najsilniejszym inhibitorem enzymu cN-IIIB. Zwiększenie powinowactwa związku (**S38**), do enzymu cN-IIIB, względem związków **S37-1**, **S37-2** może być spowodowane inny rozkładem ładunku w obrębie grupy benzyłowej.



Rysunek 68. Wyznaczanie wartości parametru IC_{50} dla benzytowych analogów m^7GMP . **A.** Ogólny zarys przeprowadzonego eksperymentu. **B.** Przykładowa krzywa inhibicji otrzymana dla związku **S36**. Na wykresie zestawiono pomiary absorpcji dla surowych danych (fioletowe dane), tła (dane szare) - dane zebrane dla reakcji, do których dodano zdeaktywowany termicznie enzym, oraz właściwe dane uwzględniające tło (dane niebieskie) wraz z dopasowaną krzywą, której podstawie wyznaczono parametr IC_{50} . **C.** Wartości parametru IC_{50} , wyznaczone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, dla benzytowych analogów m^7GMP .

Tabela 4. Wyznaczone parametry IC_{50} dla drugiej generacji inhibitorów enzymu cN-IIIB

Związek	$IC_{50} \pm SD$ (μM)
m^7G -triazolP (1,4) (S14)	101.8 ± 7.8
Bn 7GMP (S19)	10.0 ± 1.0
3Me-Bn 7GMP (S36)	2.3 ± 0.3
3Me-Bn 7G -triazolP (S36-1)	89 ± 27
4Me-Bn 7GMP (S36-2)	14.3 ± 1.8
3,5Me $_2$ -Bn 7GMP (S36-3)	13.9 ± 2.0
3,4diF-Bn 7GMP (S37)	2.5 ± 0.2
2,4diF-Bn 7GMP (S37-1)	27.6 ± 2.6
3,4,5triF-Bn 7GMP (S37-2)	12.3 ± 2.6
4CF $_3$ -Bn 7GMP (S38)	7.3 ± 0.9

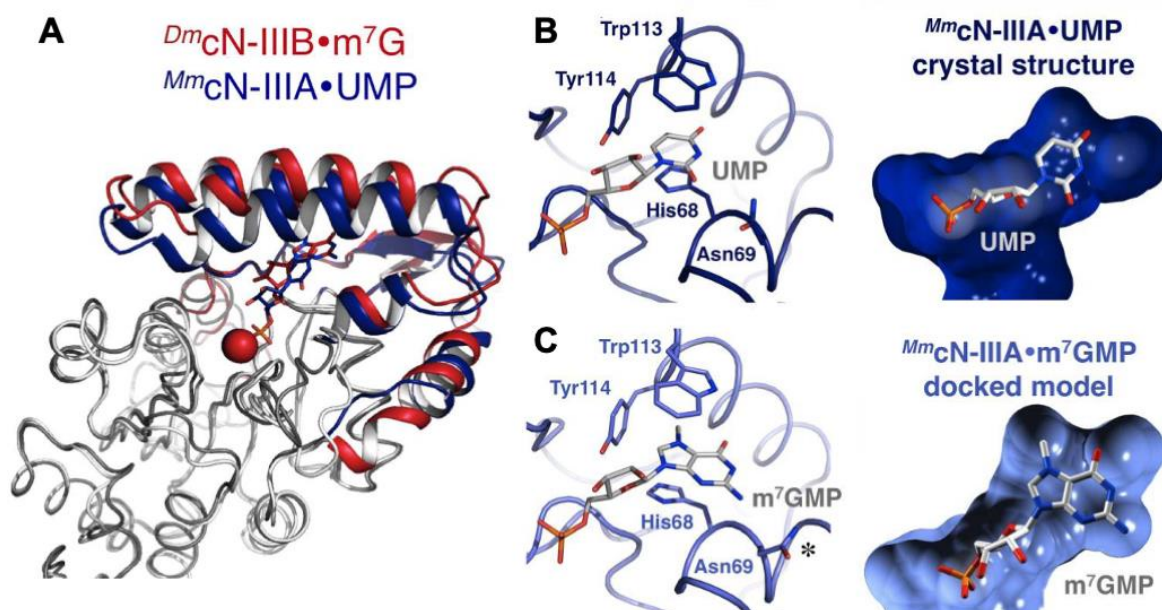
Wprowadzenie podstawników metylowych powoduje zwiększenie hydrofobowości całego pierścienia benzyłowego, co umożliwia powstanie nowych oddziaływań. Jednocześnie, grupa metylowa, w zależności od miejsca podstawienia, może tworzyć zawadę steryczną utrudniającą utworzenie kompleksu białko-ligand. Utworzenie zawady sterycznej może tłumaczyć 7-krotne zwiększenie wartości parametru IC_{50} dla związku 4Me-Bn 7GMP (**S36-2**, $14.3 \pm 1.8 \mu M$) w porównaniu do wartości IC_{50} uzyskanej dla związku 3Me-Bn 7GMP (**S36**, $2.3 \pm 0.3 \mu M$). Podstawniki fluorowe i trifluorometylowe również mogą tworzyć zawady steryczne, zwłaszcza większa grupa trifluorometylowa, utrudniające wiązanie się ich do kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB. W odróżnieniu do grup metylowych, podstawniki fluorowe i trifluorometylowe

nie zwiększają hydrofobowość pierścienia benzyłowego. Natomiast są podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony z pierścienia benzyłowego. Zmieniając rozkład gęstości elektronowej podstawionego pierścienia benzyłowego, powodując zmianę kierunku całkowitego momentu kwadropolowego. Zmiana kierunku całkowitego momentu kwadropolowego sprawia, że pierścień benzyłowy staje się obszarem ubogim w elektrony, co w ogólności sprzyja silniejszemu oddziaływaniu warstwowemu z aminokwasami aromatycznymi¹⁶⁷. Ze struktury krystalograficznej enzymu cN-IIIB pochodzącego z muszki owocówki wynika, że enzym ten w swojej kieszeni wiążącej posiada trzy aminokwasy aromatyczne (dwie reszty tryptofanowe oraz jedną resztę histydynową), która mogą oddziaływać warstwowo z podstawionym pierścieniem benzyłowym. Otrzymane wyniki sugerują, że enzym cN-IIIB preferuje związki z grupą benzyłową ubogą w elektrony, o czym świadczy spadek wartości IC_{50} dla związku 3,4diF-Bn⁷GMP ($2.5 \pm 0.2 \mu M$) w porównaniu do Bn⁷GMP ($10.0 \pm 1.0 \mu M$). Wpływ na oddziaływanie białko-ligand ma również miejsce wprowadzenie podstawnika w obrębie pierścienia benzyłowego (pozycja *orto*, *para* lub *meta*). Najbardziej korzystną pozycją, powodującą zwiększenie powinowactwa do enzymu cN-IIIB była pozycja *meta*, w przypadku podstawników metylowych oraz *meta* i *para* w przypadku podstawników fluorowych i trifluorometylowych. Na podstawie wyników uzyskanych dla związków z podstawnikami fluorowymi, można zauważyć, że dodatkowe podstawienie fluoru w pozycji *orto* pierścienia benzyłowego (związek 2,4diF-Bn⁷GMP) wpływa negatywnie na oddziaływanie z enzymem cN-IIIB, co może być spowodowane wcześniej wspomnianą zawadą steryczną. Na podstawie uzyskanych wyników wytypowałem trzy inhibitory enzymu cN-IIIB. Były to związek (**S36**) posiadający podstawnik metylowy w pozycji *meta* pierścienia benzyłowego, związek (**S37**) posiadający dwa podstawniki fluorowe w pozycjach *meta* i *para*, a także związek (**S38**) z grupą trifluorometylową w pozycji *para* pierścienia benzyłowego. Otrzymane wartości parametru IC_{50} było około 50-krotnie niższe, w przypadku związków (**S36** i **S38**) i około 15-krotnie niższe w przypadku związku (**S38**) niż dla pierwszego zidentyfikowanego inhibitora enzymu cN-IIIB (związek **S14**). Benzyłowe analogi m⁷GMP wykorzystałem do dalszych badań, których wyniki zostały opisane w kolejnych rozdziałach tej rozprawy.

III.5.2 Selektywność inhibitorów enzymu cN-IIIB

Podczas poszukiwania inhibitorów danego enzymu, szczególną uwagę zwraca się na powinowactwo danego związku do badanego enzymu. Tak jak zostało to opisane w [rozdziale III.4.2.](#), jednym z parametrów pośrednio opisującym powinowactwo badanego inhibitora do danego enzymu jest parametr IC_{50} . Drugim równie ważnym parametrem, opisującym własności inhibitorowe badanego związku, jest jego selektywność względem badanego białka w kontekście innych białek posiadających zbliżoną aktywność oraz specyficzność substratową do badanego enzymu. W przypadku enzymu cN-IIIB za wartę rozważenia uznałem pokrewny

enzym pochodzący z rodziny 5'-nukleotydaz – cytozolowa 5'-nukleotydazę IIIA oraz białko oddziałujące z nukleotydami 7-metyloguaninowymi – białko eIF4E oraz enzym DcpS. Enzym cN-IIIA jest homologiem enzymu cN-IIIB. Identyeczność i podobieństwo sekwencji enzymu cN-IIIB do enzymu cN-IIIA wynosi odpowiednio 59% i 80%³⁵. Enzym cN-IIIA uznawany jest za 5'-nukleotydazę pirymidynową, ponieważ jest on nieaktywny względem nukleotydów purynowych. Uważano, że kieszeń enzymu cN-IIIA jest zbyt mała, aby wiązać nukleotydy purynowe. Jednak badania strukturalne (*in silico*) opisane w pracy Monecke T. i wsp.³⁵ z 2014 roku sugerują, że enzym cN-IIIA może rozpoznawać strukturę m⁷GMP (Rysunek 69).



Rysunek 69. Struktura krystalograficzna enzymu cN-IIIA. **A.** Porównanie struktur krystalograficznych enzymu cN-IIIA i cN-IIIB. Kolorem szarym zaznaczono domenę HAD core, kolorem czerwonym domenę typu CAP enzymu cN-IIIB wraz z 7-metyloguanonyną, kolorem niebieskim domenę typu CAP enzymu cN-IIIA wraz z UMP. **B.** Zbliżenie na kieszeń wiążącą enzymu cN-IIIA wraz ze związanym UMP oraz aminokwasami biorącymi udział w wiązaniu substratu. **C.** Zbliżenie na kieszeń wiążącą enzymu cN-IIIA wraz z zadokowanym m⁷GMP oraz aminokwasami biorącymi udział w potencjalnym wiązaniu m⁷GMP. Rysunek zaczerpnięto z pracy Monecke T. i wsp.³⁵

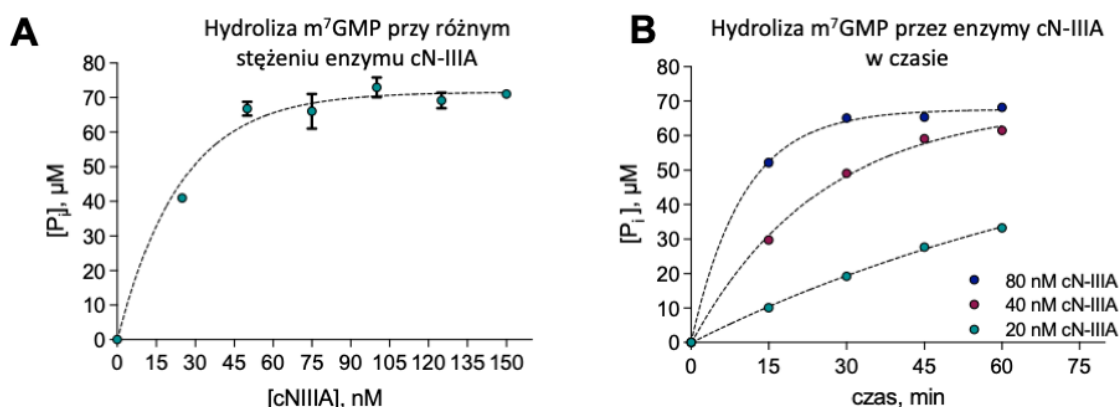
Inhibitorami enzymu cN-IIIB są pochodne m⁷GMP, co sugeruje, że mogą być one rozpoznawane przez białko eIF4E i enzym cN-IIIA. Z tego powodu zbadałem wpływ inhibitorów enzymu cN-IIIB na aktywność obu białek, sprawdzając przy tym selektywność wytypowanych inhibitorów.

III.5.2.1 Selektywność inhibitorów enzymu cN-IIIB względem enzymu cN-IIIA

W celu określenia selektywności inhibitorów enzymu cN-IIIB, zbadałem właściwości inhibitorowe wytypowanych analogów m⁷GMP (**S14**, **S19**, **S19-1**, **S20**, **S20-1**, **S36**, **S36-1-3**, **S37**, **S37-1-2**, **S38**) (Rysunek 67A). Właściwości inhibitorowe analogów m⁷GMP względem enzymu cN-IIIA określiłem poprzez wyznaczenie parametru IC₅₀. Jednak przed przystąpieniem do właściwego eksperymentu należało sprawdzić, czy enzym cN-IIIA hydrolizuje m⁷GMP. Tę część badań przeprowadziła dr Dorota Kubacka. W pierwszej kolejności zbadano aktywność enzymu cN-

IIIA względem m^7 GMP przy różnych stężeniach enzymu cN-IIIA (0, 25, 50, 75, 100, 125 i 150 nM) oraz stałym stężeniu m^7 GMP (100 μ M) (Rysunek 70A). Ilość uwolnionego fosforanu określano spektroskopowo przy użyciu analizy zielenią malachitową, tak jak to opisano w rozdziale III.4.2.. Następnie, wybrano trzy stężenie enzymu (20, 40 oraz 80 nM) i przeprowadzono eksperyment czasowy, w którym mierzona była ilość uwolnionego fosforanu w pięciu punktach czasowych (0, 15, 30, 45 i 60 min) (Rysunek 70B). Uzyskane wyniki pokazały, że enzym cN-IIIA jest aktywny względem m^7 GMP i katalizuje reakcje jego defosforylacji, co potwierdziło przypuszczenia opisane w pracy Monecke T. i wsp.³⁵.

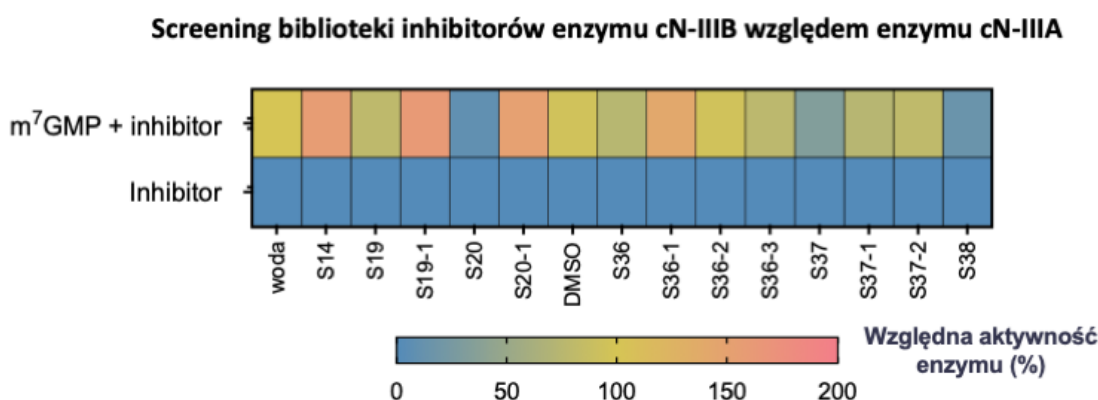
Na podstawie uzyskanych wyników ustalono warunki reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym cN-IIIA (stężenie równe 40 nM, czas reakcji 20 min). Przy ustalonym stężeniu i czasie reakcji aktywność enzymu cN-IIIA względem m^7 GMP jest porównywalna do aktywności enzymu cN-IIIB.



Rysunek 70. Optymalizacja warunków reakcji enzymatycznych dla enzymu cN-IIIA przy użyciu analizy zielenią malachitową. **A.** Aktywność enzymu cN-IIIA względem m^7 GMP przy różnych stężeniach enzymu cN-IIIA. **B.** Eksperyment czasowy. Hydroliza m^7 GMP przy trzech stężeniach enzymu cN-IIIA (20, 40 i 80 nM) w pięciu punktach czasowych (0, 15, 30, 45, 60 min).

Po zoptymalizowaniu warunków reakcji enzymatycznych, katalizowanych przez enzym cN-IIIA, przeprowadzono badania mające na celu zbadanie własności substratowych i inhibitorowych najlepszych znalezionych inhibitorów enzymu cN-IIIB (rozdział II.7.1.2.) względem enzymu cN-IIIA. W pierwszej kolejności zbadano podatność wytypowanych analogów m^7 GMP na hydrolizę enzymatyczną katalizowaną przez enzym cN-IIIA. W tym celu wytypowane analogi m^7 GMP (**S14**, **S19**, **S19-1**, **S20**, **S20-1**, **S36**, **S36-1-3**, **S37**, **S37-1-2**, **S38**) (100 μ M) inkubowano wraz z enzymem cN-IIIA (40 nM). Następnie zbadano własności inhibitorowe tych analogów (**S14**, **S19**, **S19-1**, **S20**, **S20-1**, **S36**, **S36-1-3**, **S37**, **S37-1-2**, **S38**). Własności inhibitorowe związków zbadano w analogicznych warunkach jak opisano w rozdziale III.4.2. z drobnymi modyfikacjami (stężenie enzymu cN-IIIA 40 nM, czas inkubacji 20 min). W obu eksperymentach (hydroliza i inhibicja) przebieg reakcji monitorowano spektroskopowo przy użyciu analizy zielenią malachitową (Rysunek 71).

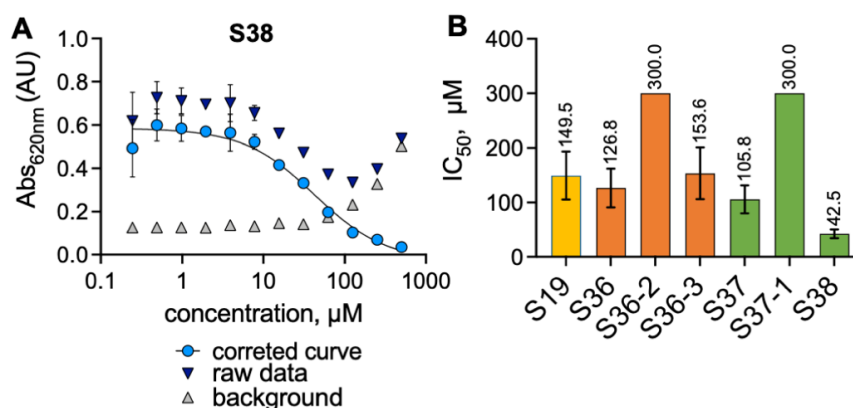
Uzyskane wyniki pokazały, że wszystkie testowane związki nie ulegały hydrolizie enzymatycznej w obecności enzymu cN-IIIA. Wyniki ten może sugerować, że zbadane związki były odporne na degradację przez enzym cN-IIIA lub nie były przez niego rozpoznawane. Druga część przeprowadzonego eksperymentu – badanie właściwości inhibitorowych wskazała, które z badanych związków hamują aktywność enzymu cN-IIIA względem m^7 GMP. Związkami o najsilniejszych właściwości inhibitorowych charakteryzowały się związki **S20** (Bn^7 GDP), **S37** (3,4- F_2Bn^7 GMP) oraz **S38** (4 CF_3 - Bn^7 GMP). Stopień przereagowania m^7 GMP (100 μ M) w obecności enzymu cN-IIIA (40 nM) oraz związków **S20**, **S37** i **S38** wynosił odpowiednio 9%, 32% i 14%. Pozostałe związki z tej biblioteki nie hamowały aktywności enzymu cN-IIIA, co sugeruje, że związki te mogą być selektywnymi inhibitorami enzymu cN-IIIB (Rysunek 71).



Rysunek 71. Badanie własności inhibitorowych i substratowych inhibitorów enzymu cN-IIIB względem enzymu cN-IIIA. Reakcje enzymatyczne przeprowadzono w roztworze buforowym 20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$. Reakcje prowadzono w obecności 40 nM enzymu cN-IIIA przez 20 min w 30 °C. Własności substratowe zbadano w obecności inhibitora 100 μ M, a własności inhibitorowe w obecności inhibitora 100 μ M oraz m^7 GMP 100 μ M. Wynik przedstawiono w postaci Heatmapy, która pokazuje względną aktywność enzymu cN-IIIA. Otrzymane wyniki znormalizowano względem reakcji enzymatycznej bez obecności inhibitora (woda) (aktywność 100%).

Na podstawie wstępnych badań trudno było ocenić selektywność badanych związków względem enzymu cN-IIIA, ponieważ przedstawiają one jedynie względną aktywność enzymu przy jednym stężeniu potencjalnego inhibitora. W celu lepszego zobrazowania właściwości inhibitorowych, badanych związków, wyznaczyłem parametr IC_{50} względem enzymu cN-IIIA. Najbardziej interesującymi związkami z punktu widzenia ich selektywności były benzytowe analogi m^7 GMP – związki (**S19**, **S36-1-3**, **S37**, **S37-1** oraz **S38**). Związki te wykazywały niską aktywność względem enzymu cN-IIIA, a tym samym najsilniej hamowały aktywność enzymu cN-IIIB (niska wartość parametru IC_{50}). Z tego powodu, do dalszych analiza wytypowałem związki (**S19**, **S36-1-3**, **S37**, **S37-1** oraz **S38**) i wyznaczyłem dla nich parametr IC_{50} . Parametr IC_{50} (cN-IIIA) dla wybranych związków wyznaczyłem używając wcześniej opisanych warunków reakcji enzymatycznej, badając aktywność enzymu przy 12 różnych stężeniach potencjalnego inhibitora. Kolejne stężenia inhibitora przygotowałem metodą połowicznych rozcieńczeń zaczynając od 1 mM w przypadku związków (**S36-2** oraz

S37-1) i 0.5 mM w przypadku związków (**S19**, **S36-1**, **S36-2**, **S37** oraz **S38**). Ilość uwolnionego fosforanu oznaczaliśmy spektroskopowo przy użyciu analizy zieleni malachitowej (tak jak to opisano w poprzednich rozdziałach niniejszej rozprawy). Wyznaczone wartości parametru IC_{50} zostały przedstawione na rysunku 71B jako średnia arytmetyczna z trzech powtórzeń.



Rysunek 72. Badania własności inhibitorowych analogów Bn^7GMP względem enzymu cN-IIIa. **A.** Przykładowa krzywa inhibicji wyznaczona dla związku **S38** wraz z dopasowaną funkcją wyznaczającą parametr IC_{50} (μM). Kolorem niebieskim zaznaczono krzywą uwzględniającą poprawkę tła; kolorem szarym zaznaczono tło (reakcja enzymatyczna z dezaktywowanym enzymem); kolorem fioletowym zaznaczono dane nieuwzględniające poprawkę tła. **B.** Wykres słupkowy przedstawiający wyznaczone wartości IC_{50} (μM) dla wszystkich analogów Bn^7GMP . Wyniki zostały przedstawione jako średnia z trzech pomiarów.

Wyznaczone parametry IC_{50} pokazały, że wytypowane analogi m^7GMP (**S19**, **S36-S36-3**, **S37**, **S37-1** oraz **S38**) są słabymi inhibitorami enzymu cN-IIIa. Dla większości związków parametr IC_{50} jest większy niż 100 μM . Wyjątkiem był związek **S38**, którego wartość parametru IC_{50} jest równa $42.5 \pm 8.2 \mu M$. Porównując jednak wartości IC_{50} otrzymane dla enzymu cN-IIIa z parametrami uzyskanymi dla enzymu cN-IIIB ([Rozdział III.5.1.](#)), można stwierdzić, że wytypowane analogi m^7GMP są selektywne względem enzymu cN-IIIB. Dla lepszego zobrazowania selektywności badanych związków, wyznaczyłem parametr SI (Selectivity Index), który jest definiowany jako iloraz wartości parametru IC_{50} (cN-IIIB) i wartości parametru IC_{50} (cN-IIIa). Wartości parametru SI dla najsilniejszych inhibitorów enzymu cN-IIIB zostały przedstawione w tabeli ([Tabela 5](#)).

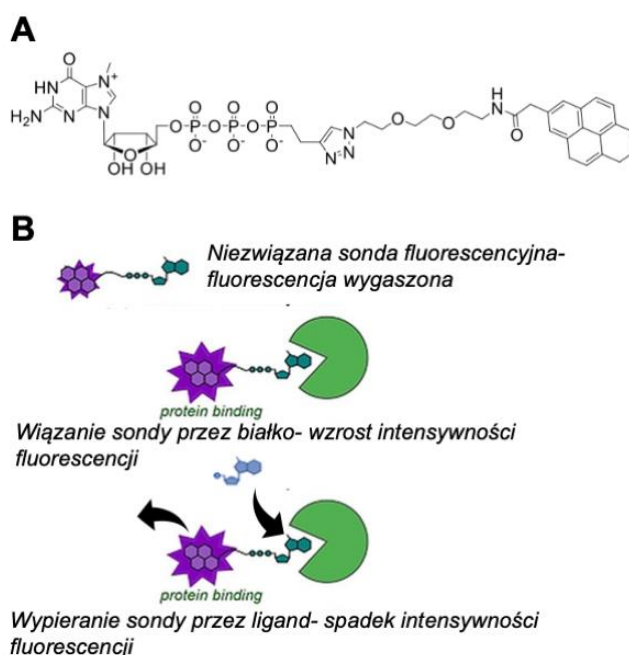
Tabela 5. Wyznaczony parametr IC_{50} dla wybranych analogów m^7GMP wraz z obliczonym SI (cN-IIIB/cN-IIIa).

Związek	$IC_{50} \pm SEM$ (μM)	SI (cN-IIIB/cN-IIIa)
Bn^7GMP (S19)	113.4 ± 38.5	0.09
3-Me- Bn^7GMP (S36)	126.8 ± 35.6	0.02
3,4-diF- Bn^7GMP (S37)	105.8 ± 26.6	0.02
4-CF ₃ - Bn^7GMP (S38)	42.5 ± 8.3	0.17

Najniższą wartość parametru SI posiadają związki **S36** i **S37**. Są to związki, które posiadają odpowiednio 3-metylobenzyl i 3,4-difluorobenzyl w pozycji N7 i zostały zidentyfikowane jako najsilniejsze inhibitory enzymu cN-IIIB. Najwyższą wartość SI (0.17) posiada związek **S38** posiadający 4-fluorometylobenzyl w pozycji N7 guanozyny. Związek **S38** charakteryzuje się również najniższym parametrem IC_{50} (cN-IIIA) i może on posłużyć razem ze związkiem **S20** jako związek wyjściowy do zaprojektowania silnych inhibitorów enzymu cN-IIIA pochodzenia nukleotydowego.

III.5.2.2 Oddziaływanie inhibitorów cN-IIIB z białkiem eIF4E

Tak jak to opisano w rozdziale II.1.8., białko eIF4E jest białkiem kap-zależnym, rozpoznającym nukleotydy 7-metyloguaninowe. Białko eIF4E rozpoznaje z niewielkim powinowactwem m^7GMP , co sugeruje, że może ono rozpoznawać również inhibitory enzymu cN-IIIB. Z tego powodu zbadałem selektywność inhibitorów enzymu cN-IIIB w kontekście białka eIF4E. W celu wyznaczenia powinowactwa inhibitorów enzymu cN-IIIB do białka eIF4E wykorzystałem opracowaną niedawno¹¹⁷ metodę fluorescencyjną, za pomocą której wyznaczyłem parametr EC_{50} (ang. *Half maximal effective concentration*) oraz stałą dysocjacji ($K_{D,app}$). Wykorzystana przeze mnie metoda jest metodą kompetencyjną, w której pochodna m^7GTP posiadająca znacznik fluorescencyjny (piren) (Rysunek 73A) jest wypierana przez ligand z kieszeni wiążącej eIF4E. Wyparcie sondy z kieszeni wiążącej białka eIF4E skutkuje spadkiem intensywności fluorescencji, która jest wygaszana przez 7-metyloguanozynę (Rysunek 73B).

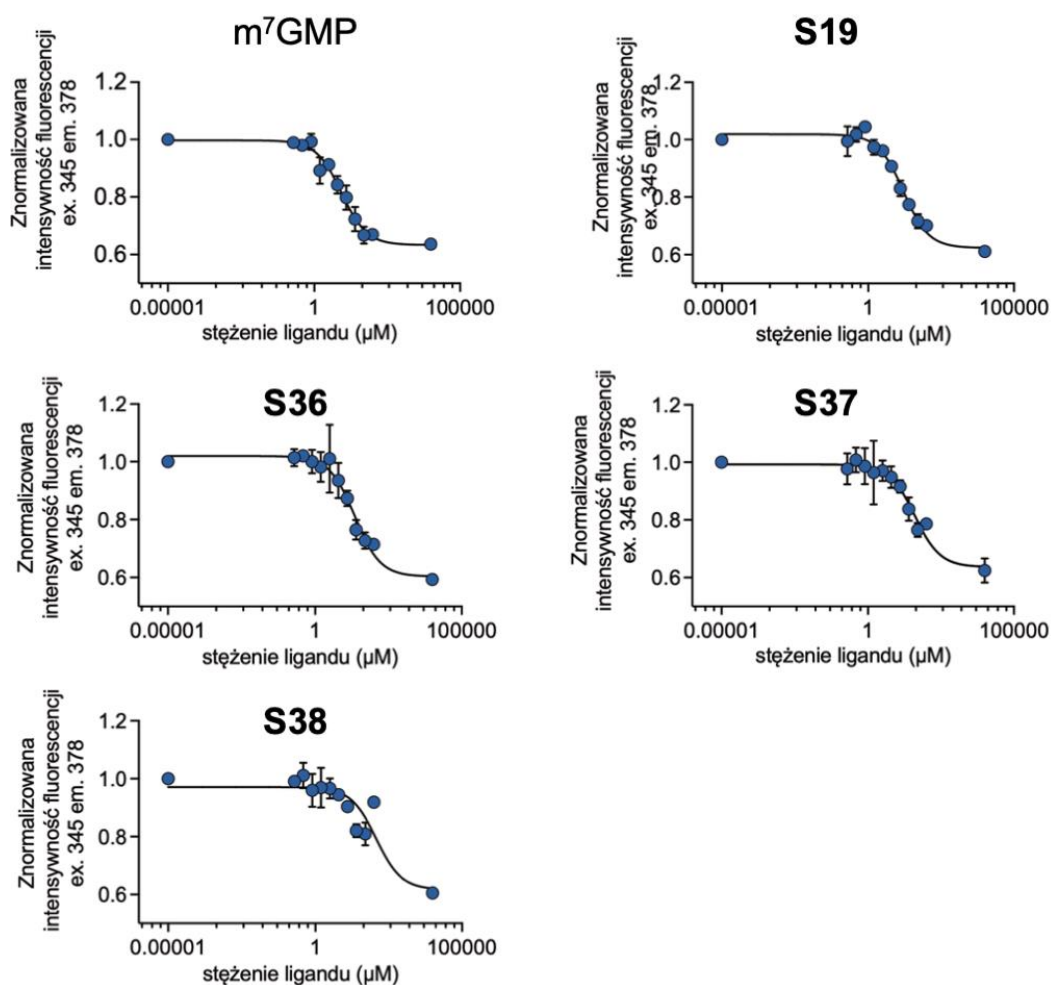


Rysunek 73. Wyznaczanie parametru EC_{50} przy użyciu sondy fluorescencyjnej typu "Turn-on; Turn-Off". **A.** Struktura chemiczna sondy fluorescencyjnej. **B.** Schematyczny rysunek obrazujący zasadę działania wykorzystanej metody. Rysunek przygotowany na podstawie figury przedstawionej w publikacji Kasprzyk R. i wsp.¹¹⁷

Wartości parametru EC_{50} wyznaczyłem dla najsilniejszych inhibitorów enzymu cN-IIIB (**S19**, **S36**, **S37** i **S38**). Jako kontrolę pozytywną i jednocześnie związek odniesienia wybrałem m^7GMP , który posiada niskie powinowactwo do białka eIF4E ($K_{AS} = 0.57 \pm 0.38 \mu M$)¹¹⁷. W celu wyznaczenia parametru EC_{50} , białko eIF4E ($0.4 \mu M$) inkubowałem wraz z sondą fluorescencyjną (75 nM). Następnie, do mieszaniny reakcyjnej zawierającej białko i sondę fluorescencyjną dodałem badany ligand (m^7GMP , **S19**, **S36**, **S37** lub **S38**). Po dodaniu ligandu, mieszaniny reakcyjne inkubowałem przez 30 min w $30^\circ C$, po czym intensywność fluorescencji mierzyłem przez (60 min) (ex. 345 nm, em. 378 nm) za pomocą czynnika mikropłytek. Zmierzone wartości fluorescencji uśredniłem i na ich podstawie tworzyłem wykres zależności intensywności fluorescencji w funkcji stężenia ligandu (μM). Następnie do otrzymanych punktów pomiarowych dopasowałem krzywą opisaną równaniem (1) ([Rysunek 74](#))

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \frac{x}{IC_{50}}} \quad (1)$$

, gdzie parametry A_1 i A_2 to odpowiednio dolne i górne plateau, x to stężenie inhibitora, a y odpowiada absorpcji przy 620 nm, które jest tożsame ze stężeniem uwolnionego fosforanu w czasie trwania reakcji.



Rysunek 74. Krzywe EC_{50} wraz z dopasowaną funkcją opisaną równaniem (2).

Otrzymane wartości EC_{50} posłużyły mi do obliczenia wartości stałej inhibicji, K_i , którą obliczałem korzystając z równania (2)¹¹⁷

$$K_i = \frac{EC_{50} - [P_t] + [PL]_{50} \left(\frac{K_D}{[L]_{50}} + 1 \right)}{\frac{[L]_{50} + [P]_0}{K_D} + 1} \quad (2)$$

, gdzie $[P_t]$ - całkowite stężenie białka, $[PL]_{50}$ - stężenie kompleksu białko-sonda przy 50% inhibicji, $[L]_{50}$ - stężenie niezwiązanej sondy przy 50% inhibicji, $[P]_0$ - wolne białko. Obliczone wartości EC_{50} , K_i oraz SI przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Wyznaczone wartości EC_{50} , K_i oraz SI dla białka eIF4E przy użyciu kompetencyjnej metody fluorescencyjnej.

Związek	Podstawnik w pozycji N7	$EC_{50} \pm SEM$ (μM)	$K_i \pm SEM$ (μM)	SI (cN -IIIb/eIF4E)
m ⁷ GMP	Me	8.4 $\pm$ 1.7	4.5 $\pm$ 0.9	-
S19	Bn	15.8 $\pm$ 2.8	8.5 $\pm$ 1.6	0.62
S36	3-Me-Bn	22.6 $\pm$ 4.3	12.2 $\pm$ 2.4	0.10
S37	3,4-F ₂ -Bn	39.9 $\pm$ 8.5	21.7 $\pm$ 4.7	0.06
S38	4-CF ₃ -Bn	117.5 $\pm$ 66.4	64.3 $\pm$ 36.4	0.06

Wytypowane inhibitory enzymu cN-IIIB charakteryzowały się niskim powinowactwem do białka eIF4E. Uzyskane wartości EC_{50} były co najmniej dwukrotnie wyższe od wartości EC_{50} uzyskanej dla m^7GMP . Najwyższe powinowactwo do białka eIF4E posiadał związek **S19** (5'-monofosforan 7-benzylganozyny, Bn^7GMP), którego pochodna jest używana jako antagonistą białka eIF4E¹⁰². Uzyskana doświadczalnie wartość EC_{50} dla związku **S19** wyniosła $15.8 \pm 2.8 \mu M$, gdzie wartość EC_{50} dla m^7GMP wyniosła $8.4 \pm 1.7 \mu M$ (Tabela 6). Najniższe powinowactwo do białka eIF4E posiadał związek **S38**, który w obrębie pierścienia benzylogowego (pozycja *para*) posiadał grupę trifluorometylową (CF_3). Porównując wartości parametru SI, najbardziej selektywnymi związkami były związki **S37** i **S38**, których parametr SI wynosił 0.06 (Tabela 6). Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowałem związek **S37** (3,4-diF- Bn^7GMP) jako najsilniejszy oraz najbardziej selektywny względem białek cN-IIIA i eIF4E, inhibitor enzymu cN-IIIB. Drugim, równie silnym i selektywnym inhibitorem enzymu cN-IIIB, był związek **S36** (3-Me- Bn^7GMP). Pomimo, że związek **S36** był mniej selektywny względem białka eIF4E (SI= 0.10, Tabela 6) niż związek **S37** (SI= 0.06, Tabela 6), jego silne właściwości inhibitorowe względem enzymu cN-IIIB (IC_{50} = $2.3 \pm 0.3 \mu M$, Tabela 5), sprawiły, że postanowiłem go wykorzystać w dalszych badaniach.

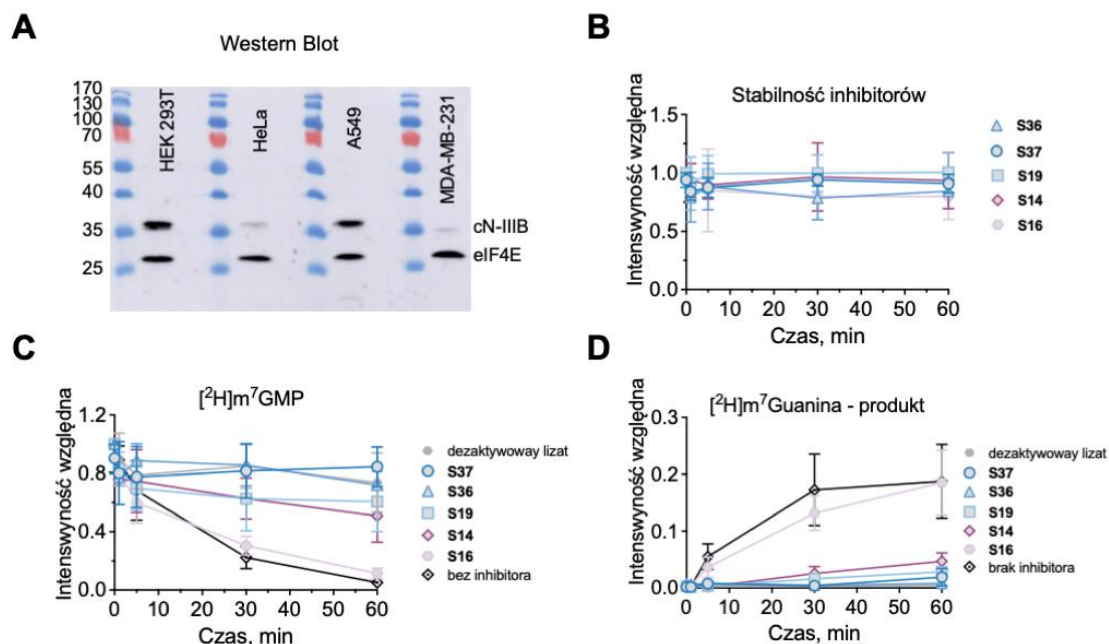
III.6 Wykorzystanie inhibitorów enzymu cN-IIIB do badań biofizycznych i strukturalnych

W poprzednich rozdziałach (III.4 i III.5) opisałem badania, których celem były wytypowanie najsilniejszych oraz najbardziej selektywnych inhibitorów enzymu cN-IIIB. Wytypowanymi związkami były związki **S36** (3-Me- Bn^7GMP) i **S37** (3,4-diF- Bn^7GMP). Dzięki swoim właściwościom biologicznym, związki te mogły być z powodzeniem wykorzystane jako narzędzia molekularne do badania roli enzymu cN-IIIB w degradacji metabolitów końca 5' mRNA w lizatach komórkowych oraz do uzyskania struktury krystalograficznej ludzkiego enzymu cN-IIIB. Badania te, opisane w rozdziałach III.6.1. oraz III.6.2., zostały wykonane, odpowiednio, przez dr Dominikę Strzelecką oraz dr Dorotę Kubacką w Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego oraz w Instytucie Max-Planck w Monachium.

III.6.1 Weryfikacja roli enzymu cN-IIIB w degradacji metabolitów struktury kapu przy użyciu spektrometrii mas

Badania miały na celu weryfikację udziału enzymu cN-IIIB w degradacji m^7GMP w komórkach. Badania z wykorzystaniem związków 3Me- Bn^7GMP (**S36**) i 3,4diF- Bn^7GMP (**S37**) zostały przeprowadzone w lizatach komórkowych HEK 293T. Proces degradacji m^7GMP był monitorowany przy użyciu tandemowej spektrometrii mas połączonej z aparatem HPLC w odwróconych fazach (LC- MS/MS) z wykorzystaniem znakowanego izotopowo m^7GMP ($[^2H]m^7GMP$). Do badań wykorzystano 5 inhibitorów enzymu cN-IIIB różniących się

aktywnością. Były to związki **S36** (3Me-Bn⁷GMP) i **S37**(3,4diFBn⁷GMP), będące najlepszymi inhibitorami enzymu cN-IIIB, **S19** (Bn⁷GMP), najsilniejszy inhibitor z pierwszej biblioteki związków, **S14** (m⁷G-triazolP), pierwszy inhibitor enzymu cN-IIIB charakteryzujący się średnimi właściwościami inhibitorowymi (IC₅₀= 101.8 ±7.8 μM) oraz **S16** (m⁷G-triazol-C₂H₄-P), związek, który nie hamował aktywności enzymu cN-IIIB *in vitro*. Przed przystąpieniem do właściwych badań, została zbadana stabilność wybranych związków w lizatach komórkowych HEK 293T ([Rysunek 75B](#)). Na podstawie zmierzonych intensywności względnych, odpowiadających stosunkowi masy do ładunku (m/z), stwierdzono, że wszystkie analizowane związki były stabilne w lizatach komórkowych HEK 293T w czasie 60 min. Następnie, po zbadaniu stabilności wybranych inhibitorów enzymu cN-IIIB, sprawdzono właściwości inhibitorowe tych związków w lizatach komórkowych. W tym celu przeprowadzono eksperyment w lizatach komórkowych HEK 293T, w którym przy użyciu LC-MS/MS badano ubytek [²H]m⁷GMP oraz przyrost [²H]m⁷guaniny w czasie obecności danego inhibitora cN-IIIB ([Rysunek 74C, D](#)). Uzyskane wyniki pokazują jak dany inhibitor enzymu cN-IIIB wpływa na jego aktywność. W przypadku braku inhibitora enzymu cN-IIIB, m⁷GMP było niemal całkowicie degradowane w ciągu 60 min. To samo zaobserwowano w przypadku, w którym jako potencjalnego inhibitora użyto związku **S16** (kontrola negatywna). Najwolniejszy zanik m⁷GMP zaobserwowano w obecności inhibitorów **S36** i **S37**. Nieco szybszą degradację m⁷GMP obserwowano, gdy jako inhibitora użyto związku **S19**. Najszybszą degradację m⁷GMP obserwowano w przypadku związku **S14**. Uzyskane wyniki z lizatów komórkowych bardzo dobrze korelują z wynikami uzyskanymi *in vitro* przy użyciu rekombinowanego enzymu cN-IIIB, co sugeruje, że to enzym cN-IIIB jest głównym białkiem odpowiedzialnym za degradację m⁷GMP w komórkach HEK293T, a wytypowane przeze mnie pochodne nukleotydów **S36** i **S37** selektywnie i wydajnie hamują jego aktywność.



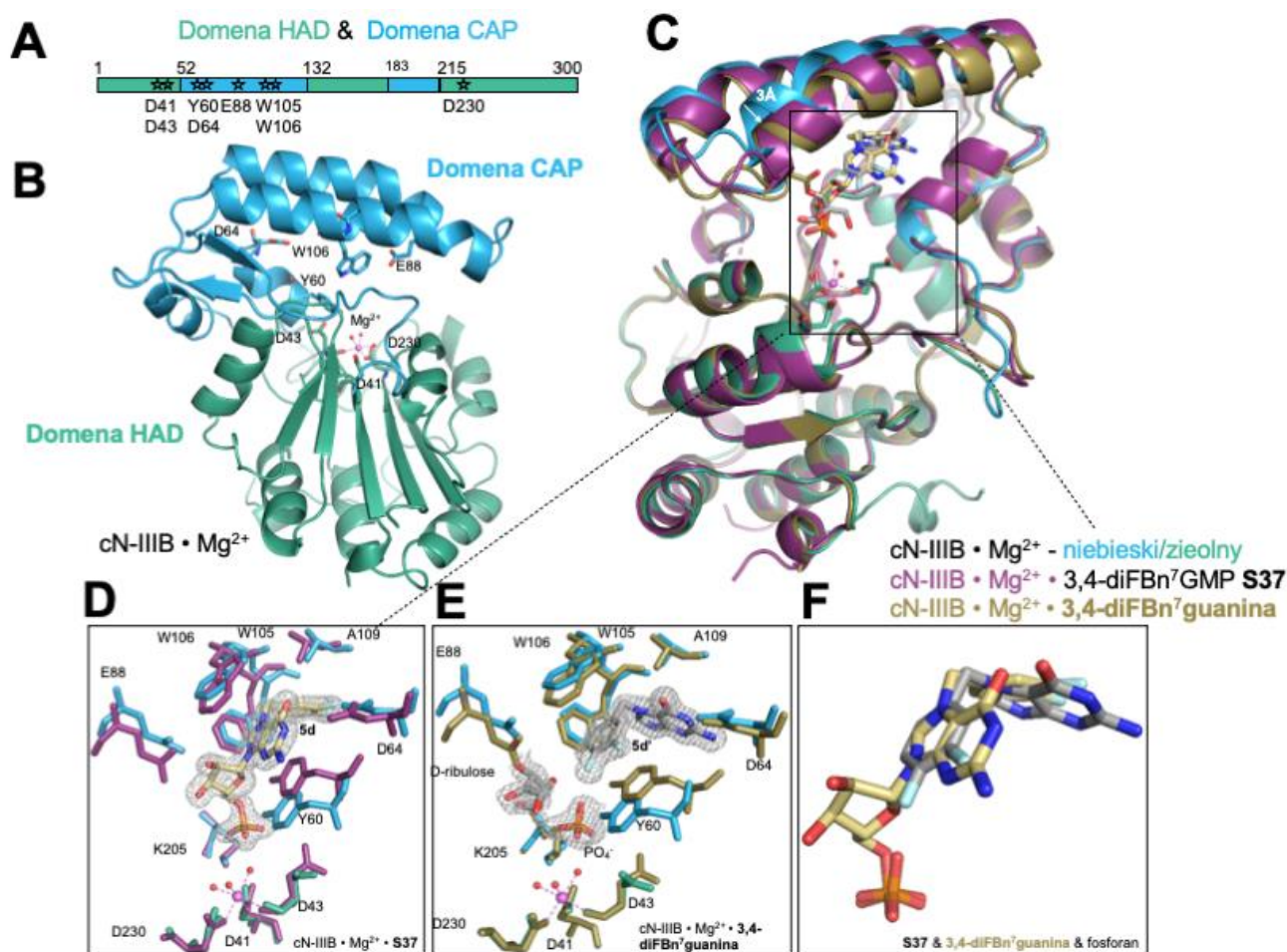
Rysunek 75. Badania właściwości inhibitorowych najsilniejszych inhibitorów enzymu cN-IIIB w lizacie komórkowym HEK 293T. **A.** Western Blot pokazujący ilość białka cN-IIIB i eIF4E w danym lizacie komórkowym. **B.** Stabilność wybranych inhibitorów enzymu cN-IIIB w lizacie komórkowym HEK 293T. **C.** **D.** Spadek intensywności względnej pochodzącej od [2H]m7GMP oraz przyrost intensywności [2H]m7guaniny w czasie. Różnice w intensywności względnej zależą od właściwości inhibitorowych danego związku. *Strzelecka i wsp. Wyniki nieopublikowane.*

III.6.2 Badania krystalograficzne ludzkiego enzymu cN-IIIB w kompleksie z inhibitorami

Krystalografia rentgenowska jest jedną z najlepszych metod służących do analizy przestrzennej struktury białka. Przestrzenna struktura białka dostarcza wielu cennych informacji dotyczących potencjalnego mechanizmu jego działania i może być nieocenionym źródłem inspiracji przy projektowaniu aktywnych inhibitorów. Głównym założeniem projektu, którego integralną częścią są badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej, było uzyskanie struktury krystalograficznej ludzkiego enzymu cN-IIIB. Dzięki inhibitorom wytypowanym w wyniku badań opisanych w poprzednich rozdziałach, możliwe było uzyskanie struktur krystalograficznych ludzkiego enzymu cN-IIIB w kompleksie z ligandem, co dostarczyło znacznie więcej informacji na temat mechanizmu działania białka niż struktura białka w formie *apo*. Do badań krystalograficznych wytypowany został związek **S37** (3,4-diF-Bn7GMP).

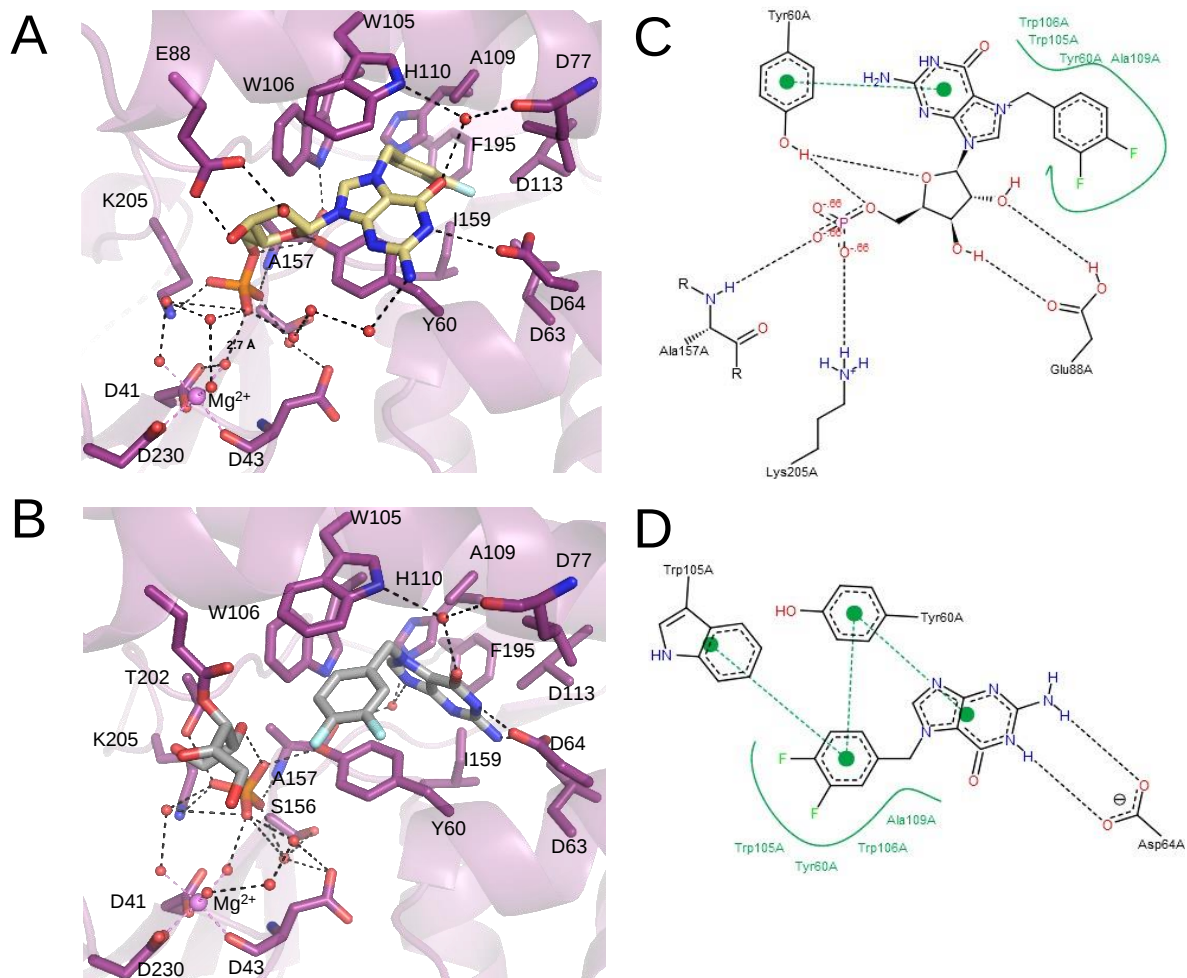
Ludzkie białko cN-IIIB zostało wykrystalizowane przy użyciu metody siedzącej kropli. Warunki krystalizacji oraz sposób rozwiązania struktury krystalograficznej enzymu cN-IIIB został opisany w pracy Kubacka & Kozarski i wsp.¹⁶⁶. Wykrystalizowane i rozwiązane zostały trzy struktury krystalograficzne ludzkiego enzymu cN-IIIB: białko w formie *apo* w kompleksie z jonami magnezu (Mg^{2+}) (1.36 Å; PDB id: 7ZEE) oraz białko w kompleksie ze związkiem **S37** (1.5 Å; PDB id: 7ZEH). Trzecią otrzymaną strukturą krystalograficzną (1.56 Å; PDB id: 7ZEG) było białko cN-IIIB w kompleksie z pochodną związku **S37** – N7-(3,4-diF-benzyluo)guaniną (3,4-diFBn7guanina, **S37'**), która powstała ze związku **S37** w wyniku pęknięcia wiązania *N*-glikozydowego w warunkach krystalizacji. Otrzymana struktura krystalograficzna ludzkiego białka cN-IIIB składała się, podobnie jak w przypadku białka pochodzącego z muszki

owocówki, z dwóch domen: globularnej domeny HAD (aminokwasy **1-51**, **132-182** oraz **215-300**) oraz domeny CAP (aminokwasy **52-131** oraz **183-214**). Domena HAD składa się z dwóch α -helis oraz jednej β -kartki (motyw $\alpha/\beta/\alpha$), podczas gdy domena CAP składa się głównie z α -helis i jest ona odpowiedzialna za rozpoznawanie ligandu. α -Helisy tworzące domenę CAP dopasowują się do ligandu, domykając kieszeń wiążącą enzymu. Ruch ten widoczny jest na [rysunku 76C](#), na którym przedstawiono trzy nałożone na siebie struktury. Po związaniu liganda **S37** oraz **S37'**, α -helisy przesunęły się w stronę miejsca wiązania o ok. 3 Å. Miejsce katalityczne enzymu cN-IIIB zlokalizowane jest w domenie HAD. Miejsce katalityczne tworzą trzy aminokwasy: kwas asparaginowy 41, 43 oraz 230 wraz z koordynacyjnie związanym jonem Mg^{2+} . Uzyskane struktury krystalograficzne wraz z zaznaczonymi domenami oraz związanymi w kieszeni wiążącej ligandami zostały przedstawione na [rysunku 76](#).



Rysunek 76. Struktura krystalograficzna ludzkiego enzymu cN-IIIB. **A.** Schemat przedstawiający składowe struktury krystalograficznej ludzkiego enzymu cN-IIIB wraz z zaznaczonymi domenami HAD (kolor zielony) i CAP (kolor niebieski) oraz z aminokwasami znajdującymi się w kieszeni wiążącej cN-IIIB. **B.** Struktura krystalograficzna ludzkiego enzymu cN-IIIB w formie apo z jonami Mg^{2+} . **C.** Otrzymane struktury krystalograficzne nałożone na siebie: forma apo · Mg^{2+} (niebieski/zielony), kompleks cN-IIIB · Mg^{2+} · **S37** (fioletowy) oraz kompleks cN-IIIB · Mg^{2+} · 3,4-diFbn⁷guanina. **D, E.** Kieszeń wiążąca cN-IIIB w kompleksie ze związkiem **S37** oraz 3,4-diFbn⁷guaniną. **F.** Nałożenie struktur **S37** oraz 3,4-diFbn⁷guaniny w konformacji, w której są wiązane przez enzym. Rysunek został przygotowany przez dr Dorotę Kubacką i został zaczerpnięty z pracy Kubacka & Kozarski i wsp. ¹⁶⁶.

Na podstawie uzyskanych struktur krystalograficznych enzymu cN-IIIIB w kompleksie z jego inhibitorem **S37** oraz jego pochodną, N7-(3,4-difluorobenzylo)guaniną, opisano dokładny mechanizm oddziaływania białko-ligand. Kieszeń wiążącą enzymu cN-IIIIB tworzy 11 aminokwasów. Są to *Trp105*, *Trp106*, *Tyr60*, *Ala109*, *Leu63*, *Leu77*, *Leu113* i *Ile159*, których łańcuchy boczne tworzą hydrofobową kieszeń, w której stabilizowana jest grupa 3,4-difluorobenzylova. Dodatkowo *Trp105* i *Tyr60*, będące w odległości 3.6 Å, tworzą przestrzeń do oddziaływania warstwowego z dodatnio naładowaną guaniną. Trzecim aminokwasem, będącym w płaszczyźnie prostopadłej do *Trp105* i *Tyr60*, stabilizującym guaninę jest *Trp106*. Układ π -elektronowy *Trp106* oddziałuje z protonem w pozycji C8 stabilizując guaninę oddziaływaniem *Edge-to-face* (CH- π). Ryboza stabilizowana jest przez kwas glutaminowy (*Glu88*), który tworzy z grupami hydroksylowymi (2'-OH i 3'-OH) dwa wiązania wodorowe. Z kolei, *Ala157* i *Leu205* tworzą wiązania wodorowe z tlenami reszty fosforanowej. Reszta fosforanowa związku **S37** jest dodatkowo stabilizowana dzięki wiązaniu wodorowemu, które tworzy tlen w pozycji 5' rybozy (5'-O) z grupą hydroksylową (-OH) *Tyr60* (Rysunek 77A, B). Wytworzenie wiązań wodorowych pomiędzy resztą fosforanową, a aminokwasami (*Ala157*, *Leu205* i *Tyr60*) spowodowało odsunięcie reszty fosforanowej od miejsca katalitycznego, co może wyjaśniać odporność związku **S37** na degradację enzymatyczną przez enzym cN-IIIIB. Uzyskana struktura krystalograficzna kompleksu ludzkiego enzymu cN-IIIIB wraz ze związkiem **S37** tłumaczy silne powinowactwo związku **S37** do kieszeni wiążącej ludzkiego enzymu cN-IIIIB. Interesującym odkryciem było otrzymanie struktury krystalograficznej kompleksu enzymu cN-IIIIB wraz z pochodną związku **S37**, 3,4-diFBn⁷guaniną (**S37'**). W wyniku pęknięcia wiązania *N*-glikozydowego nastąpiła reorganizacja układu π elektronowego w purynowym pierścieniu guaniny oraz 3,4-diFBn⁷guanina została pozbawiona dodatniego ładunku, który w związku **S37** był zlokalizowany na atomie azotu w pozycji N7. Związek **S37'** został związany przez enzym cN-IIIIB w jego kieszeni wiążącej, tak jak związek **S37**, lecz w odwrotnej orientacji. Pierścień benzylovy oddziałuje warstwowo (π - π) z tyrozyną 60 i tryptofanem 105. Z kolei zasada azotowa stabilizowana jest przez dwa wiązania wodorowe, które tworzy z kwasem asparaginowym 64 oraz przez oddziaływanie *Edge-to-face*, który tworzy z tyrozyną 60 (Rysunek 77C, D). Dopasowanie związku **S37'** do kieszeni wiążącej ludzkiego enzymu cN-IIIIB sugerowało, że związek **S37'** może być potencjalnym inhibitorem tego białka.



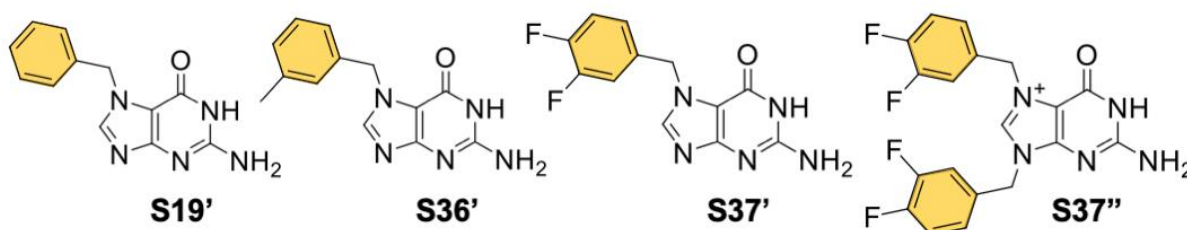
Rysunek 77. Kieszonki wiążące ludzkiego enzymu cN-IIIB. **A.** w kompleksie ze związkiem **S37**; **B.** w kompleksie ze związkiem **S37'**. Schemat przedstawiający oddziaływanie ligandów z aminokwasami w kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB: **C.** związek **S37**; **D.** związek **S37'**. Rysunek został zaczerpnięty z pracy Kubacka & Kozarski et. al. ¹⁶⁶.

W celu poznania mechanizmu inhibicji enzymu cN-IIIB przez związki **S37** i **S37'** otrzymane struktury krystalograficzne (PDB id: 7ZEE i 7ZEG) porównano z modelem struktury krystalograficznej białka w kompleksie z 5'-monofosforanem 7-metyloguanozyny (m^7GMP) (otrzymanym przez dr Joannę Panecką-Hofman z Zakładu Biofizyki UW). Porównując ze sobą te trzy struktury krystalograficzne można wnioskować, że enzym cN-IIIB może występować w dwóch konformacjach: otwartej oraz zamkniętej. W konformacji otwartej, enzym cN-IIIB wiąże ligand. Po związaniu ligandu, domena CAP zamyka kieszonkę wiążącą przeprowadzając tym samym reakcję enzymatyczną. Na uzyskanych strukturach krystalograficznych (PDB id: 7ZEE i 7ZEG) widać, że związki **S37** i **S37'** blokują enzym cN-IIIB w konformacji otwartej. Zablockowanie enzymu w otwartej konformacji uniemożliwia mu przeprowadzenie reakcji enzymatycznej, co hamuje aktywność enzymu.

III.7 Benzytowe pochodne guaniny

Badanie krystalograficzne dostarczyły wielu cennych informacji na temat mechanizmu inhibicji enzymu cN-IIIB przez związek **S37**. Dzięki otrzymanym strukturom krystalograficznym

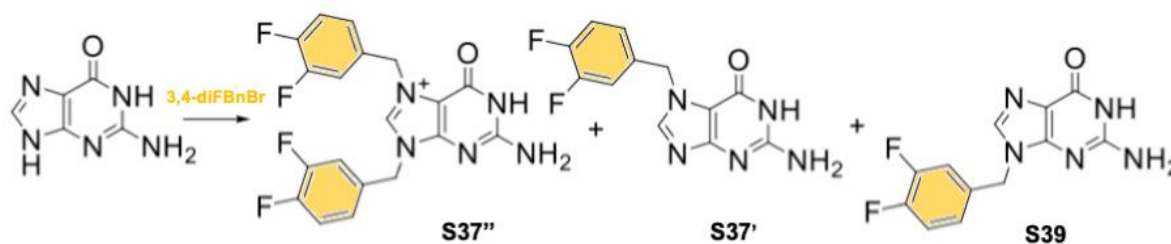
odkryto, że pochodna guaniny (związek **S37'**), powstała w wyniku degradacji związku **S37**, może potencjalnie hamować aktywność enzymu cN-IIIb. Bardzo dobre dopasowanie związku **S37'** do kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIb ([Rozdział III.6.2.](#), [Rysunek 77C,D](#)) sprawiło, że postanowiłem zbadać właściwości inhibitorowe związku **S37** i strukturalnie zbliżonych pochodnych guaniny. W tym celu zaprojektowałem i zsyntezowałem cztery nowe benzytowe pochodne guaniny, a następnie zbadałem ich właściwości inhibitorowe względem enzymu cN-IIIb. Zaprojektowane przeze mnie pochodne guaniny posiadały N7 pozycji guaniny benzyl, 3-metylobenzyl oraz 3,4-difluorobenzyl. Dodatkowo, otrzymałem pochodną guaniny, która posiadała dwie grupy 3,4-difluorobenzylowe w pozycji N7 i N9. Struktury zaprojektowanych przeze mnie związków zostały przedstawione na [rysunku 78](#).



Rysunek 78. Struktury chemiczne benzytowych pochodnych guaniny.

III.7.1 Synteza benzytowych analogów guaniny

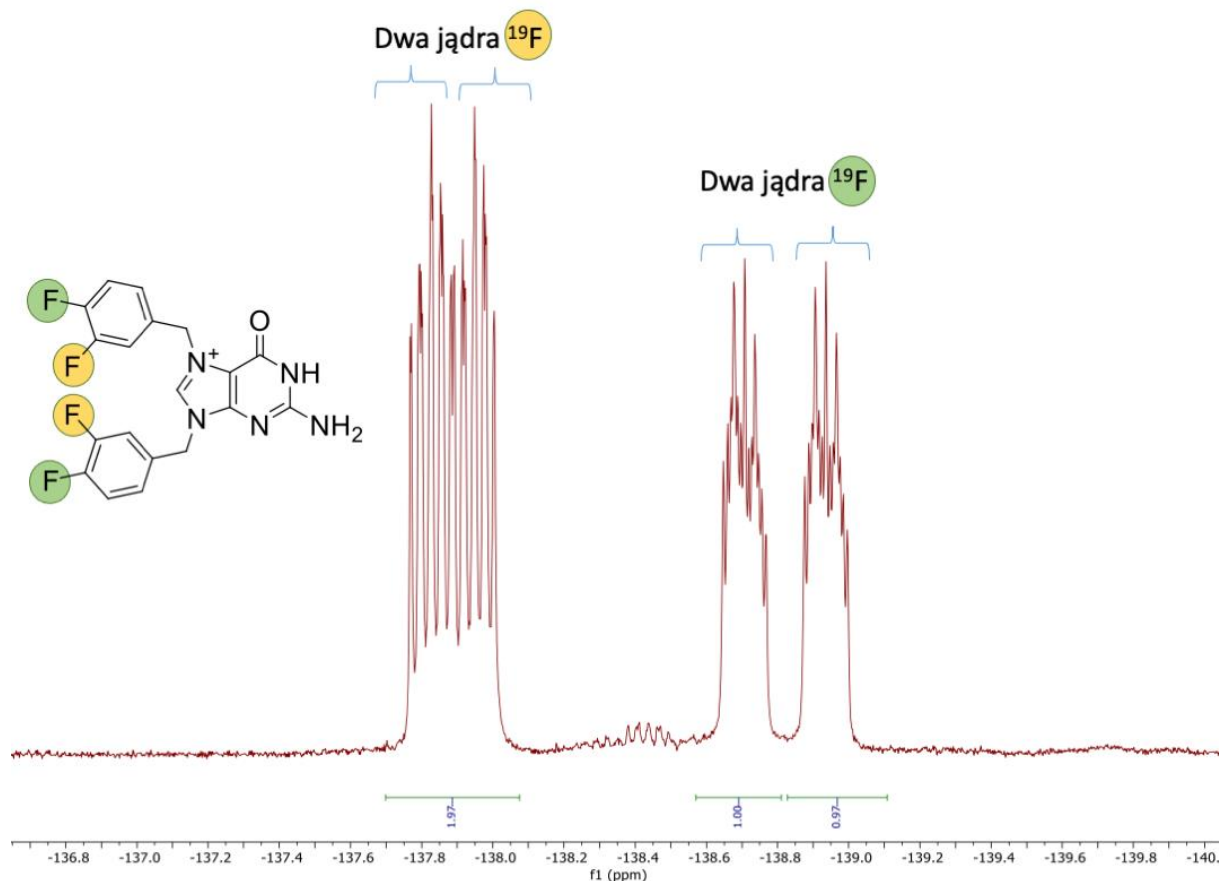
Syntezę benzytowych analogów guaniny przeprowadziłem korzystając z reakcji alkilowania guaniny odpowiednimi bromkami benzylu (**R-BnBr**). W pierwszym podejściu syntetycznym, reakcje alkilowania przeprowadziłem na handlowo dostępnej guaninie w obecności bromku 3,4-difluorobenzylu. Reakcja alkilowania guaniny przebiegała według schematu przedstawionym na [rysunku 79](#).



Rysunek 79. Schemat syntezy alkilowania guaniny.

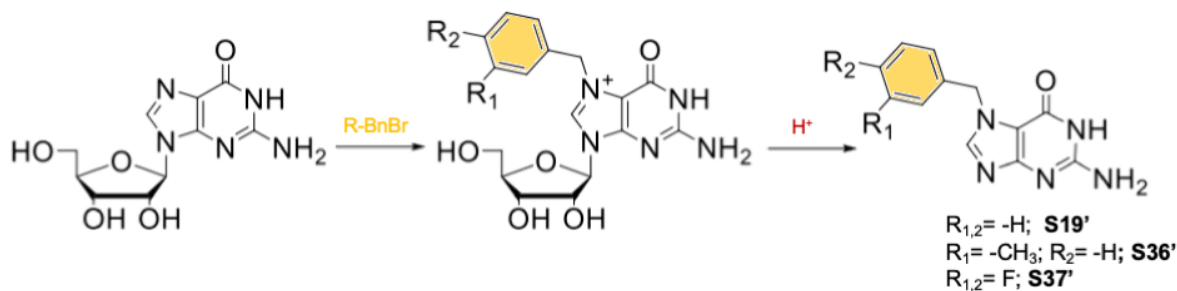
Niestety ta nie przebiegała w żadnym stopniu regioselektywnie. Guanina posiada dwa nukleofilowe atomy azotu w pozycji N7 i N9, które chętnie ulegają reakcji alkilowania. W wyniku reakcji obserwowałem powstawanie trzech produktów: guanina mono-podstawiona w pozycji N7 (**S37'**) lub N9 (**S39**) oraz guanina di-podstawiona w pozycjach N7 i N9 (**S37''**). Głównym produktem reakcji alkilowania guaniny był związek dipodstawiony (**S37''**). Związek

S37'' został wydzielony z mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii cieczowej przy użyciu złoża krzemionkowego. Obecność dwóch pierścieni 3,4-difluorobenzylowych potwierdziłem m.in. za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego ^{19}F (Rysunek 80).



Rysunek 80. Widmo ^{19}F NMR otrzymane dla związku 7,9-(3,4-difluorobenzyl)guaniny. Widoczne są cztery multiplety pochodzące od czterech jąder ^{19}F .

Aby uniknąć powstawania dipodstawionych produktów powstających w wyniku reakcji alkilowania guaniny, syntezę pozostałych pochodnych guaniny przeprowadziłem według innego schematu reakcji. W celu otrzymania monopodstawionych benzytowych analogów guaniny, zmodyfikowałem wcześniej opracowaną procedurę syntezy N7 alkilowych pochodnych guaniny. Procedura ta zakłada w pierwszym etapie alkilację N7 pozycji guanozyny, po której prowadzi się depurynację N7 podstawionej zasady azotowej¹⁶⁸. Reakcję alkilowania przeprowadziłem w obecności odpowiednich bromków benzyłu (bromek benzyłu, bromek 3-metylobenzyłu oraz bromek 3,4-difluorobenzyłu), wychodząc z handlowo dostępnej guanozyny. Reakcja alkilowania guanozyny zachodzi w sposób selektywny, prowadząc do N7-podstawionej pochodnej guanozyny. Następnie, nukleozyd podstawiony odpowiednią grupą benzylową w pozycji N7, poddałem reakcji depurynacji w warunkach kwasowych, w wyniku której otrzymałem N7 podstawione pochodne benzyloguaniny (Rysunek 81).

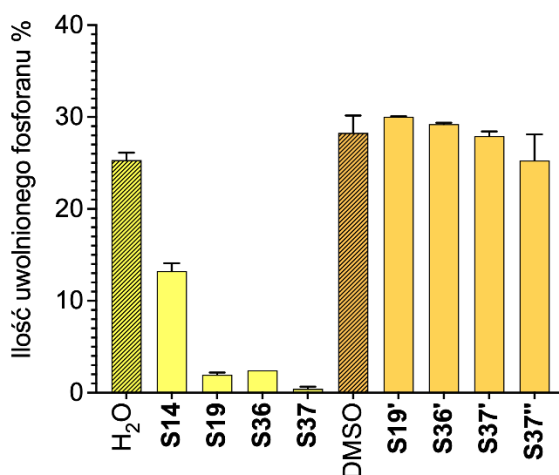


Rysunek 81. Schemat syntezy *N7* benzytowych analogów guaniny. Synteza przeprowadzona z guanozyny.

W rezultacie otrzymałem cztery benzytowe analogi guaniny, których struktury potwierdziłem przy użyciu jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). Następnie zbadałem ich właściwości inhibitorowe względem enzymu cN-IIIB.

III.7.2 Własności inhibitorowe pochodnych guaniny względem ludzkiego enzymu cN-IIIB

Aby potwierdzić potencjalne właściwości inhibitorowe benzytowych pochodnych guaniny względem enzymu cN-IIIB, przeprowadziłem ponownie badania *in vitro* z użyciem rekombinowanego enzymu cN-IIIB (Rysunek 82). Badania wykonałem stosując stałe stężenie (100 μ M) benzytowych analogów guaniny (N7-benzyloguanina (**S19'**), N7-(3metylbenzylo)guaniny (**S36'**), N7-(3,4-difluorobenzylo)guaniny (**S37'**) oraz N7,9-di(3,4-difluorobenzylo)guaniny (**S37''**)). Uzyskane wyniki przedstawiłem na rysunku 82. Własności inhibitorowe związków **S19'**, **S36'**, **S37'** oraz **S37''** porównałem z właściwościami inhibitorowymi wcześniej znalezionych inhibitorów enzymu cN-IIIB (**S14**, **S19**, **S36** oraz **S37**).



Rysunek 82. Badanie własności inhibitorowych benzytowych analogów guaniny. Ilość uwolnionego fosforanu podczas reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym cN-IIIB (80 nM) w obecności m⁷GMP (100 μ M) oraz inhibitora (100 μ M). Wyniki pokazane w postaci średnie z dwóch pomiarów wraz z błędem.

Otrzymane wyniki pokazały, że benzytowe analogi guaniny nie są inhibitorami enzymu cN-IIIB, wbrew temu co sugerowały wcześniejsze badania krystalograficzne. Ilość uwolnionego

fosforanu w obecności związków **S19'**, **S36'**, **S37'** oraz **S37''** (100 μ M) jest porównywalna do ilości fosforanu uwolnionego w przypadku reakcji bez dodatku inhibitora (H_2O , DMSO). Uzyskane wyniki sugerują, że depurynacja związku **S37** do związku **S37'** w warunkach krystalizacji przebiega po związaniu ligandu w kieszeni wiążącej białka oraz że reszta fosforanowa i ryboza są niezbędne do efektywnego oddziaływania białko-ligand.

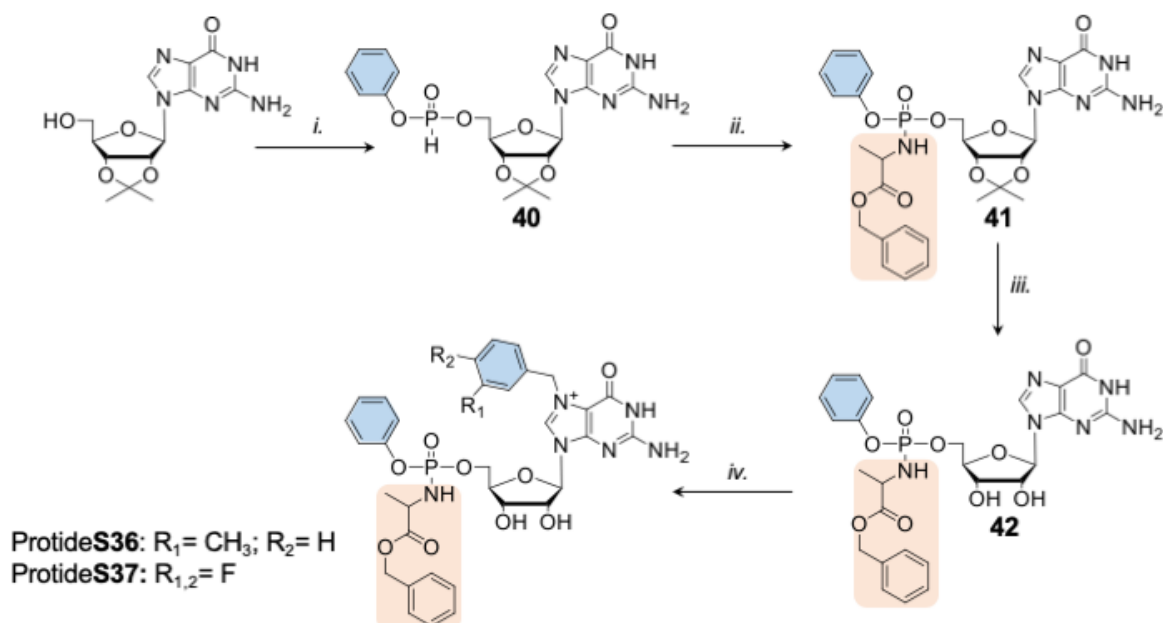
III.8 Terapeutyczny potencjał inhibitorów enzymu cN-IIIB – synteza inhibitorów enzymu cN-IIIB w wersji pronukleotydowej

W części literaturowej niniejszej rozprawy doktorskiej szczegółowo opisałem rolę cytozolowych 5'-nukleotydaz w komórkach. Jedną z niepożądanych aktywności cytozolowych 5'-nukleotydaz jest dezaktywowanie pochodnych nukleozydów i nukleotydów stosowanych w terapiach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Przykładami terapeutyków pochodzenia nukleozydowego są gemcytabina i cytarabina (zastosowanie przeciwnowotworowe) oraz dideoksycytidyna (zastosowanie przeciwwirusowe). Związki te po przeniknięciu przez błonę komórkową na skutek reakcji chemicznych lub enzymatycznych są przekształcane w formę aktywną leku, czyli odpowiednie 5'-trifosforany nukleozydów. Pierwszym etapem tego przekształcenia jest biosynteza 5'-monofosforanu nukleozydu poprzez enzymatyczną fosforylację nukleozydu. Proces fosforylacji nukleozydów katalizowany jest przez kinazy. Procesem odwrotnym do fosforylacji jest defosforylacja, która katalizowana jest przez 5'-nukleotydazy. 5'-Nukleotydazy defosforylując 5'-monofosforany nukleozydów uniemożliwiają przejście leku do formy aktywnej, obniżając przy tym jego efektywność ([Rozdział II.2.1](#)). W celu zwiększenia efektywności leku podczas terapii, niekiedy wraz z lekiem podaje się inhibitor białka, który jest odpowiedzialny za dezaktywację podawanego leku. Strategia ta stosowana jest w przypadku terapii przeciwnowotworowych i nosi nazwę chemosensytyzacji¹⁶⁹. Enzym cN-IIIB posiada szeroką specyficzność substratową, co sugeruje, że tak jak inne 5'-nukleotydazy, może brać udział w defosforylacji pochodnych 5'-NMP, będących formą przejściową aktywnego leku. W opisanym przypadku, znalezione przeze mnie inhibitory enzymu cN-IIIB można potencjalnie wykorzystać do zwiększenia efektywności terapii przy użyciu terapeutyków pochodzenia nukleozydowego. Niestety problemem jest dostarczenie inhibitorów enzymu cN-IIIB do wnętrza komórki. Inhibitory enzymu cN-IIIB są związkami polarnymi, obdarzonymi ładunkiem i nie są w stanie samoistnie przenikać przez hydrofobową błonę komórkową. Istnieje wiele technologii, które umożliwiają polarnym związkom przenikać przez niepolarną błonę komórkową. Jedną z nich jest wcześniej opisana ([Rozdział II.8](#)) technologia pronukleotydów, w której ładunki zlokalizowane na grupie fosforanowej są maskowane przez grupy funkcyjne, co umożliwia takim związkom przenikać przez błonę komórkową. W swoich badaniach wykorzystałem dwie metody maskowania

ładunków zlokalizowanych na reszcie fosforanowej. Pierwszą z nich były pronukleotydy McGuigana, w której ładunki maskowane są przez estry aminokwasów oraz podstawniki aromatyczne⁹⁶, a drugą tryptaminowe pronukleotydy Wagnera (obie strategie zostały szerzej opisane w części literaturowej rozprawy)¹⁰². Wykorzystując te dwie metody, w ramach niniejszego projektu doktorskiego, zaprojektowałem i zsyntezowałem pochodne związków **S36** i **S37** w wersji pronukleotydowej.

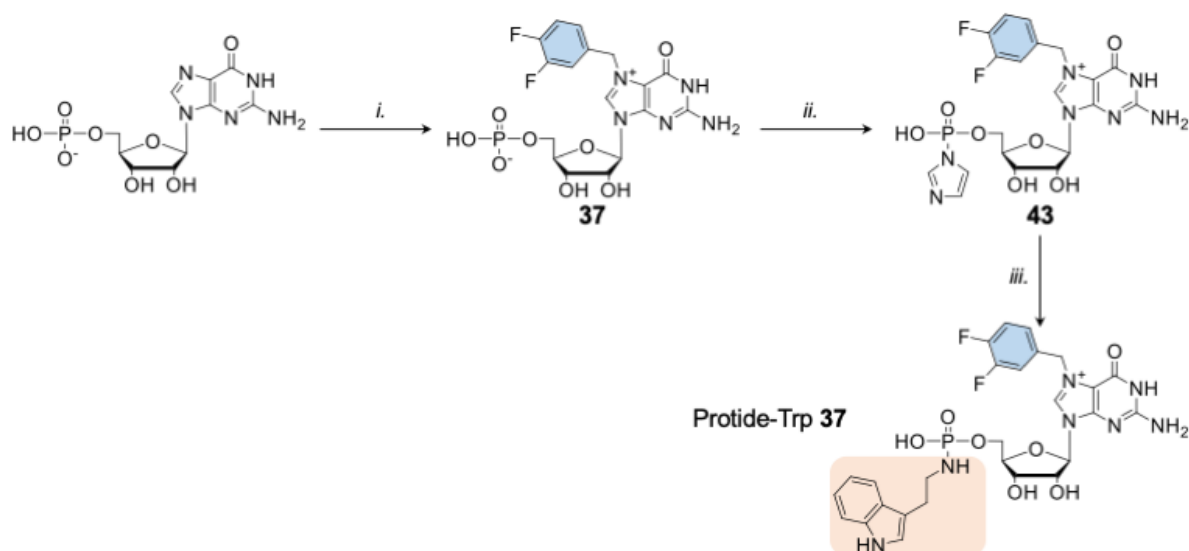
III.8.1 Synteza pronukleotydów

W pierwszej kolejności swoją uwagę skupiłem opracowaniu ścieżki syntetycznej umożliwiającej syntezę pochodnych związku **S36** i **S37** w formie pronukleotydów McGuigana. W części literaturowej ([Rozdział II.8.2](#)) opisałem trzy strategie syntetyczne, które wykorzystuje się do syntezy takich pronukleotydów. W ramach swoich badań przetestowałem dwie z nich. Pierwsza z nich, polegająca na syntezie odpowiedniej chloropochodnej amidofosforanu, a następnie przeprowadzenie z nim reakcji sprzęgania z pochodną 7-benzyloguanozyny okazała się nieskuteczna. Etapem limitującym w tej strategii była synteza chloropochodnej amidofosforanu z trichloru fosforylu. Synteza ta była mało wydajna. Powodem była bardzo szybka hydroliza trichloru fosforylu oraz jego pochodnych. Drugą przetestowaną przeze mnie strategią była strategia, w której wykorzystuje się odpowiedni H-fosfonianu nukleozydu ([Rysunek 83](#)). Syntezy związków Protide**S36** i Protide**S37** ([Rysunek 83](#)) rozpocząłem wychodząc z handlowo dostępnej 2',3'-izopropylidenoguanozyny. 2',3'-izopropylidenoguanozonę przekształciłem w fenylo-H-fosfonian 2',3'-izopropylidenoguanozony (**40**) w reakcji fosfonylacji przy użyciu fosfonianu difenyłu. W celu uniknięcia hydrolizy wiązania fosfoestrowego, reakcję H-fosfonylacji prowadziłem w warunkach bezwodnych. Otrzymany fenylo-H-fosfonian 2',3'-izopropylidenoguanozony poddałem reakcji aminowania oksydacyjnego benzylovym estrem L-alaniny w obecności tetrachloru węgla (CCl₄) i trietyloaminy (TEA). Podczas reakcji aminowania oksydacyjnego, oprócz zachowania bezwodnych warunków reakcji, kluczowy był dobór odpowiedniej soli estru L-alaniny. Reakcja aminowania oksydacyjnego wydajnie zachodziła przy użyciu estru L-alaniny w postaci chlorowodoru, podczas gdy, ester L-alaniny w postaci soli *p*-toluenosulfonowej był niereaktywny. Po reakcji aminowania oksydacyjnego, usunąłem zabezpieczającą grupę 2',3'-izopropylidenową z rybozy otrzymując pochodną 5'-amidofosforanu guanozyny (**42**). Ostatnim etapem syntezy związków Protide**S36** i Protide**S37** była alkilacja (benzylacja) N7 pozycji guanozyny przy użyciu odpowiedniego bromku benzylu. Reakcje benzylacji prowadziłem w DMSO w temperaturze pokojowej. Ostateczne związki, Protide**S36** i Protide**S37** oczyściłem za pomocą chromatografii cieczowej przy użyciu kolumny w odwróconych fazach ze złożem C18, otrzymując je w postaci mieszaniny diastereoizomerów z wydajnością 16%.



Rysunek 83. Schemat syntezy inhibitorów enzymu cN-IIIb w postaci pronukleotydów McGuagina. *i.* fosfonian difenyłu, argon, pirydyna, 0 °C; *ii.* Benzyłowy ester L-alaniny (HCl), acetonitryl, CCl_4 , TEA, 0 °C; *iii.* TFA/ H_2O , 30 °C. Wydajność po trzech etapach syntezy wyniosła 30%; *iv.* Odpowiedni bromek benzyłu (R-BnBr), DMSO, temp. pokojowa, 50% (**S37**) oraz .

Drugim rodzajem syntezowanych pronukleotydów były opisane wcześniej (Rozdział II.8.2.) pronukleotydy tryptaminowe. Synteza tego typu związków składała się z trzech etapów. W pierwszym etapie, GMP w postaci soli TEAH^+ , przekształciłem w odpowiednią pochodną benzyłową przy użyciu bromku 3,4-difluorobenzylu (3,4-diFbn-Br), otrzymując związek **S37**. Reakcję alkilacji przeprowadziłem według wcześniej opracowanej metody, używając odpowiedniego bromku benzyłu (3-MeBn-Br lub 3,4-diFbn-Br). Następnie uzyskany związek **S37** przekształciłem w P-imidazolid 5'-monofosforanu 3,4-difluorobenzylloguanozyny (P-imidazolid 3,4-diFbn⁷GMP, **43**), stosując metodę Mukaiyamy- Hashimoto⁵⁸. Końcowym etapem syntezy związku (Protide-Trp **S37**) była reakcja sprzęgania tryptaminy z P-imidazolową pochodną 3,4-diFbn⁷GMP (Rysunek 84). Reakcję substytucji nukleofilowej przeprowadziłem w buforze HEPES, pH 8, wzorując się na wcześniej opisanym protokole (Rysunek 84)¹⁰⁴. Produkt ostateczny oczyściłem za pomocą chromatografii cieczowej przy użyciu kolumny ze złożem C18, otrzymując związek Protide-Trp **S37** z wydajnością 3%. Pomimo zastosowania buforu o zasadowym pH, w którym P-imidazolowe pochodne nukleozydów bardzo wolno ulegają hydrolizie¹⁷⁰, wydajność syntezy była bardzo niska. Powodem niskiej wydajności syntezy mogła być niska czystość zastosowanych substratów (P-imidazolowej pochodnej) lub z źle dobranych warunków oczyszczania związku Protide-Trp **S37**.



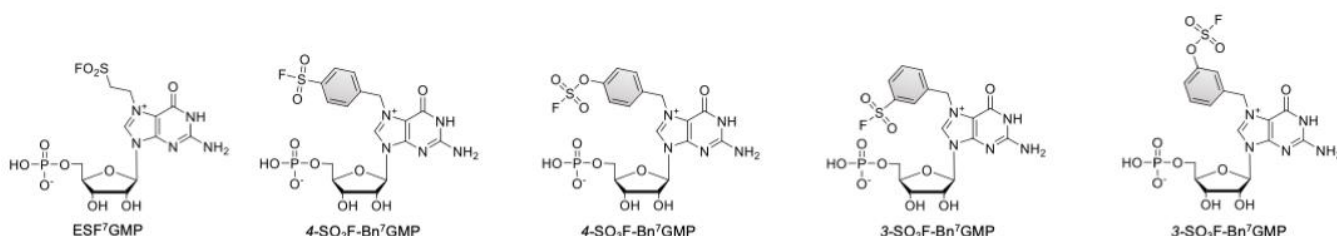
Rysunek 84. Schemat syntezy inhibitora enzymu cN-IIIB w postaci pronukleotydu (Wagner). *i.* 3,4-diFbNBr, DMSO; *ii.* trifenylofosfina, Aldrithiol-2, imidazol, TEA, DMF; wydajność 35% *iii.* tryptamina, HEPES pH 8; wydajność 3%

W wyniku przeprowadzonych przeze mnie reakcji otrzymałem trzy inhibitory enzymu cN-IIIB w postaci pronukleotydów. Otrzymane związki, dzięki zamaskowaniu ujemnych ładunków w obrębie reszty fosforanowej, będą prawdopodobnie swobodnie przenikać do wnętrza komórki, gdzie ulegną przekształceniu w formy aktywne inhibitorów (związki 3Me-Bn⁷GMP (**S36**) i 3,4diF-Bn⁷GMP (**S37**)). Badania biologiczne tych związków nie zostały jeszcze ukończone w momencie tworzenia niniejszej rozprawy, więc hipoteza ta wymaga jeszcze weryfikacji eksperymentalnej. Może mieć nadzieję, że uzyskanie inhibitorów 3Me-Bn⁷GMP (**S36**) i 3,4diF-Bn⁷GMP (**S37**) pozwoli przybliżyć rolę, którą pełni enzym cN-IIIB w żywych komórkach, a także pozwoli zbadać potencjał terapeutyczny tych związków.

III.9 Analogi 5'-monofosforanów 7-metyloguanozyny typu SuFEX (ang. Sulfur (VI) Fluoride Exchange)

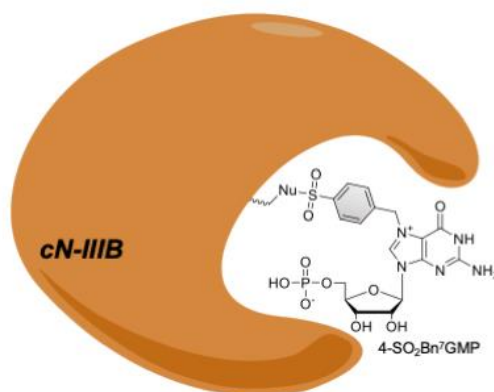
W wyniku realizacji projektu doktorskiego odkryłem, że benzytowe analogi 5'-monofosforanu 7-metyloguanozyny (R-Bn⁷GMP) są silnymi inhibitorami enzymu cN-IIIB. W rozdziale dotyczącym badań krystalograficznych ([Rozdział III.6.2.](#)) szczegółowo opisałem sposób wiązania analogów Bn⁷GMP przez enzym cN-IIIB oraz mechanizm inhibicji. W jednym z ostatnich etapów prac nad niniejszym projektem starałem się zweryfikować możliwość dodatkowego zwiększenia aktywności zidentyfikowanych przeze mnie inhibitorów. Ogólnie rzecz biorąc, inhibitor wiązany jest przez białko w sposób odwracalny, tworząc wiązania niekowalencyjne. Istnieją jednak związki, które wiązane są przez białka w sposób nieodwracalny. Związki te posiadają grupy funkcyjne, który umożliwiają im utworzenie wiązania kowalencyjnego z resztami bocznymi aminokwasów, znajdującymi się na powierzchni białka lub w jego kieszeni wiążącej. Po związaniu z białkiem, związki te całkowicie zatrzymują jego aktywność. Związki tego typu nazywane są inhibitorami kowalencyjnymi lub

inhibitorami samobójczymi (*ang. Suicide inhibitors*). Istnieje wiele typów reakcji chemicznych, których mechanizmy są wykorzystywane do projektowania inhibitorów kowalencyjnych. Jednym z przykładów takiej reakcji chemicznej jest reakcja typu *click*. Jednakże, w powszechnie stosowanej w warunkach komórkowych reakcji *click*, SPAAC (*ang. Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*), w celu połączenia dwóch molekuł wiązaniem kowalencyjnym, wymagane jest wprowadzenie grup funkcyjnych do obu z nich. Z pomocą przychodzi nowy typ reakcji *click*- SuFEX (*ang. Sulfur (VI) Fluoride Exchange*), który wymaga wprowadzenia grupy funkcyjnej jedynie po stronie inhibitora. Reakcja typu SuFEX, której mechanizm został dokładnie opisany w części literaturowej ([Rozdział II.9.1.](#)) zachodzi pomiędzy fluorkiem sulfonylu (SO_2F) lub fluorosiarczanem (SO_3F), a nukleofilem. W przypadku białek, nukleofilami są aminokwasy, które w łańcuchu bocznym posiadają terminalną grupę aminową lub hydroksylową. W oparciu o zidentyfikowane przeze mnie preferencje substratowe i inhibitorowe enzymu cN-IIIB, dr Mikołaj Chromiński (Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW), zaprojektował i zsyntetyzował benzytowe analogi 5'-monofosforanu guanozyny posiadające w obrębie pierścienia benzyłowego grupy SO_2F i SO_3F . W rezultacie powstały cztery analogi Bn^7GMP z grupą funkcyjną reaktywną w reakcjach typu SuFEX oraz analog m^7GMP , do którego grupa SO_2F została przyłączona za pomocą etylowego łącznika (ESF ^7GMP). Struktury tych związków przedstawiłem na [rysunku 85](#). Założeniem tego projektu było wytworzenie związków, które będą się trwale, wiązaniem kowalencyjnym, wiązać w miejscu aktywnym enzymu cN-IIIB ([Rysunek 86](#))



Rysunek 85. Struktury chemiczne SuFEx-owych analogów Bn^7GMP - potencjalne, kowalencyjne inhibitory enzymu cN-IIIB.

Dla otrzymanych związków zbadałem własności inhibitorowe względem enzymu cN-IIIB za pomocą analizy zieleni malachitowej. Wykonałem także eksperymenty mające na celu weryfikację tworzenia kowalencyjnego połączenia z enzymem za pomocą spektrometrii mas.

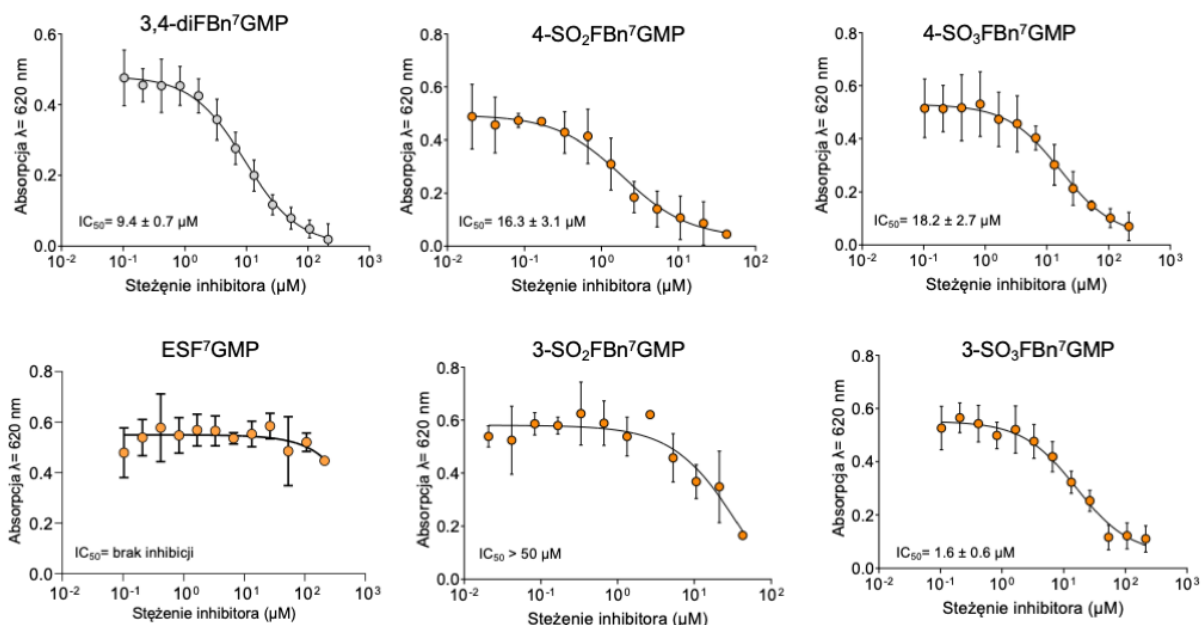


Trwałe wiązanie kowalencyjne w kieszeni wiążącej enzymu *cN-IIIB*

Rysunek 86. Schematyczne przedstawienie idei kowalencyjnych inhibitorów enzymu *cN-IIIB*.

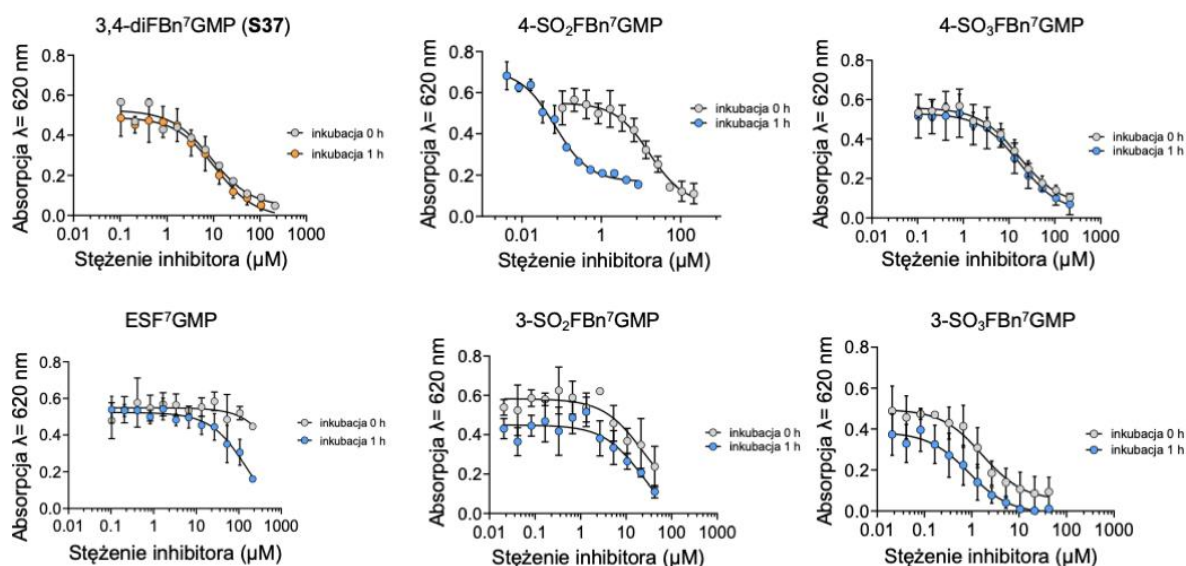
III.9.1 Wyznaczenie parametru IC_{50} dla fluorosulfonowych i fluorosiarczanowych pochodnych m^7GMP i Bn^7GMP przy użyciu analizy zielenią malachitową

Aby zbadać właściwości inhibitorowe „SuFEX-owych” analogów Bn^7GMP (Rysunek 85) względem enzymu *cN-IIIB*, wyznaczyłem dla nich parametr IC_{50} przy różnych stężeniach potencjalnych inhibitorów. Początkowo, parametr IC_{50} wyznaczyłem w takich samych warunkach jak w przypadku I i II biblioteki inhibitorów enzymu *cN-IIIB* (Rozdział III.4.2.), tj. dodając enzym do mieszaniny inhibitora i substratu. parametr IC_{50} wyznaczyłem dla związku ESF^7GMP oraz SuFEX-owych analogów Bn^7GMP , w których grupa SO_2F lub SO_3F była podstawiona w pozycji *para* lub *meta* pierścienia fenyłowego. Uzyskane wartości parametru IC_{50} porównałem z wartością IC_{50} uzyskaną dla najsilniejszego inhibitora enzymu *cN-IIIB*, związku (**S37**), którego wartość w tym eksperymencie wyniosła $9.4 \pm 0.7 \mu M$. Na rysunku 87 przedstawiłem otrzymane krzywe inhibicji. Porównując otrzymane krzywe, z krzywą inhibicji dla otrzymaną dla związku (**S37**), widać, że właściwości inhibitorowe SuFEX-owych analogów Bn^7GMP , w których grupy SuFEX zostały podstawione w pozycji *para* pierścienia fenyłowego, ($4-SO_2FBn^7GMP$ oraz $4-SO_3FBn^7GMP$) są zbliżone do właściwości inhibitorowych najlepszego inhibitora enzymu *cN-IIIB*. Rozbieżność wartości parametru IC_{50} , dla związków ($4-SO_2FBn^7GMP$ oraz $4-SO_3FBn^7GMP$), są bardzo małe i wynoszą kolejno $16.3 \pm 3.1 \mu M$ i $18.2 \pm 2.7 \mu M$. Uzyskane wartości parametru IC_{50} są nieco wyższe niż dla związku **S37**, którego parametr IC_{50} w tym eksperymencie wyniósł $9.4 \pm 0.7 \mu M$. Związek ESF^7GMP nie był inhibitorem enzymu *cN-IIIB* w badanym zakresie stężeń. Spośród związków SuFEX, posiadających grupy SO_2F i SO_3F w pozycji *meta*, silniejszym inhibitorem okazał się być związek $3-SO_3FBn^7GMP$. Wartość parametru IC_{50} dla tego związku wyniosła $1.6 \pm 0.6 \mu M$, czyli blisko 6 razy mniej niż dla związku **S37** ($9.4 \pm 0.7 \mu M$). Z kolei, wartość parametru dla związku $3-SO_2FBn^7GMP$ była wyższa niż $50 \mu M$.



Rysunek 87. Krzywe inhibicji uzyskane dla SuFEX-owych analogów m^7GMP i Bn^7GMP w obecności enzymu *cN-IIIB*.

Następnie, przeprowadziłem kolejny eksperyment, mający na celu wstępną weryfikację tworzenia kowalencyjnych połączeń z białkiem przez badane inhibitory. Tworzenie kowalencyjnego wiązania z enzymem jest reakcją chemiczną, której kinetyka nie musi być natychmiastowa. Z tego powodu eksperyment wyznaczania parametru IC_{50} przeprowadziłem również w zmienionych warunkach. Aby sprawdzić czy SuFEx-owe analogi Bn^7GMP mogą tworzyć wiązanie kowalencyjne z enzymem *cN-IIIB*, zmieniłem kolejność dodawania reagentów do mieszaniny reakcyjnej. W pierwszej kolejności, przez 60 min inkubowałem potencjalne inhibitory (ESF^7GMP , $4-SO_2Fbn^7GMP$, $3-SO_2Fbn^7GMP$, $4-SO_3Fbn^7GMP$ oraz $3-SO_3Fbn^7GMP$) z enzymem *cN-IIIB* w buforze reakcyjnym w temp. 30 °C. Następnie, do mieszaniny dodawałem substrat (m^7GMP) i kontynuowałem inkubację przez standardowy czas (45 min), po czym oznaczałem ilość uwolnionego fosforanu i wyznaczałem krzywą inhibicji. Oczekiwałem, że w przypadku związków tworzących kowalencyjne połączenie z enzymem, godzinna preinkubacja z enzymem przed dodaniem substratu może obniżyć obserwowaną wartość IC_{50} w związku z częściową lub całkowitą nieodwracalną dezaktywacją enzymu. Reakcją kontrolną w tym eksperymencie była reakcja defosforylacji m^7GMP w obecności związku (**S37**), który nie ma możliwości wytworzenia wiązania kowalencyjnego z enzymem.



Rysunek 88. Krzywe inhibicji uzyskane dla potencjalnych inhibitorów enzymu *cN-IIIB*. Porównanie parametrów IC_{50} w warunkach, w których inhibitor był uprzednio inkubowany z enzymem *cN-IIIB* przez 1 h w 30 °C.

Tabela 7. Wartości parametru IC_{50} uzyskane dla związków typu SuFEX względem enzymu *cN-IIIB*. Wartości przedstawiają średnią z 3 powtórzeń.

Związek	$IC_{50} \pm SD$ (μM) bez inkubacji	$IC_{50} \pm SD$ (μM) z inkubacją
ESF ⁷ GMP	>200	>200
4-SO ₂ FBn ⁷ GMP	16.2 $\pm$ 4.0	0.067 $\pm$ 0.011
3-SO ₂ FBn ⁷ GMP	>50	>50
4-SO ₃ FBn ⁷ GMP	16.9 $\pm$ 5.7	16.3 $\pm$ 2.9
3-SO ₃ FBn ⁷ GMP	1.6 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.3
3,4-diFBn ⁷ GMP (S37)	10.8 $\pm$ 2.8	10.9 $\pm$ 1.9

W nowych warunkach reakcji enzymatycznej, w których inhibitory preinkubowano z enzymem przed rozpoczęciem reakcji, wartość parametru IC_{50} zmieniała się w przypadku związku 4-SO₂FBn⁷GMP. Obliczona wartość parametru IC_{50} dla związku 4-SO₂FBn⁷GMP wyniosła 67 $\pm$ 16 nM, podczas gdy, wartość parametru IC_{50} bez prowadzenia preinkubacji z enzymem wynosiła 16.3 $\pm$ 3.1 μM . Uzyskana wartość parametru IC_{50} , jest porównywalna ze stężeniem enzymu zastosowanym w reakcji (ok. 80 nM). Wynik ten sugeruje, że związek 4-SO₂FBn⁷GMP jest kowalencyjnym inhibitorem enzymu *cN-IIIB*. W przypadku związków z podstawnikami sulfonowymi i sulfonianowymi w pozycji *meta*, wcześniejsza inkubacja z enzymem nie wpłynęła znacząco na wartości parametru IC_{50} . Wartość parametru IC_{50} dla związku 3-SO₃FBn⁷GMP obniżyła się z wartości 1.6 $\pm$ 0.6 μM do 0.9 $\pm$ 0.3 μM .

Ten nieznaczny spadek może sugerować, że związek ten nie wytwarza wiązania kowalencyjnego z enzymem *cN-IIIB* lub kinetyka utworzenia tego wiązania jest inna niż w przypadku związku 4-SO₂FBn⁷GMP i związek ten potrzebuje dłuższego czasu inkubacji z białkiem. Z kolei wartość parametru IC_{50} dla związku 3-SO₂FBn⁷GMP nie zmieniała się pod

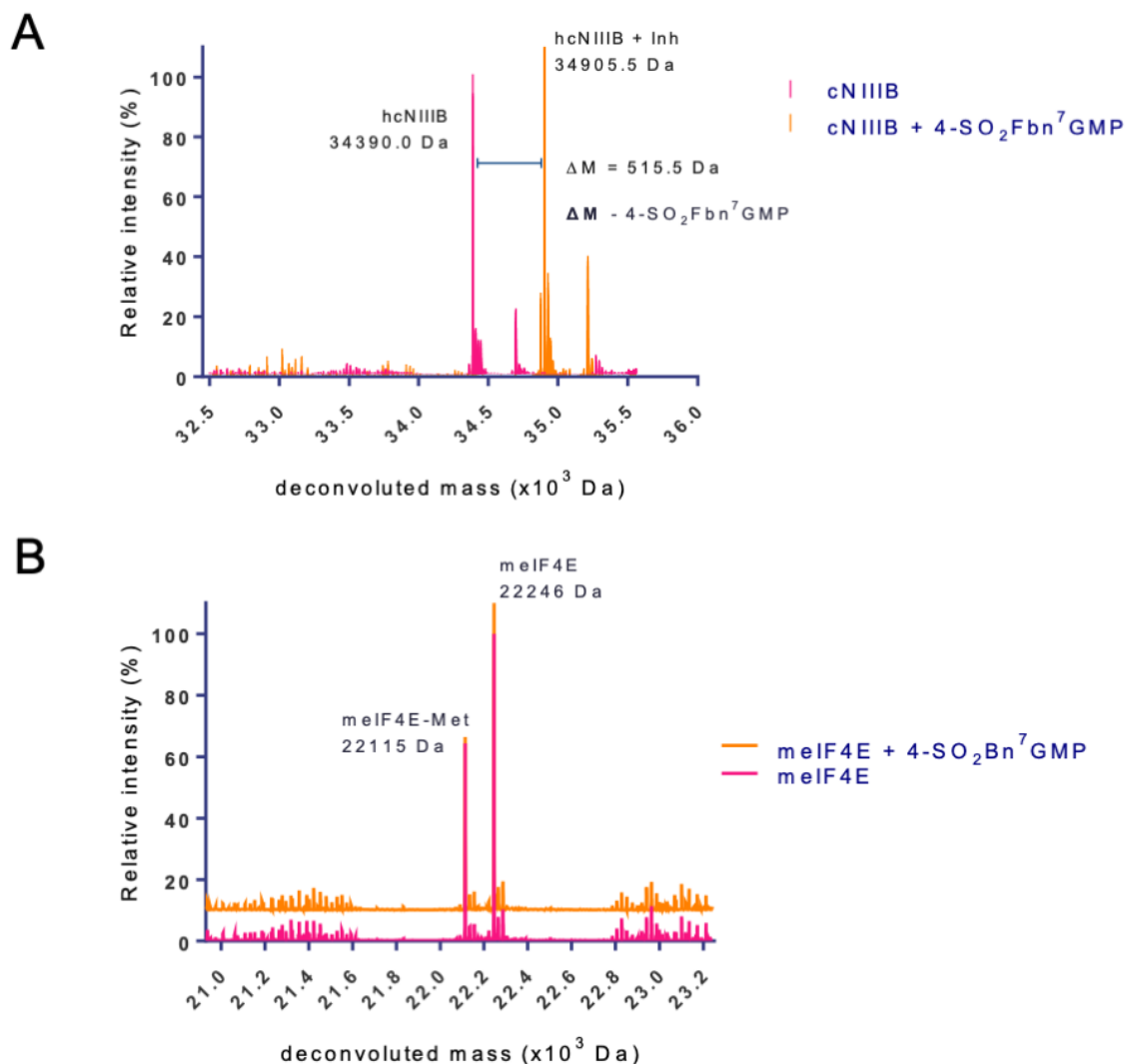
wpływem inkubacji. Inkubacja związku ESF^7GMP z enzymem cN-IIIB, przez 1 h, spowodowała nieznacznym obniżeniem wartości IC_{50} . Pomimo obniżenie wartości IC_{50} , związek ESF^7GMP jest bardzo słabym inhibitorem enzymu cN-IIIB. Spadek wartości IC_{50} , w tym przypadku spowodowany jest prawdopodobnie rozpadem ESF^7GMP , który jest niestabilny w $\text{pH} > 5$. Grupa SO_2F w tym związku, pod wpływem $\text{pH} > 5$, ulega hydrolizie do grupy SO_3 , w wyniku czego powstaje GMP z przyłączoną w pozycji N7 grupą $\text{C}_2\text{H}_4\text{SO}_3$, który wykazuje nieznacznie większą aktywność względem enzymu cN-IIIB niż związek wyjściowy.

Analiza struktury krystalograficznej enzymu cN-IIIB z analogami Bn^7GMP wskazuje, że podstawienie pierścienia fenyłowego w pozycji *meta* może zwiększyć powinowactwo takiego związku do kieszeni wiążącej enzymu. Dlatego, związki $3\text{-SO}_2\text{FBn}^7\text{GMP}$ oraz $3\text{-SO}_3\text{FBn}^7\text{GMP}$, w teorii powinny być silniejszymi inhibitorami tego enzymu. Powyższe wyniki (bez preinkubacji enzymu z inhibitorem) potwierdzają tę teorię jedynie w przypadku związku $3\text{-SO}_3\text{FBn}^7\text{GMP}$, którego wartość parametru IC_{50} jest najniższa ($1.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$) w porównaniu do pozostałych testowanych związków. Jednak, porównując wyniki drugiego eksperymentu (preinkubacja enzymu z inhibitorem) znacznie silniejsze właściwości inhibitorowe wykazał związek $4\text{-SO}_2\text{FBn}^7\text{GMP}$ (podstawienie w pozycji *para*), który to zahamował całkowicie aktywność enzymu cN-IIIB. Wynik ten sugeruje, że związek ten mógł wytworzyć wiązanie kowalencyjne w kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB. Przyglądając się dokładniej strukturze kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB oraz aminokwasom ją tworzących przypuszczać można, że aminokwasem oddziałującym kowalencyjnie ze związkiem $4\text{-SO}_2\text{FBn}^7\text{GMP}$ jest kwas asparaginowy 77. Aminokwas ten jest w najbliższym otoczeniu pozycji *para*, gdzie przyłączona jest grupa SO_2F . W przypadku związku $3\text{-SO}_3\text{FBn}^7\text{GMP}$ grupa SO_3F jest zbyt dalekiej odległości od tego aminokwasu, aby wytworzyć wiązanie kowalencyjne. W celu potwierdzenia przypuszczeń, dotyczących utworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy związkami SuFEX ($4\text{-SO}_2\text{FBn}^7\text{GMP}$ oraz $3\text{-SO}_3\text{FBn}^7\text{GMP}$) a enzymem cN-IIIB, została przeprowadzona dodatkowy eksperyment przy użyciu spektrometrii mas.

III.9.2 Badanie wytwarzania wiązania kowalencyjnego w kieszeni wiążącej enzymu cN-IIIB i białka eIF4E przy użyciu spektrometrii mas

W poprzednim rozdziale opisałem wyniki eksperymentów dotyczących własności inhibitorowych SuFEX-owych analogów Bn^7GMP . W przypadku jednego z testowanych analogów, $4\text{-SO}_2\text{FBn}^7\text{GMP}$, jego własności inhibitorowe znacząco się poprawiły, po wcześniejszej inkubacji $4\text{-SO}_2\text{FBn}^7\text{GMP}$ z enzymem cN-IIIB. Wartość parametru IC_{50} obniżyła się z $16.3 \pm 3.1 \mu\text{M}$ do $67 \pm 16 \text{ nM}$. Obniżenie wartości parametru IC_{50} sugeruje, że zgodnie z założeniami, związek $4\text{-SO}_2\text{FBn}^7\text{GMP}$ może tworzyć wiązanie kowalencyjne z jednym z

aminokwasów będących w kieszeni wiążącej enzymu. Aby potwierdzić moje przypuszczenia, przeprowadziłem dodatkowy eksperyment z wykorzystaniem spektrometrii mas. Eksperyment ten polegał na zmierzeniu całkowitej masy enzymu w warunkach denaturujących, przed i po preinkubacji enzymu z potencjalnym kowalencyjnym inhibitorem. W tym celu, enzym cN-IIIB ($C=0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) oraz potencjalny kowalencyjny inhibitor ($C=0.03 \text{ mM}$) inkubowałem w roztworze buforowym (20 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2) przez 30 min. Po inkubacji, nadmiar potencjonalnego inhibitora został usunięty z roztworu za pomocą chromatografii wykluczenia. Zatężony próbkę poddano badaniom metodą spektrometrii mas w warunkach denaturujących w celu wyznaczenia masy cząsteczkowej białka. Próbą odniesienia było białko inkubowane w buforze bez inhibitora. Pomiary MALDI-MS zostały wykonane w Środowiskowym Laboratorium spektrometrii mas w Instytucie Biofizyki i Biologii (IBB). Uzyskane wyniki pokazują, że w wyniku inkubacji ze związkiem 4-SOF₂Bn⁷GMP, masa białka zwiększyła się o m/z 515.5 Da, co odpowiada dokładnie masie inhibitora pomniejszonej o cząsteczkę HF, która odłącza się w reakcji kondensacji ([Rysunek 89A](#)). Z otrzymanych wyników można zatem wnioskować, że związek 4-SOF₂Bn⁷GMP wiąże się trwale z enzymem cN-IIIB. W przypadku związku 3-SO₃FBn⁷GMP, którego wartość parametru IC₅₀ w wyniku preinkubacji z białek obniżyła się, masa kompleksu białko-ligand nie zmieniała się względem masy samego białka. Taki sam efekt zaobserwowałem również w przypadku związków (4-SO₃FBn⁷GMP, oraz 3-SO₂FBn⁷GMP). Dodatkowo sprawdziłem czy związek 4-SO₂FBn⁷GMP może tworzyć wiązanie kowalencyjne z białkiem eIF4E, które również rozpoznaje strukturę Bn⁷GMP (4E-j)¹⁰². Próbkę przygotowałem poprzez inkubowanie białka eIF4E ($C=0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) z 4-SO₂FBn⁷GMP ($C=0.03 \text{ mM}$). Otrzymane widmo masowe dla białka eIF4E, przed i po inkubacji z ze związkiem 4-SO₂FBn⁷GMP nie zmieniło się (brak zmiany masy białka)([Rysunek 89B](#)), co świadczy o tym, że związek ten kowalencyjnie wiąże się wyłącznie z enzymem cN-IIIB, ma więc szansę być wysoce selektywny w badaniach komórkowych. Obecnie trwają prace nad uzyskaniem struktury krystalograficznej związku 4-SO₂FBn⁷GMP z enzymem cN-IIIB oraz badania mające na celu weryfikację jego zdolności do nieodwracalnej inhibicji w warunkach *in vivo*.



Rysunek 89. Widma masowe (MALDI) uzyskane dla białek inkubowanych z 4-SO₂Bn⁷GMP. **A.** Widma masowe enzymu cN-IIIB. Kolorem różowym zaznaczono widmo enzymu, które nie było inkubowane ze związkiem 4-SO₂Fbn⁷GMP; kolorem pomarańczowym zaznaczono widmo masowe enzymu wykonane po inkubacji ze związkiem; **B.** Odpowiednie widma masowe białka eIF4E.

III.10 Podsumowanie pierwszej części rozprawy doktorskiej dotyczącej enzymu cN-IIIB

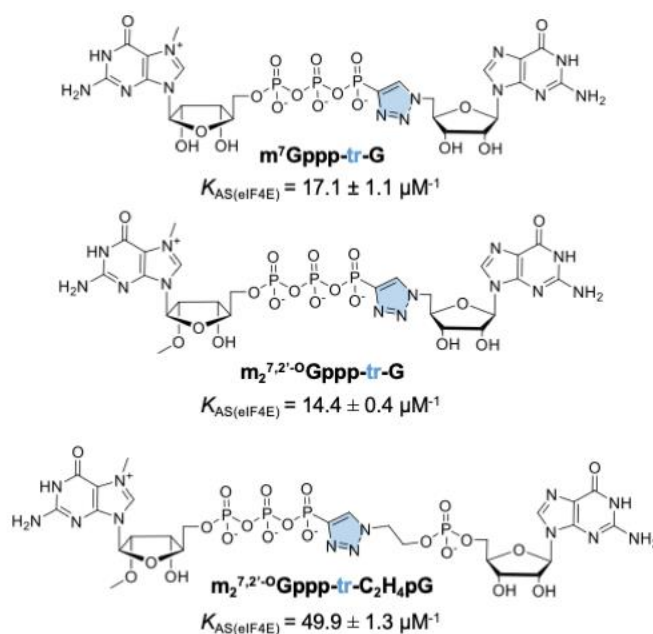
Pierwsza część badań własnych niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczyła badań nad poszukiwaniem nukleotydowych inhibitorów enzymu cN-IIIB, które mogłyby być wykorzystane jako narzędzie służące do poznania roli tego enzymu w degradacji metabolitów końca 5' mRNA. W ramach projektu dotyczącego enzymu cN-IIIB skolekcjonowałem cztery biblioteki związków pochodzenia nukleotydowego (przeszło 60 związków) i zbadałem ich właściwości substratowe i inhibitorowe względem enzymu cN-IIIB. Część związków z czterech bibliotek związków została przeze mnie zsyntezowana i scharakteryzowana osobiście. Pierwszym istotnym odkryciem było znalezienie dwóch inhibitorów enzymu cN-IIIB, będących pochodnymi

Bn⁷GMP. Były to związki 3Me-Bn⁷GMP ($IC_{50}= 2.3 \pm 0.3 \mu M$) i 3,4diFBn⁷GMP ($IC_{50}= 2.5 \pm 0.2 \mu M$), które hamowały aktywność enzymu cN-IIIB znacznie wydajniej niż pierwszy inhibitor tego enzymu – m⁷G-triazolP ($IC_{50}= 101.8 \pm 7.8 \mu M$). Znalezione przeze mnie związki 3Me-Bn⁷GMP i 3,4diFBn⁷GMP okazały się być selektywne względem enzymu cN-IIIA ($SI= 0.2$) i białka eIF4E ($SI= 0.1$ oraz 0.6). Związki 3Me-Bn⁷GMP i 3,4diFBn⁷GMP zostały wykorzystane w badaniach biofizycznych i biologicznych, dzięki którym udało się otrzymać pierwszą strukturę krystalograficzną ludzkiego enzymu cN-IIIB ($1.36 \text{ \AA}$; PDB id: 7ZEE), ($1.5 \text{ \AA}$; PDB id: 7ZEH) oraz ($1.56 \text{ \AA}$; PDB id: 7ZEG) oraz poznać jego mechanizm działania. Aby móc kontrolować aktywność enzymu cN-IIIB w żywych komórkach, związki 3Me-Bn⁷GMP i 3,4diFBn⁷GMP przekształciłem w pronukleotydy. Zsyntezowałem oraz potwierdziłem struktury trzech pronukleotydów, które w przyszłości zostaną wykorzystane do badań w żywych komórkach. Ostatnim i bardzo istotnym odkryciem było znalezienie kowalencyjnego inhibitora enzymu cN-IIIB (4-SO₂FBn⁷GMP, $IC_{50}=67 \pm 11 \text{ nM}$). Związek ten, dzięki grupie sulfonowej (SO₂F) wiązał się trwale z enzymem hamując całkowicie jego aktywność (*ang. suicide inhibitor*), co zostało potwierdzone za pomocą spektrometrii mas. Wedle mojej wiedzy jest to najsilniejszy znaleziony inhibitor enzymu cN-IIIB. Badania dotyczące kowalencyjnego inhibitora, w chwili pisania niniejszej rozprawy, są kontynuowane, a wyniki tych badań zostaną wkrótce opublikowane.

III.11 Triazolowe analogi kapu jako narzędzia do badania procesu translacji mRNA

Druga część mojego projektu doktorskiego dotyczyła opracowania syntezy tri- i tetranukleotydowych analogów końca 5' mRNA przy użyciu reakcji cykloaddycji azydkowo – alkinowej katalizowanej jonami miedzi (I) (CuAAC). Trinukleotydowe analogi końca 5' mRNA, o wzorze m⁷GpppN¹pN², są od kilku lat intensywnie wykorzystywane jako substraty do syntezy funkcjonalnego mRNA przy użyciu reakcji transkrypcji *in vitro* (IVT). Trinukleotydowe analogi końca 5' mRNA są wbudowywane do łańcucha RNA z wydajnością większą niż analogi dinukleotydowe (trinukleotydy 80-90%, dinukleotydy 30%-80%, w zależności od struktury i warunków). Ponadto, mRNA zakończone na końcu 5' trinukleotydowym analogiem kapu może ulegać translacji znacznie wydajniej niż w przypadku dinukleotydowego analogu kapu⁸. Jednak tradycyjne podejście syntetyczne otrzymywania trinukleotydowych analogów kapu z wykorzystaniem P-imidazolidu nukleotydów jest czasochłonne i często mało wydajne. Fakt ten, zmotywował mnie do opracowania alternatywnej szybszej i bardziej wydajnej syntezy trinukleotydowych analogów kapu. Do opracowania alternatywnej ścieżki syntezy trinukleotydowych analogów kapu postanowiłem wykorzystać koncepcję chemii click -reakcję cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowanej jonami miedzi (I) (*ang. Copper catalized azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC). Wykorzystanie koncepcji chemii click do syntezy analogów

kapu zostało wcześniej zbadane przez dr Sylwię Ciechanowicz w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW. Wykonane badania opisywały zastosowanie reakcji CuAAC w syntezie dinukleotydowych analogów kapu oraz wykorzystanie otrzymanych związków do badań biologicznych dotyczących translacji i degradacji mRNA. Zastosowanie alternatywnej ścieżki syntezy analogów kapu znacząco skróciło proces syntezy względem klasycznego podejście z udziałem *P*-imidazolidu. Otrzymane wówczas dinukleotydowe analogi kapu posiadały w obrębie łańcucha oligofosforanowego ugrupowanie triazolowe, które jak pokazały badania, pozwala na zachowanie wysokiej aktywności translacyjnej tych związków. Niektóre z otrzymanych dinukleotydowych analogów kapu posiadały wyższe powinowactwo do białka eIF4E niż niemodyfikowany kap ([Rysunek 90](#)). Związki posiadające ugrupowanie triazolowe w obrębie mostku oligofosforanowego były rozpoznawane przez polimerazę RNA, co umożliwiało ko-transkrypcyjne wbudowanie triazolowych analogów kapu do łańcucha RNA podczas reakcji transkrypcji *in vitro*. Jednak, położenie pierścienia triazolowego uwarunkowywało orientację w jakiej analog kapu włączany był do mRNA. Większość zbadanych związków niestety włączana była do mRNA w orientacji odwrotnej, co skutkowało otrzymaniem нефunkcjonalnego mRNA. Wprowadzenie do triazolowych analogów kapu modyfikacji zapewniającej włączenie go w orientacji poprawnej (ang. *anti-reverse cap analog*, ARCA) spowodowało obniżenie procentu kapingu, co skutkowało znacznym spadkiem wydajności syntezy mRNA.



Walczak i wsp. 2017 & 2018

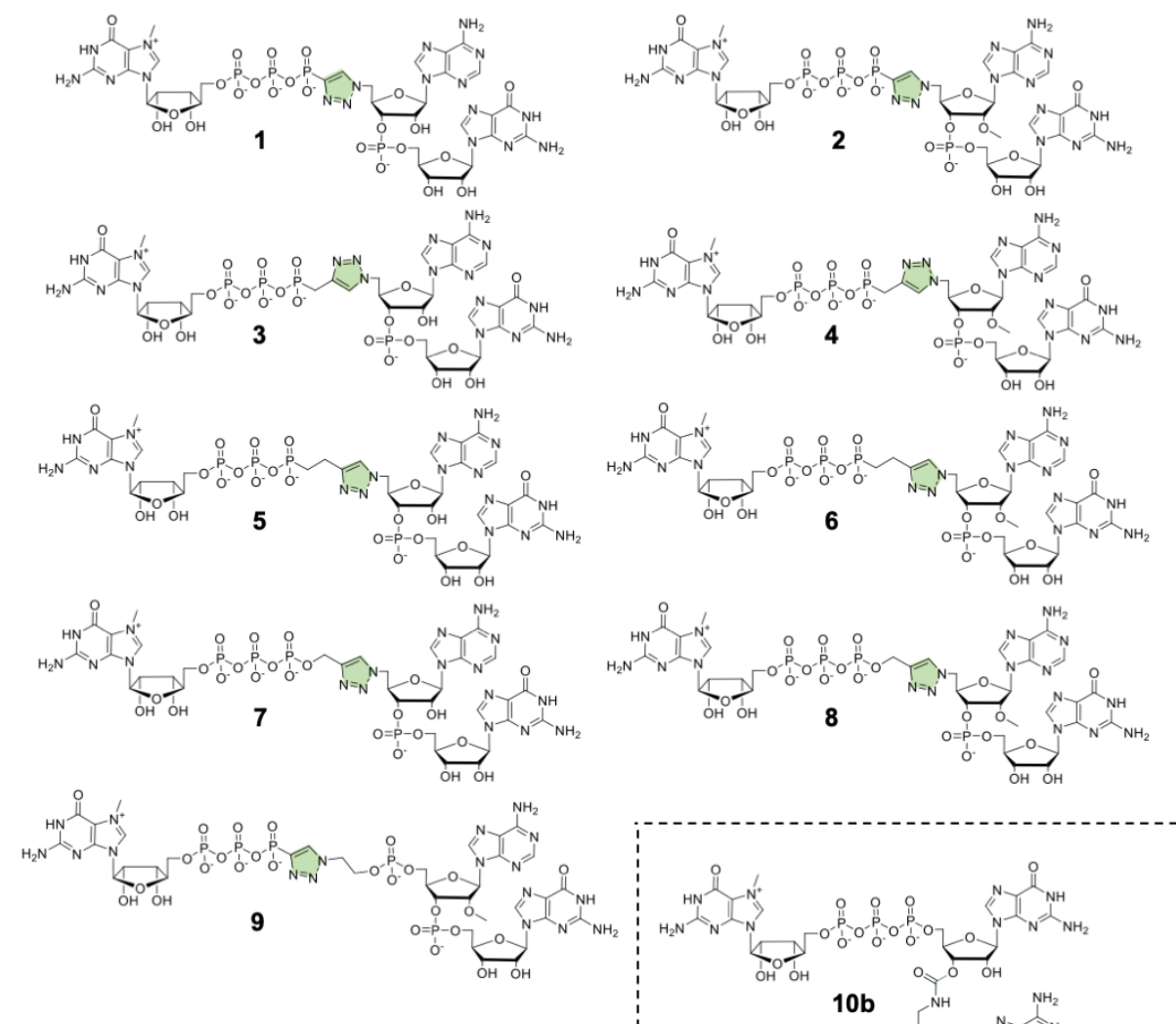
Rysunek 90. Przykłady struktur dinukleotydowych triazolowych analogów kapu opisanych w pracach Walczak i wsp.^{81, 114}. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kozarski i wsp.¹⁷¹

W ramach niniejszej pracy doktorskiej kontynuowałem badania dotyczące triazolowych analogów kapu syntezowanych przy użyciu reakcji CuAAC. Aby rozwiązać problem związany

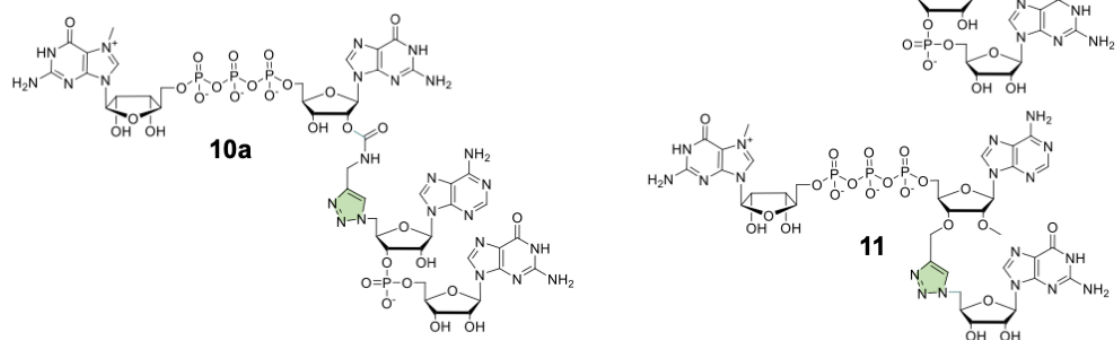
z włączenie triazolowych analogów kapu w odwrotnej orientacji do łańcucha RNA, zaproponowałem zupełnie nową klasę związków. W zaproponowanych przeze mnie związkach wykorzystałem reakcji CuAAC do syntezy tri- oraz tetranukleotydowych analogów kapu. Badania z 2020 roku (Sikorski i wsp.) pokazały, że trinukleotydowe analogi kapu, oparte na strukturze $m^7GpppNpG$ inicjują proces transkrypcji *in vitro* z udziałem polimerazy RNA T7 podobnie do dinukleotydowych analogów kapu (m^7GpppN). Wprowadzenie dodatkowego nukleotydu w obrębie kapu powoduje lepsze parowanie z matrycą DNA niż ma to miejsce w przypadku dinukleotydowego analogu kapu. Parowanie dodatkowego nukleotydu z matrycą DNA sprawia, że trinukleotydowy analog kapu wbudowywany jest do nici mRNA w poprawnej orientacji ze znacznie większą częstotliwością⁸. Zastosowanie trinukleotydowego analogu kapu umożliwia również wprowadzenie epigenetycznych metylacji w pozycji 2'-O rybozy pierwszego transkrybowanego nukleotydu⁸. Zaproponowana przeze mnie alternatywna ścieżka syntezy tri- i tetranukleotydowych analogów kapu przy użyciu reakcji CuAAC miała za zadanie nie tylko przyspieszyć i zwiększyć wydajność syntezy takich związków, ale również rozwiązać problem włączania triazolowych analogów kapu do RNA w odwrotnej orientacji.

Na podstawie doniesień literaturowych wstępnie zaprojektowałem 12 nowych związków, których struktury zostały przedstawione na [rysunku 91](#).

Modyfikacje mostkowe



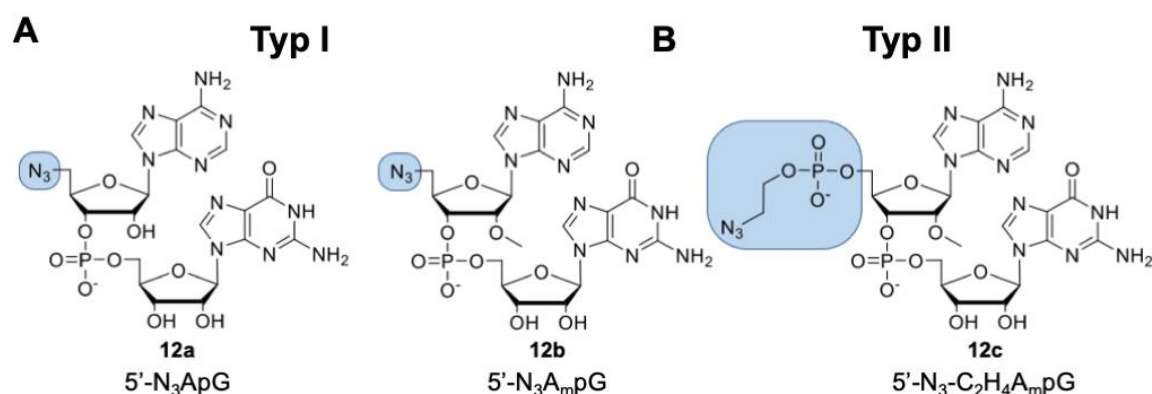
Modyfikacje fosfodiesterowe



Rysunek 91. Struktury wstępnie zaprojektowanych tri- i tetranukleotydowych triazolowych analogów kapu. Rysunek zaczerpnięty z publikacji Kozarski i wsp.¹⁷¹

III.11.1 Synteza dinukleotydów posiadających ugrupowanie azydkowe w pozycji 5' rybozy przy użyciu syntezy na podłożu stałym

W reakcji CuAAC, udział biorą dwie odpowiednio sfunkcjonalizowane podjednostki, które w wyniku reakcji katalizowanej miedzią (I) zostają połączone ze sobą z utworzeniem 1,4-podstawionego pierścienia 1,2,3-triazolowego. Tymi podjednostkami są związki posiadające terminalną grupę azydkową oraz alkinową. W przypadku zaprojektowanych przeze mnie trinukleotydowych analogów kapu prekursorowymi podjednostkami zawierającymi grupę azydkową były odpowiednio zaprojektowane analogi dinukleotydów. Analogi te były pochodnymi dinukleotydu złożonego adenozyyny lub 2'-O-metyloadenozyyny oraz guanozyyny (ApG lub A_mpG). Zaprojektowałem dwa rodzaje dinukleotydów różniące się miejscem przyłączenia grupy azydkowej. W pierwszym rodzaju dinukleotydu grupa azydkowa była bezpośrednio połączona z pierścieniem rybozy w pozycji 5' (N₃-ApG oraz N₃-A_mpG). Z kolei, drugi rodzaj dinukleotydów posiadał dodatkową grupę fosforanową w pozycji 5', do której grupa azydkowa została przyłączona wiązaniem fosfoestrowym poprzez łącznik etylenowy, (N₃-C₂H₄pA_mpG)(Rysunek 92).

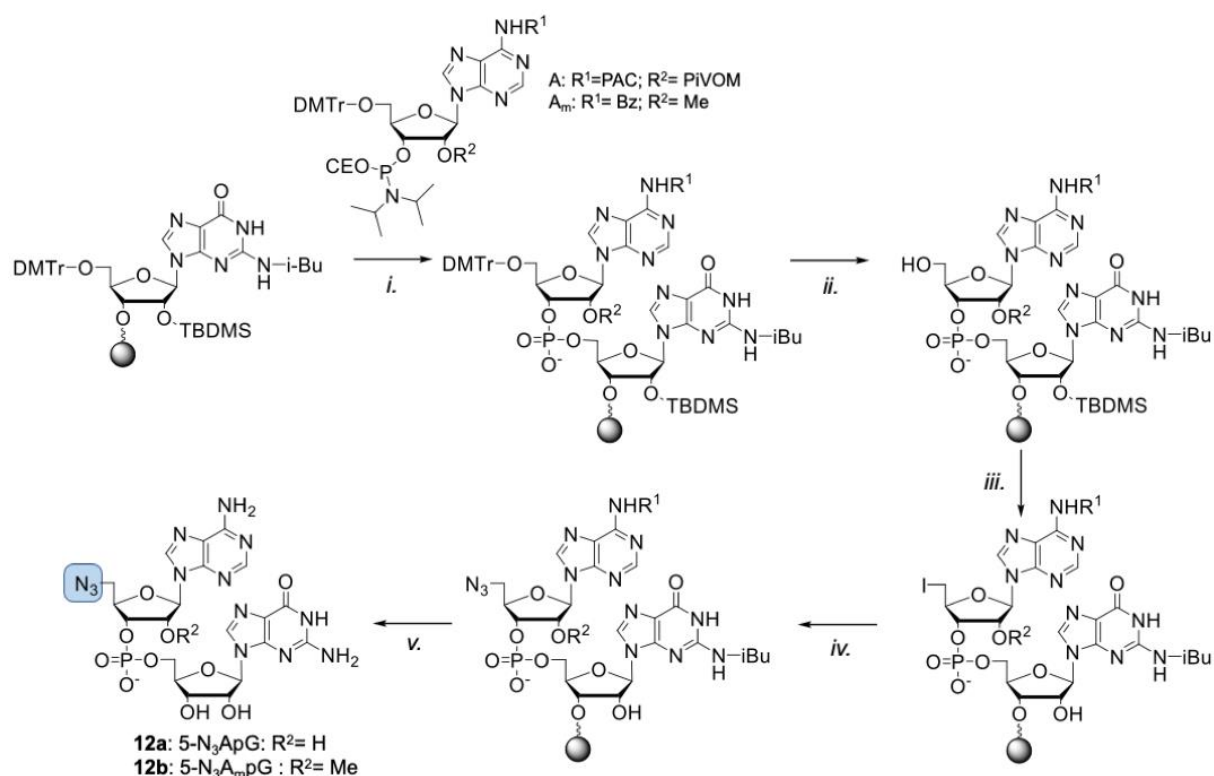


Rysunek 92. Struktury chemiczne otrzymanych dinukleotydów z ugrupowaniem azydkowym **A**. Typ I – dinukleotydy z grupą azydkową połączoną bezpośrednio z pierścieniem rybozy; **B**. Rodzaj II – dinukleotyd posiadające dodatkową resztę fosforanową, do której grupa azydkowa została przyłączona za pomocą dwuwęglowego łącznika.

III.11.1.1 Synteza dinukleotydów na podłożu stałym

Syntezę modyfikowanych dinukleotydów z ugrupowaniem azydkowym w pozycji 5' przeprowadziłem przy użyciu syntezy na podłożu stałym z wykorzystaniem amidofosforynów^{172, 173}. W pierwszej kolejności zsyntezowałem dinukleotydy, w których azydek był bezpośrednio połączony z pierścieniem rybozy (Rysunek 92, Rozdział III.11.1.). Synteza tych azydkowych pochodnych dinukleotydów składała się z dwóch głównych etapów. Pierwszym etapem była synteza przy użyciu automatycznego syntetyzera (DNA/RNA ÅKTA Oligopilot plus 10 synthesizer; GE Healthcare) za pomocą, którego syntezowałem dinukleotydy zakończone grupą hydroksylową (5'-OH). Drugim etapem syntezy była synteza manualna, prowadząca do zastąpienia grupy 5'-OH ugrupowaniem azydkowym (5'-N₃;

Rysunek 93). Do syntezy dinukleotydów wykorzystałem handlowo dostępne amidofosforyny adenozynowe (5'-O-DMTr-2'-OPiVOM-3'-amidofosforyn adenozyny oraz 5'-O-DMTr-2'-OMe-3'-amidofosforyn adenozyny). Syntezę przeprowadziłem na podłożu polistyrenowym, gdzie nukleozydem przyłączonym do podłoża była guanozyna zabezpieczona w pozycji 5'-OH grupą 4,4'-dimetoksytrytylową (DMTr), w pozycji 2'-OH grupą siliolową (*tert*-butyldimetylsilil, TBDMS) oraz grupą izobutyrylową (*i*Bu) w pozycji 2-NH₂ zasady azotowej (Rysunek 93). Synteza przy użyciu automatycznego syntetyzera składała się z jednego pełnego cyklu, który obejmował detrytylację grupy 5' hydroksylowej 3% kwasem dichlorooctowym (DCA 3%), aktywację oraz sprzęganie z odpowiednim amidofosforynem oraz utlenianie fosforanu (III) do fosforanu (V) za pomocą utleniacza, którym w tym przypadku był 0,05 M jod w pirydynie. Mechanizmy reakcji przebiegających podczas syntezy na podłożu stałym opisałem w części literaturowej (Rozdział II.4.3.).



Rysunek 93. Schemat syntezy dinukleotydów z grupą azydkową przyłączoną bezpośrednio w pozycji 5' rybozy. Etapy syntezy *i*. Detrytylacja – kwas dichlorooctowy (DCA) 3%, Aktywacja amidofosforynu i reakcja sprzęgania – 5-benzyltiol-1H-tetrazol, Utlenianie grupy fosforanowej – 0.05 M roztwór jodu w pirydynie; *ii*. Detrytylacja – kwas dichlorooctowy (DCA) 3%; *iii*. Jodowanie pozycji 5'-OH - (Ph₃PCH₃⁺I⁻) w DMF; *iv*. Azydowanie – nasycony roztwór NaN₃ w DMF, 1 h, 60 °C; *v*. Odbezpieczanie oraz odcinanie od złoza – roztwór amoniak : metyloamina (AMA) (1:1, v/v).

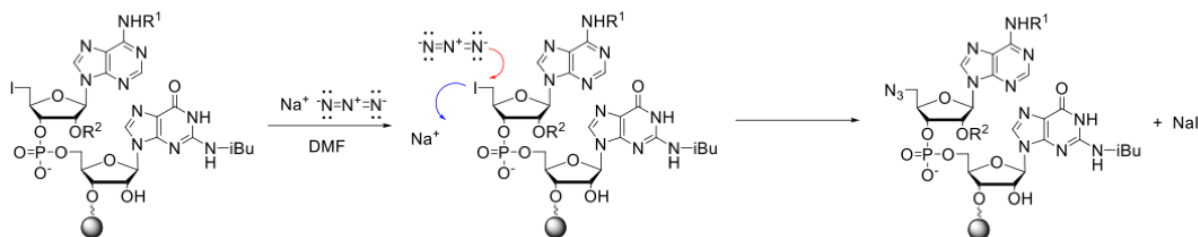
Po otrzymaniu dinukleotydów o sekwencji 5'-OH-A_(m)pG, w kolejnym kroku zastąpiłem grupę hydroksylową w pozycji 5' grupą azydkową (5'-N₃). W tym celu, wykorzystałem metodę opracowaną przez Warmińskiego i wsp., w której grupę azydkową w pozycji 5' wprowadza się w dwuetapowej reakcji na podłożu stałym¹⁷⁴. W pierwszym etapie grupę 5' hydroksylową podstawilem jodem przy użyciu roztworu jodku trifenoksymetylofosfonianowego (Ph₃PCH₃⁺I⁻)

w DMF. W warunkach reakcji, jedyną labilną grupą zabezpieczającą jest TBDMS, znajdujący się w pozycji 2' guanozyny, który jest usuwany w obecności jodków według mechanizmu przedstawionego poniżej ([Rysunek 94A](#)).

A

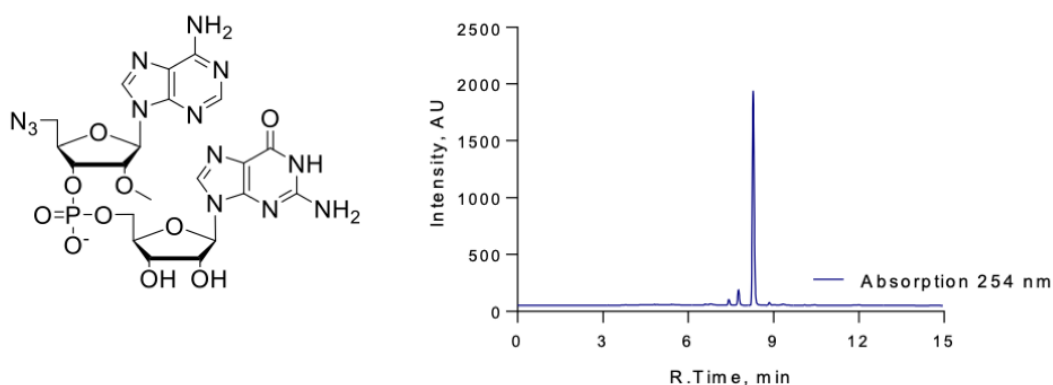
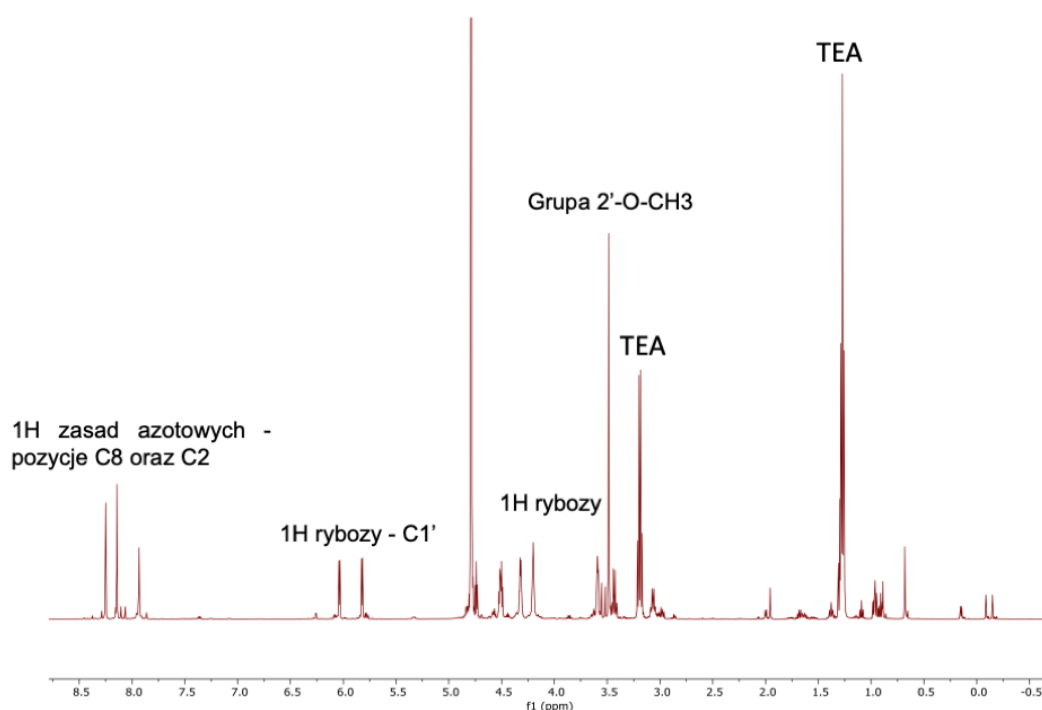


B



Rysunek 94. **A.** Mechanizm usuwania grupy zabezpieczającej TBDMS za pomocą jodków I⁻; **B.** Mechanizm reakcji podstawienia nukleofilowego azydku

Powstała w ten sposób wolna grupa hydroksylowa w pozycji 2' guanozyny mogłaby potencjalnie reagować z $\text{Ph}_3\text{PCH}_3^+\text{I}^-$. Aby uniknąć podstawienia grupy hydroksylowej w pozycji 2' jodem, w pracy Warmińskiego i wsp. zastosowano złożę CPG, w którym grupa 2'-OH została zabezpieczona grupą acetylową, które jest stabilna w warunkach reakcji jodowania¹⁷⁴. Jednakże w przypadku wykonywanych prze mnie syntez, skracając czas reakcji, udało mi się selektywnie zastąpić grupę hydroksylową w pozycji 5' jodem, jednocześnie usuwając grupę TBDMS z grupy hydroksylowej w pozycji 2' guanozyny i nie obserwując reakcji ubocznych. Kolejnym etapem syntezy dinukleotydów grupy I, było wprowadzenie azydku w pozycję 5' rybozy. 5'-Terminalny jod jest bardzo dobrą grupą odchodzącą, która w reakcji z nukleofilem, którym są jony azydkowe, ulega podstawieniu nukleofilowemu ([Rysunek 94B](#)). Po usunięciu nadmiaru odczynnika do jodowania poprzez przemycie podłoża odpowiednimi rozpuszczalnikami i wysuszeniu, złożę z przyłączonym dinukleotydem przenieśliśmy do próbówki i zawiesiliśmy w nasyconym roztworze azydku sodu (NaN_3) w DMF inkubując w temperaturze 60 °C. Po 1 h inkubacji, roztwór NaN_3 usunąłem poprzez wirowanie i dekantację. Dinukleotydy z modyfikacją azydkową w pozycji 5' rybozy odciąłem od podłoża z pomocą roztworu wodnego amoniaku (33%) i metyloaminy (40%) w stosunku objętościowym 1:1 (*ang. Ammonium Methylamine, AMA*). Związki (5'- N_3ApG oraz 5'- $\text{N}_3\text{A}_m\text{pG}$) oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej na anionitowym złożu *DEAE-Sephadex A-25*, w formie HCO_3^- . W rezultacie wyizolowałem pożądane związki z wydajnością 35-50%. Struktury otrzymanych dinukleotydów potwierdziłem za pomocą NMR ([Rysunek 95](#)). Otrzymane związki wykorzystałem do syntezy trinukleotydowych analogów kapu.

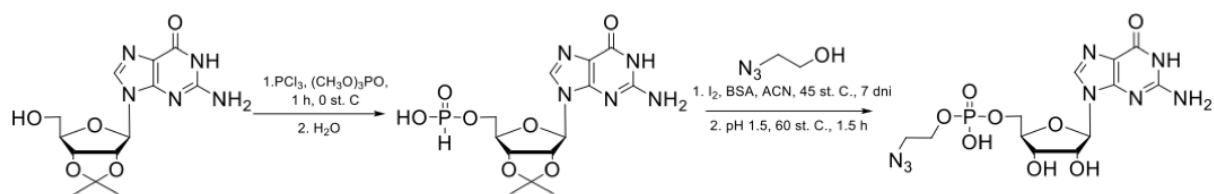
A**B**

Rysunek 95. Analiza struktury otrzymanego dinukleotydu z grupą azydkową przyłączoną bezpośrednio do rybozy. **A.** Struktura otrzymanego dinukleotydu oraz przykładowy profil RP HPLC. **B.** Widmo ¹H NMR dla związku 5'-N₃A_mpG (**12a**)

Po zakończeniu syntezy dinukleotydów z grupą azydkową w pozycji 5' rybozy, rozpocząłem syntezę dinukleotydu 5'-N₃-C₂H₄pA_mpG, zawierającego w pozycji 5' dodatkową grupę fosforanową, do której przyłączony był azydek. Mając jednak na uwadze ograniczenia syntezy na podłożu stałym za pomocą syntetyzera DNA/RNA, wynikające z budowy aparatury, syntezę przeprowadziłem w sposób manualny. Ograniczenia te dotyczą skali syntezy dinukleotydów. Głównym ograniczeniem syntetyzera DNA/RNA była ilość podłoża jaką można użyć jednorazowo podczas syntezy. Syntetyzer DNA/RNA, którego używałem posiada jedynie małą kolumnkę, w której umieszcza się podłoże RNA. Kolumna ta mieści zaledwie 160 mg podłoża, co przy obsadzeniu złoża 300 μmol/g, umożliwiło syntezę w skali 50 μmoli. Nałożenie większej ilości podłoża powodowało wzrost ciśnienia w aparaturze i skutkowało przerwaniem

syntezy. Dodatkowo, synteza oligonukleotydów przy użyciu automatycznego syntetyzera DNA/RNA wymaga dużych nadmiarów amidofosforynów (ok. 5-krotnego nadmiaru, względem nukleozydu przyłączonego do złoża). Zastosowana przeze mnie w przypadku 5'-N₃-C₂H₄pA_mpG synteza na podłożu stałym w sposób manualny nie posiada takich ograniczeń. Możliwe jest przeprowadzenie syntezy w dowolnej ilości. Dodatkowym atutem syntezy na podłożu stałym manualnie jest zmniejszenie ilości nadmiaru amidofosforynów o ponad połowę.

Syntezę na podłożu stałym przeprowadziłem w polistyrenowej strzykawce z filtrem, w której umieściłem ok. 600 mg podłoża, co odpowiada 200 μmol guanozyny. Manualna synteza dinukleotydu na podłożu stałym obejmowała te same etapy syntezy, co synteza wykonana z pomocą automatycznego syntetyzera. Po usunięciu grupy DMTr z pozycji 5'-OH guanozyny za pomocą 3% kwasu dichlorooctowego (DCA 3%), produkt poddałem reakcji sprzęgania z 5'-O-DMTr-2'-OMe-3'-amidofosforynem adenozyiny obecności BTT jako aktywatora przez 15 min. Następnie przeprowadziłem utlenianie fosforu (III) do fosforu (V) za pomocą 0.05 M roztworu jodu w pirydynie, po czym usunąłem grupy cyjanoetylową oraz DMTr przemywając podłoże 20% dietyloaminą w ACN oraz 3% DCA. W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymałem przytwierdzone do podłoża dinukleotydy o sekwencji A_mpG zakończone grupą 5' hydroksylową. Ostatnim etapem syntezy było przyłączenie fosfoestru z ugrupowaniem azydkowym. W pracy *Walczak i wsp.* opisano jedną z metod otrzymywania nukleotydów z grupą fosfoestrową¹¹⁴. Metoda ta obejmowała syntezę *H*-fosfonianu zabezpieczonego w pozycjach 2' oraz 3' nukleozydu, a następnie przeprowadzenie reakcji addycji nukleofilowej *H*-fosfonianu nukleozydu w obecności 2-azydoetanolu, jodu (I₂) *bis*-(trimetylosililo)-acetamidu (BSA) oraz TEA w acetonitrylu (*Rysunek 96*)¹¹⁴.

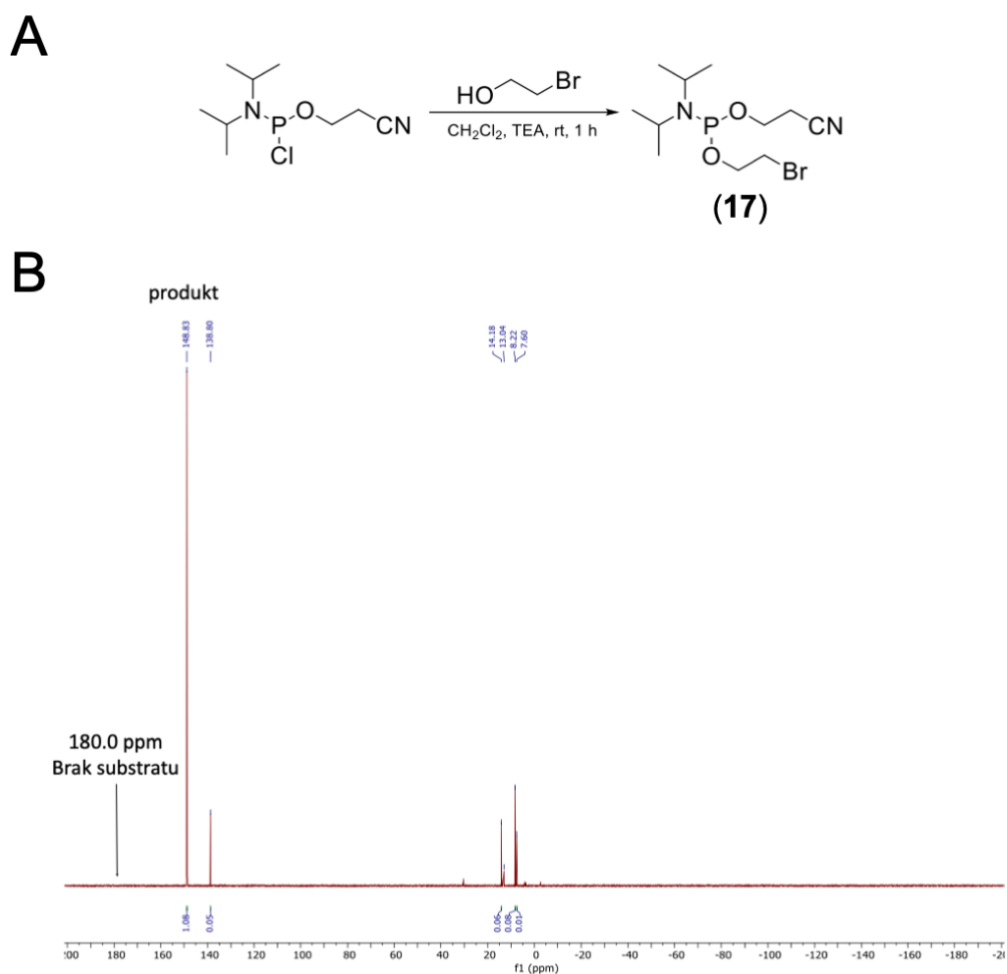


*Rysunek 96. Schemat syntezy fosfoestrowego analogu guanozyny z terminalną grupą azydkową wg. protokołu opisanego w pracy Walczak S. i wsp.*¹¹⁴

Według procedury opisanej w cytowanej pracy, reakcja addycji nukleofilowej *H*-fosfonianu 2-azydoetanolu trwa 7 dni i jest prowadzona w 45 °C. Długi czas reakcji w podwyższonej temperaturze uniemożliwiał zastosowanie tej metody do syntezy modyfikowanych dinukleotydów. W warunkach prowadzenia reakcji dinukleotyd mógłby ulec rozkładowi, z powodu hydrolizy wiązania fosfodiesterowego. Alternatywą było zastosowanie amidofosforylacji w syntezie związku N₃-C₂H₄pA_mpG. Jednakże, metoda ta wymagała zsyntezowania najpierw odpowiedniego amidofosforynu posiadającego grupę fosfoestrową sfunkcjonalizowaną podstawnikiem halogenoetylowym umożliwiającą w kolejnym etapie

wprowadzenie azydku w reakcji substytucji nukleofilowej. W tym celu otrzymałem był 2-cyanoetylo-2- bromoetylo-*N,N*-diisopropylamidofosforyn (**17**).

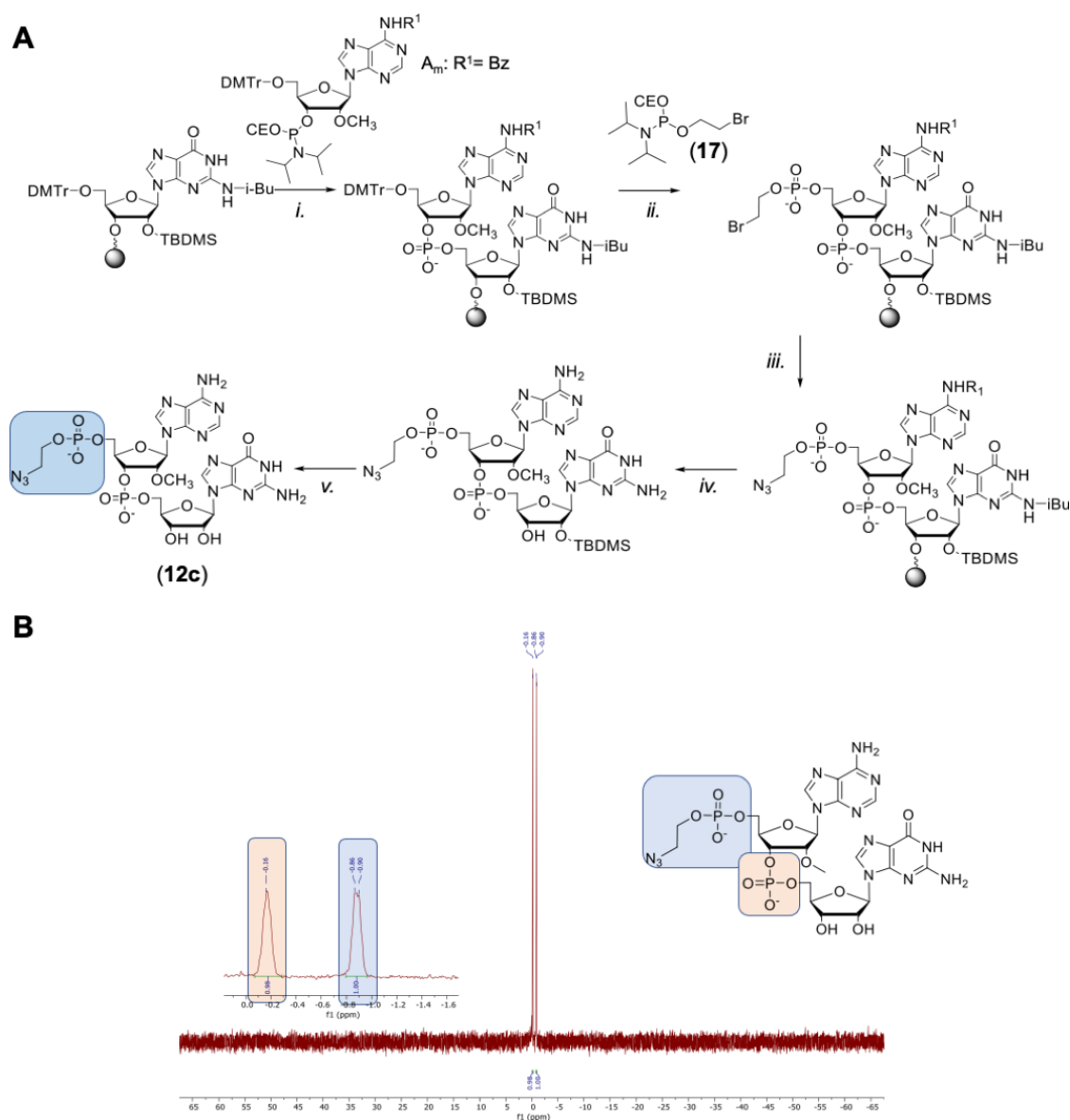
2-Cyanoetylo-2- bromoetylo-*N,N*-diisopropylamidofosforyn (**17**) otrzymałem w wyniku reakcji handlowo dostępnego 2-cyanoetylo-*N,N*-diisopropylchloramidofosforynu, który podstawilem 2-bromoetanolem w reakcji substytucji nukleofilowej w obecności trietyloaminy (TEA) (Rysunek 97A)¹⁷⁵. Czystość otrzymanego amidofosforynu potwierdziłem za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego na podstawie widma fosforowego (³¹P NMR; Rysunek 97B).



Rysunek 97. **A.** Schemat syntezy 2-cyanoetylo-2-bromoetylo-*N,N*-diisopropylamidofosforynu; **B.** Widmo ³¹P NMR otrzymanego związku.

Otrzymany amidofosforyn posłużył mi do syntezy dinukleotydu posiadającego grupę fosfoestrową z podstawnikiem bromoetylowym (Br-C₂H₄pA_{mp}G). W tym celu 2-cyanoetylo-2-bromoetylo-*N,N*-diisopropylamidofosforyn poddałem reakcji sprzęgania na podłożu stałym z uprzednio otrzymanym dinukleotydem zakończonym grupą 5'-OH w obecności BTT. W wyniku reakcji otrzymałem dinukleotyd posiadający terminalny brom (Br-C₂H₄pA_{mp}G), który w ostatnim etapie syntezy został podstawiony azydkiem. Brom, podobnie jak jod, jest dobrą grupą odchodzącą i ulega reakcji podstawienia nukleofilowego w obecności NaN₃ według

schematu przedstawionego na [rysunku 98A](#). Reakcję azydowania prowadziłem na podłożu stałym w nasyconym roztworze NaN_3 w DMF przez 1 h w 60 °C. Po reakcji azydowania, otrzymany dinukleotyd odciąłem od złoża za pomocą AMA przy jednoczesnym usunięciu grupy cyjanoetylowej. Po odcięciu od podłoża, otrzymany dinukleotyd (5'-N₃-C₂H₄pA_mpG, **12c**) poddałem reakcji usuwania ostatniej grupy ochronnej. W odróżnieniu do syntezy związków N₃-A_(m)pG, po odcięciu od złoża, związek (5'-N₃-C₂H₄pA_mpG, **12c**) wciąż posiadał grupę zabezpieczającą TBDMS, w pozycji 2'-O guanozyny. W celu usunięcia grupy TBDMS, zabezpieczony N₃-C₂H₄pA_mpG inkubowałem z TEA • 3HF w DMSO w 65 °C przez 2 h. Produkt ostateczny oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex A-25. Strukturę otrzymanego związku (**12c**) potwierdziłem za pomocą NMR ([Rysunek 98B](#)).

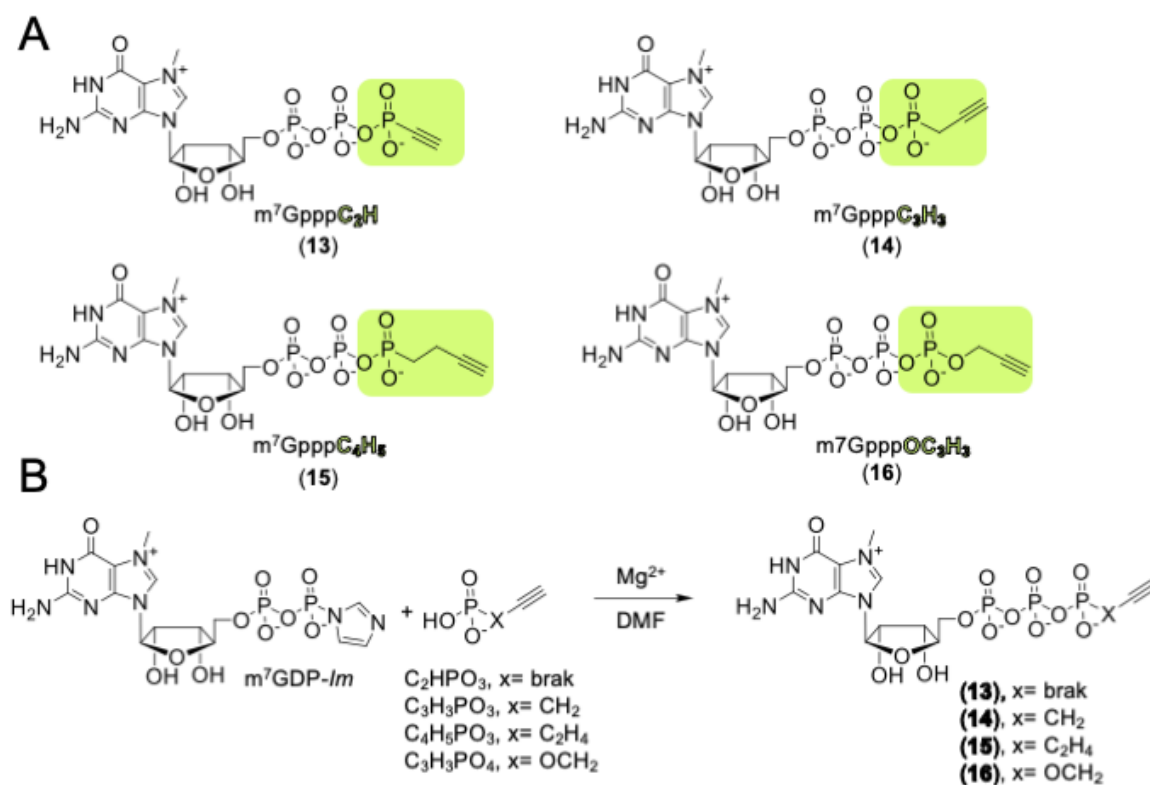


Rysunek 98. **A.** Schemat syntezy N₃-C₂H₄pA_mpG na podłożu stały z wykorzystaniem amidofosforinów; **B.** ³¹P NMR N₃-C₂H₄pA_mpG potwierdzający obecność dwóch grup fosforanowych. Pik o przesunięciu chemicznym σ równym -0.16 pochodzi od grupy fosforanowej tworzącej wiązanie fosfodiesterowe, -0.89 pochodzi od terminalnej grupy fosforanowej.

III.11.2 Analogi 5'-trifosforanów 7-metyloguanozyny z ugrupowaniem alkinowym

W poprzednim rozdziale ([Rozdział II.11.1.](#)) opisałem proces syntezy dinukleotydów posiadających ugrupowanie azydkowe w pozycji 5' pierwszego nukleotydu. Do syntezy triazolowych trinukleotydowych analogów kapu niezbędne były również podjednostki posiadające w swojej strukturze terminalną grupą alkinową. Podjednostkami tymi były pochodne 5'-trifosforanu 7-metyloguanozyny (m^7GTP), w których grupa fosforanowa w pozycji 5' została zastąpiona fosfonianem lub fosfoestrem z ugrupowaniem alkinowym ([Rysunek 96A](#)). Synteza tego typu związków jak i podjednostek C-fosfonianowych i fosfoestrowych została wcześniej opracowana przez dr Sylwię Ciechanowicz oraz dr Przemysława Wanata w Laboratorium Chemii Biofizycznej w Zakładzie Biofizyki UW^{81, 176}.

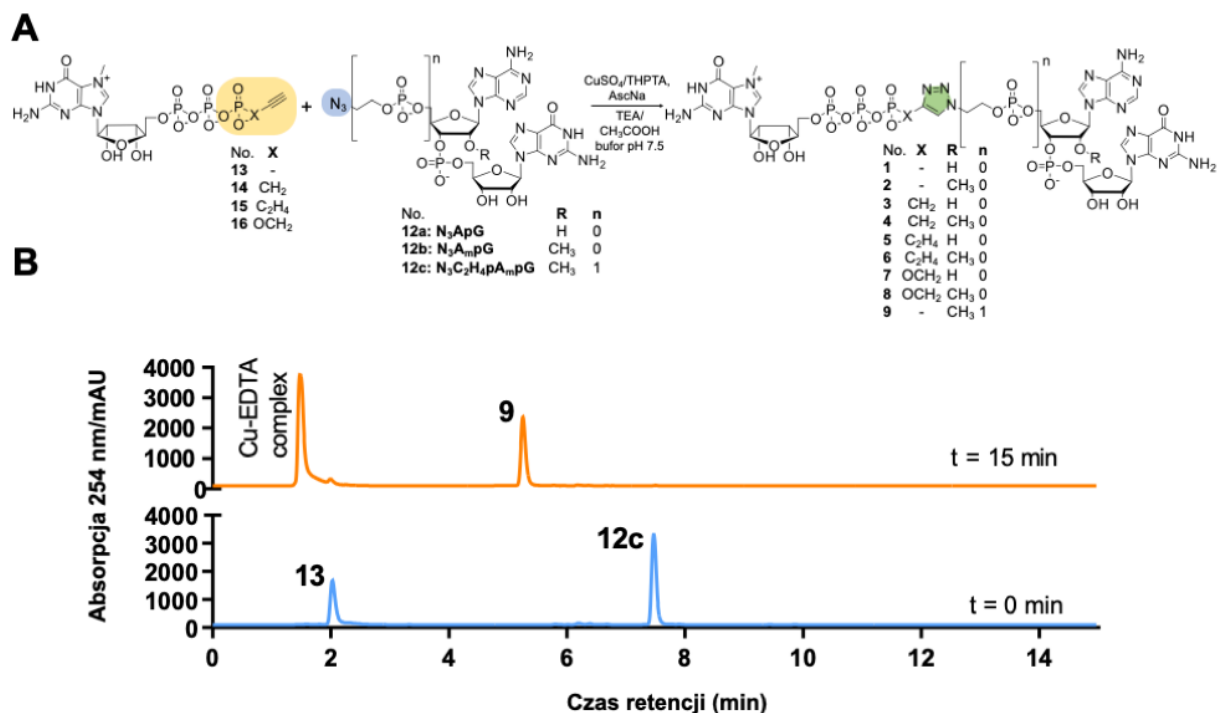
Analogi m^7GTP z ugrupowaniem alkinowym zostały zsyntezowane z wykorzystaniem chemii *P*-imidazolidów ([Rozdział II.4.1.2.](#), część literaturowej). W reakcji sprzęgania, aktywowany imidazolem m^7GDP ($m^7GDP\text{-}Im$) został połączony z odpowiednimi podjednostkami C-fosfonianowymi i fosfoestrowymi w obecności dwuwartościowych jonów metali (Mg^{2+}) ([Rysunek 99B](#)).



Rysunek 99. Analogi m^7GTP z terminalnym ugrupowaniem alkinowym. **A.** Struktury analogów m^7GTP wykorzystanych do syntezy trinukleotydowych analogów kapu. **B.** Schemat syntezy analogów m^7GTP z terminalną grupą alkinową.

III.11.3 Synteza trinukleotydowych analogów końca 5' mRNA z modyfikacją w obrębie mostka trifosforanowego

Otrzymane dinukleotydy z ugrupowaniem azydkowym, których syntezę opisałem w [rozdziale III.11.1.](#), oraz analogi m^7GTP z ugrupowaniem alkinowym ([Rozdział III.11.2.](#)) posłużyły mi do syntezy trinukleotydowych analogów kapu z modyfikacją triazolową w obrębie mostka trifosforanowego. Trinukleotydowe analogi kapu z modyfikacją w obrębie mostka trifosforanowego otrzymałem poprzez połączenie podjednostki azydkowej z podjednostką alkinową, w różnych kombinacjach, za pomocą reakcji cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowanej jonami miedzi (I) (CuAAC). Bardzo dobra rozpuszczalność obu podjednostek w wodzie umożliwiła mi przeprowadzenie reakcji CuAAC bez konieczności użycia rozpuszczalników organicznych takich jak DMSO czy DMF, co ułatwiło zarówno przeprowadzenie reakcji, jej monitorowanie jak i wyizolowanie czystego związku. W przeprowadzonych przeze mnie reakcjach CuAAC, prekursorem katalizatora było siarczan (VI) miedzi (II) – $CuSO_4$ w kompleksie z THPTA (1:1), który stabilizuje jony miedzi (I). Jony miedzi (II), , ulegały redukcji do miedzi (I) (katalizatora reakcji CuAAC) pod wpływem askorbinianu sodu. W zoptymalizowanych przeze mnie warunkach reakcji używałem 20-krotnego namiaru askorbinianu sodu względem jonów miedzi (II). Dobrane warunki reakcji były uniwersalne dla wszystkich trinukleotydowych analogów kapu z modyfikacją w obrębie mostka trifosforanowego. Reakcje CuAAC prowadziłem w temperaturze 25 °C przez 0.5 – 2 h ([Rysunek 100A](#)). Przebieg reakcji CuAAC monitorowałem za pomocą RP HPLC z detekcją UV przy długości fali 254 nm ([Rysunek 100B](#)). Reakcje zatrzymywałem poprzez 10-krotne rozcieńczenie mieszanin reakcyjnych wodnym roztworem Na_2EDTA . związków celu skompleksowania jonów miedzi i łatwiejszego usunięcia ich przy użyciu metod chromatograficznych. Zsyntezowane trinukleotydowe analogi kapu z modyfikacją w obrębie mostka trifosforanowego oczyściłem w dwustopniowym procesie złożonym z chromatografii jonowymiennej ze złożem DEAE-Sephadex A-25 oraz RP-HPLC. Trinukleotydowe analogi kapu otrzymałem z wydajnością 40-60%, a struktury otrzymanych związków potwierdziłem za pomocą NMR oraz HRMS.



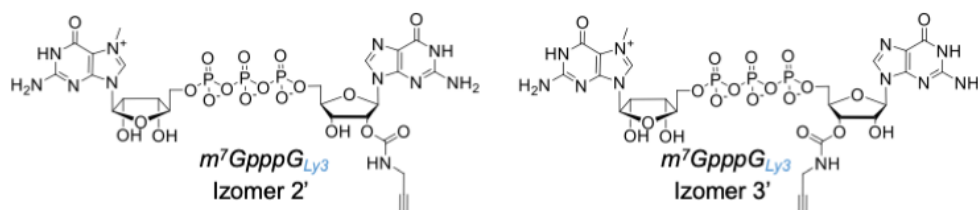
Rysunek 100. Synteza triazolowych trinukleotydowych analogów kapów przy użyciu chemii click. **A.** Schemat syntezy; **B.** Przykładowy RP HPLC Chromatogram z syntezy trinukleotydowego analogu kapu.

III.11.4 Synteza analogów końca 5' mRNA w modyfikowanych obrębie wiązania 5',3'-fosfodiesterowego

Na pierwszy rzut oka, pierścień triazolowy nie przypomina swoją strukturą wiązania fosfodiesterowego. Jednakże, jego rozkład ładunku, moment dipolowy oraz możliwość tworzenia wiązań wodorowych sprawia, że jest on uznawany za mimetyk wiązania 3'-5' fosfodiesterowego. W literaturze można znaleźć wiele przykładów modyfikowanych kwasów nukleinowych (w szczególności DNA), w których standardowe wiązanie fosfodiesterowe zastąpiono ugrupowaniem triazolowym^{116, 177, 178}. Tak modyfikowane kwasy nukleinowe były rozpoznawane przez enzymy zaangażowane w ich metabolizm, a także były aktywne biologicznie zarówno w bakteriach jak i w żywych komórkach¹⁷⁹. Dodatkowo, modyfikowane w ten sposób kwasy nukleinowe charakteryzował się większą stabilnością chemiczną i biologiczną. Korzyści wynikająca z zastąpienia wiązania 3'-5' fosfodiesterowego pierścieniem triazolowym skłoniły mnie do zaprojektowania tri- i tetranukleotydowych analogów kapu, w których pierwsze wiązanie 3'-5' fosfodiesterowe zastąpiłem ugrupowaniem z pierścieniem triazolowym. Zaprojektowane w ten sposób analogi kapu zsyntezowałem przy użyciu reakcji *CuAAC*, w której dinukleotydowe analogi kapu, sfunkcjonalizowane w obrębie rybozy pierwszego transkrybowanego nukleotydu ugrupowaniem alkinowym, połączyłem z odpowiednimi nukleotydowymi podjednostkami azydkowymi.

III.11.4.1 Analogi kapu z ugrupowaniem alkinowym w obrębie rybozy

Przed przystąpieniem do syntezy właściwych tri- i tetranukleotydowych analogów kapu, w pierwszej kolejności przygotowałem odpowiednio sfunkcjonalizowane dinukleotydy jako substraty do syntezy. Tymi dinukleotydami były analogi kapu, do których wprowadziłem ugrupowanie alkinowe w obrębie rybozy, w pozycjach 2'-O i 3'-O. Wprowadzonym podstawnikiem z alkinową grupą funkcyjną był propargil, który w reakcji *CuAAC* z odpowiednią podjednostką azydkową tworzył ugrupowanie z pierścieniem triazolowym imitujące standardowe wiązanie 3'-5' fosfodiesterowe. W niniejszym projekcie, do syntezy tri- i tetranukleotydowych analogów kapu wykorzystałem dwa rodzaje sfunkcjonalizowanych dinukleotydów, które różniły się sekwencją oraz sposobem przyłączenia propargilu w obrębie rybozy. W pierwszym rodzaju dinukleotydów grupa propargilowa została przyłączona do rybozy poprzez wiązanie karbaminianowe. Przedstawicielami tego rodzaju dinukleotydów były będące regioizomerami związki $m^7GpppG_{2'-OLy3}$ oraz $m^7GpppG_{3'-OLy3}$. Związki te zostały zsyntezowane przez dr Marcina Warmińskiego w Laboratorium Chemii Biofizycznej przy zastosowaniu aktywacji 1,1'-karbonyldiimidazolem (*CDI*)¹⁸⁰ ([Rysunek 101](#)). Oba regioizomery wykorzystałem do syntezy tetranukleotydowych analogów kapu.



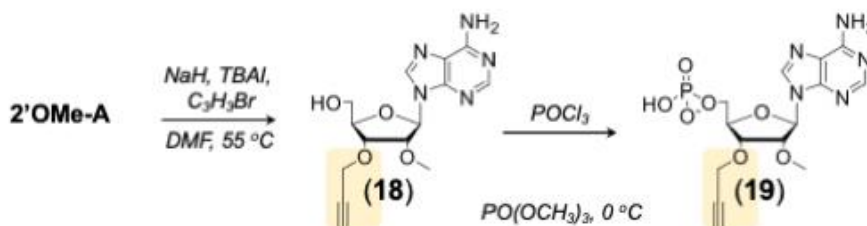
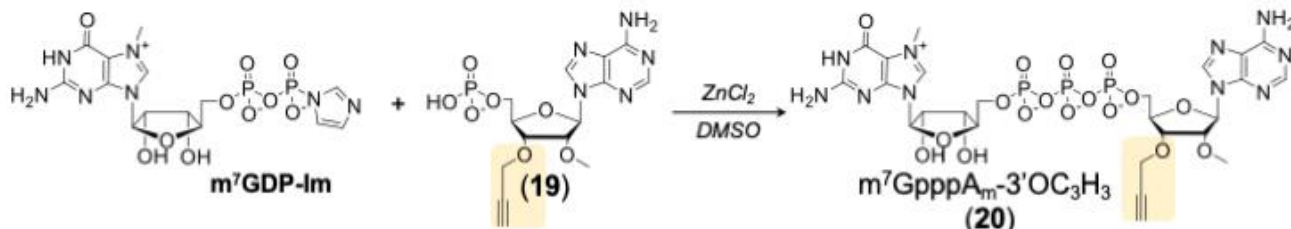
Warmiński M. et al.

Rysunek 101. Struktury dinukleotydowych analogów kapu m^7GpppG_{Ly3} z ugrupowaniem propargilowym, w obrębie rybozy, przyłączonym poprzez karbaminian. Związki zsyntezowane przez dr. Marcina Warmińskiego.

Drugim rodzajem dinukleotydu posiadającym grupę propargilową w obrębie rybozy był związek $m^7GpppA_m-3'OC_3H_3$ (**20**) ([Rysunek 102](#)), który zsyntezowałem samodzielnie. W związku tym, grupa propargilowa została przyłączona do rybozy w pozycji 3'-O. Ścieżka syntezy związku (**20**) obejmowała 3 etapy: syntezę modyfikowanego AMP z grupą propargilową w pozycji 3'-O (**19**), syntezę m^7GDP -Im oraz syntezę dinukleotydowego kapu (**20**) przy użyciu reakcji sprzęgania w obecności jonów metali ([Rysunek 102](#)). Syntezę rozpocząłem od przygotowania propargilowego analogu AMP (**19**). Punktem wyjściowym tej syntezy była komercyjnie dostępna 2'-O-metyloadenozyna (2'-O-MeA), którą przekształciłem w 2'-O-metylo-3'-O-propargiloadenozynę (**18**) w obecności wodoru sodu (NaH), jodku *tert*-butyloamonu (TBAI) oraz bromku propargilu (C_3H_3Br) w DMF ([Rysunek 102A](#)). Reakcję alkilacji pozycji 3'-O 2'-O-metyloadenozyny przeprowadziłem modyfikując opublikowany protokół¹⁸¹. Otrzymany związek (**18**) oczyściłem za pomocą chromatografii cieczowej na złożu

krzemionkowym (w układzie 0 – 7% MeOH w DCM). Otrzymaną w ten sposób 2'-O-metylo-3'-O-propargilo adenozyne (**18**) przekształciłem w 5-monofosforan 2'-O-metylo-3'-O-propargilo adenozyne (**19**) w warunkach reakcji fosforylacji *Yoshikawy* w obecności POCl₃ w fosforanie trimetylu (PO(OCH₃)₃). Reakcję fosforylacji *Yoshikawy* zazwyczaj zatrzymuje się poprzez rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej wodą, co powoduje hydrolizę POCl₃ do nieorganicznego fosforanu. Powstały podczas hydrolizy POCl₃ nieorganiczny fosforan, trudno jest oddzielić od pożądanego produktu metodami chromatograficznymi. Nieoddzielony nieorganiczny fosforan może konkurować w następnej reakcji sprzęgania z właściwym substratem, co powoduje powstanie produktów ubocznych oraz obniża wydajność syntezy. Z tego powodu, reakcję fosforylacji związku (**18**) zakończyłem w alternatywny sposób, który niwelował prawdopodobieństwo powstania nieorganicznego fosforanu. Po całkowitej konwersji związku (**18**) otrzymany produkt wytrąciłem za pomocą zimnego eteru dietylowego. Powstały osad wysuszyłem i rozpuściłem ponownie w H₂O, neutralizując pH powstałego roztworu za pomocą wodorowęglanu sodu (NaHCO₃). Ostateczny związek (**19**) oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex A-25.

Po zsyntezowaniu 5-monofosforanu 2'-O-metylo-3'-O-propargilo adenozyne (**19**) rozpocząłem syntezę analogu kapu m⁷GpppA_m-3'OC₃H₃. Związek m⁷GpppA_m-3'OC₃H₃ otrzymałem w reakcji sprzęgania, w której *P*-imidazolid m⁷GDP (m⁷GDP-Im) połączyłem ze związkiem 2'-OMe, 3'-OC₃H₃-AMP ([Rysunek 102B](#)). Reakcję sprzęgania prowadziłem w obecności chlorku cynku (ZnCl₂) w DMSO przez 2 h w temperaturze pokojowej. Reakcję zakończyłem poprzez skompleksowanie jonów Zn²⁺, dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór NaHCO₃/Na₂EDTA. Końcowy związek oczyściłem za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex A-25, otrzymując związek z wydajnością 24%. Otrzymany przeze mnie dinukleotydowy analog kapu, z grupą propargilową w pozycji 3'-O rybozy wykorzystałem do syntezy trinukleotydowego analogu kapu.

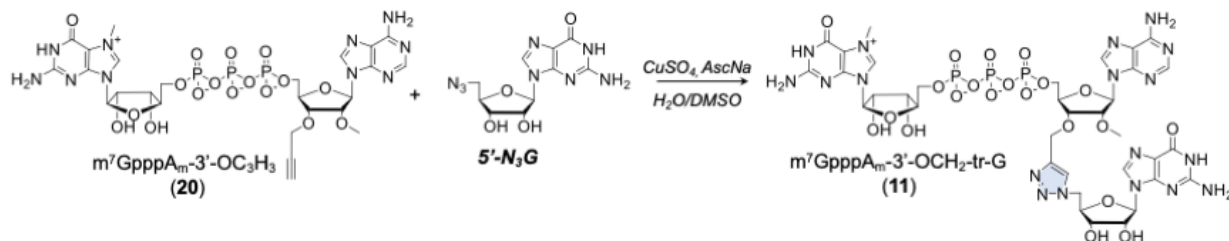
A**B**

Rysunek 102. Schemat syntezy dinukleotydowych analogów końca 5' mRNA z modyfikacją propargilową w pozycji 3' rybozy. **A.** Synteza 5'-monofosforanu 2'-O- Me, 3'-OC₃H₃-adenozyny (2'-O- Me, 3'-OC₃H₃AMP). **B.** Synteza m⁷GpppA_m-3'-OC₃H₃ - reakcja sprzęgania z P-imidazolem m⁷GDP (m⁷GDP-lm).

III.11.4.2 Synteza tri- i tetranukleotydowych analogów kapu z triazolową modyfikacją w obrębie pierwszego wiązania fosfodiesterowego

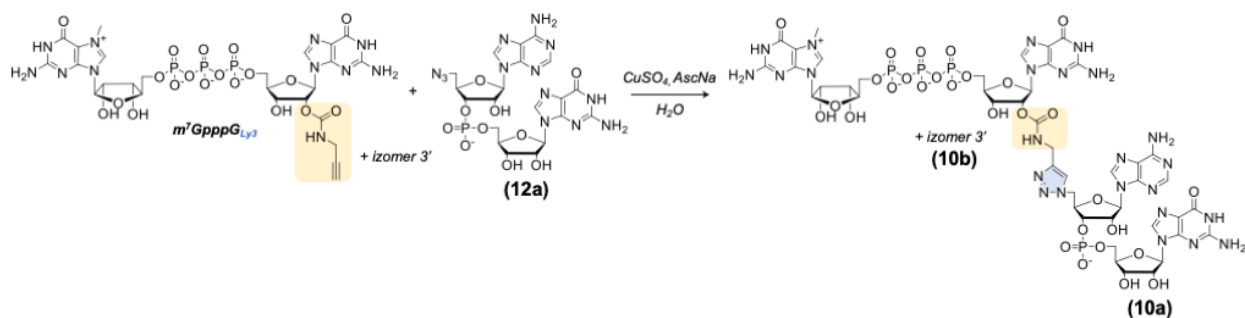
Ostatnim krokiem syntezy tri- i tetranukleotydowych analogów kapu z modyfikacją w obrębie pierwszego wiązania 3'-5' fosfodiesterowego było połączenie sfunkcjonalizowanych ugrupowaniem propargilowym dinukleotydów (Rysunek 101 oraz Rysunek 102B) z odpowiednimi podjednostkami azydkowymi przy użyciu chemii typu *click*. W pierwszej kolejności zsyntezowałem trinukleotydowy analog kapu, do którego syntezy wykorzystałem m⁷GpppA_m-3'OC₃H₃ (20) oraz 5'-azydo-5'-deokyguanozynę (5'-N₃G), otrzymaną według wcześniej opracowanego protokołu¹⁸². Związek (20) oraz 5'-N₃G połączyłem ze sobą w reakcji CuAAC stosując warunki reakcji zbliżone do tych użytych podczas syntezy trinukleotydowych analogów kapu z modyfikacjami w obrębie mostka trifosforanowego (Rozdział III.11.3.). W przeciwieństwie do reakcji CuAAC, opisanych uprzednio w rozdziale III.11.3., reakcje CuAAC pomiędzy związkiem m⁷GpppA_m-3'OC₃H₃ (20) a 5'-N₃G prowadziłem w mieszaninie H₂O/DMSO, a nie w samej wodzie. Zmiana rozpuszczalnika, w którym prowadzona była reakcja CuAAC, była spowodowana bardzo słabą rozpuszczalnością 5'-N₃G w czystej wodzie. Brak DMSO w mieszaninie reakcyjnej powodował wytrącanie się 5'-N₃G podczas reakcji, co obniżało jej wydajność. Z kolei zbyt duży dodatek DMSO do mieszaniny reakcyjnej powodował wytrącanie się CuSO₄ oraz askorbinianu sodu, co znacznie spowalniało przebieg reakcji. Ostatecznie, ustaliłem, że optymalna procentowa rozdziale III.11.3., reakcje CuAAC pomiędzy związkiem m⁷GpppA_m-3'OC₃H₃ (20) a 5'-N₃G prowadziłem w obecności katalitycznej ilości CuSO₄ z 20-krotnym nadmiarem askorbinianu sodu względem jonów Cu (II). Reakcje cykloaddycji prowadziłem w temperaturze pokojowej przez 1 h, po którym to czasie konwersja substratów wynosiła prawie 100% (Rysunek 103). Po upływie 1 h, reakcje zakończyłem poprzez skompleksowanie jonów miedzi za pomocą wodnego roztworu Na₂EDTA. Powstały w

ten sposób kompleks Cu-EDTA oddzieliłem od właściwego związku za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE-Sephadex A25. Końcowy związek oczyściłem za pomocą chromatografii cieczowej przy użyciu RP HPLC z wydajnością 62%.



Rysunek 103. Syntezy $m^7GpppA_m-3'OCH_2-tr-G$ za pomocą reakcji CuAAC.

Po otrzymaniu trinukleotydowego analogu kapu1 z modyfikacją triazolową w obrębie pierwszego wiązania fosfodiesterowego, przystąpiłem do syntezy tetranukleotydowych analogów kapu. Do syntezy tetranukleotydowych analogów kapu wykorzystałem dinukleotyd z ugrupowaniem azydkowym $5'-N_3ApG$ (**12a**) (Rozdział III.11.1.1.) oraz opisane w rozdziale III.11.4.1. związki zsyntezowane przez dr. Marcina Warmińskiego, w których ugrupowanie propargilowe zostało przyłączone poprzez wiązanie karbaminowe (m^7GpppG_{Ly3} (izomer 2' i 3')). Mieszanina dwóch regioizomerów, 2'-O i 3'-O (m^7GpppG_{Ly3}), nie została rozdzielona przed rozpoczęciem syntezy tetranukleotydowych analogów kapu (**10a** i **10b**) z powodu możliwości ponownej izomeryzacji ugrupowania karbaminowego. Tym samym, przeprowadziłem reakcję CuAAC łącząc oba regioizomery z dinukleotydem **12a**, w obecności $CuSO_4$ oraz askorbinianu sodu jako katalizatorów. Reakcję CuAAC prowadziłem w wodzie w temperaturze pokojowej przez 1 h. Tak jak w poprzednich przypadkach, reakcje zakończyłem poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej wodnego roztworu Na_2EDTA . W wyniku reakcji otrzymałem tetranukleotyd w postaci dwóch regioizomerów, 2'-O i 3'-O, które z powodzeniem rozdzieliłem za pomocą chromatografii HPLC w odwróconych fazach. Po przeprowadzeniu reakcji CuAAC samoistna izomeryzacja w powstałym tetranukleotydzie była mało prawdopodobna ze względu na zawady steryczne. Dzięki temu możliwe było rozdzielenie dwóch regioizomerów tetranukleotydu i zbadanie ich właściwości biofizycznych i biologicznych jako dwóch niezależnych związków.



Rysunek 104. Synteza tetranukleotydowych analogów kapu z modyfikacją w obrębie pierwszego wiązania fosfodiesterowego.

III.12 Wpływ triazolowych modyfikacji końca 5' mRNA na właściwości biologiczne mRNA

W poprzednich rozdziałach opisałem sposób otrzymywania tri- i tetranukleotydowych analogów kapu z modyfikacją triazolową w obrębie mostku 5'-5' trifosforanowego lub w obrębie pierwszego wiązania 3'-5' fosfodiesterowego. Otrzymane za pomocą reakcji CuAAC analogi kapu poddane zostały badaniom mającym na celu określenie wpływu wprowadzonych modyfikacji na procesy związane z syntezą mRNA oraz jego translacją.

III.12.1 Wbudowywanie modyfikowanych triazolem analogów kapu do krótkich i długich fragmentów mRNA – reakcja transkrypcji *in vitro*

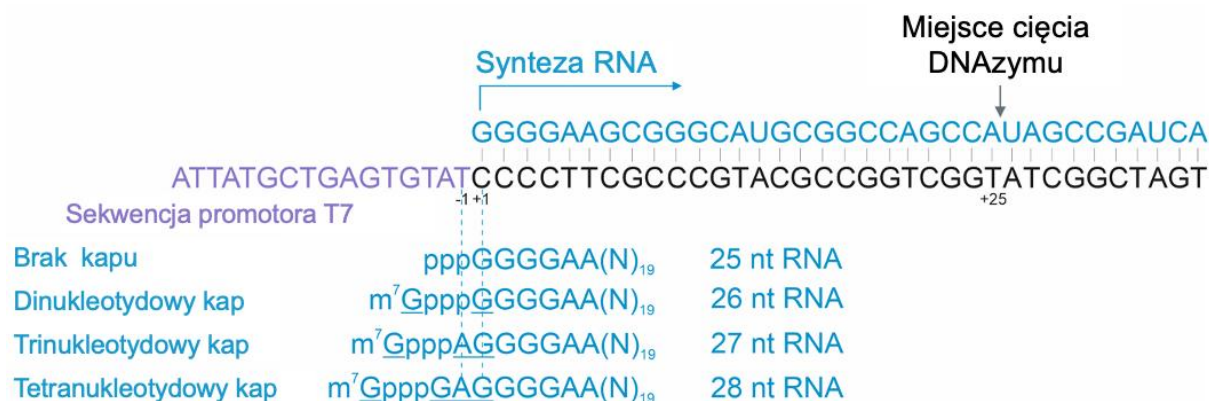
Powszechnie stosowaną metodą wykorzystywaną do otrzymywania krótkich oraz długich fragmentów mRNA jest reakcja transkrypcji *in vitro* (IVT). Jest to chemoenzymatyczna metoda wykorzystująca do syntezy RNA polimerazę RNA zależną od DNA (polimeraza faga T7 lub SP6), matrycę DNA zawierającą odpowiedni fragment promotora oraz 5'-trifosforany nukleozydów (NTP), które są w reakcji IVT substratami budującymi rosnącą nić RNA¹⁸³⁻¹⁸⁵. Opis reakcji IVT został szerzej opisany w rozdziale II.4.4. niniejszej rozprawy doktorskiej.

W niniejszym projekcie doktorskim, otrzymane przeze mnie triazolowe analogi kapu, zostały wbudowane do krótkich oraz długich fragmentów RNA za pomocą reakcji IVT. Krótkie fragmenty RNA użyto do zbadania wpływu modyfikacji triazolowej na wydajność wbudowywania kapu do RNA (*ang. capping efficiency*). Długie fragmenty, zostały z kolei wykorzystane do zbadania wpływu triazolowych modyfikacji na translację mRNA w lizatach z retikulocytów króliczych (RRL) oraz na produkcję białka w żywych komórkach.

III.12.1.1 Synteza krótkich, kapowanych fragmentów RNA

Syntezę krótkich, zakończonych kapem na końcu 5' fragmentów RNA przeprowadziła dr Karolina Drażkowska w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW. Matrycą wykorzystaną do syntezy RNA była 55-nukleotydowa (55-nt) podwójna, komplementarna nić DNA, która w swojej sekwencji zawierała 18-nt sekwencję promotora dla

polimerazy RNA T7. Sekwencja matrycy została przedstawiona na [rysunku 105](#) wraz z zaznaczoną sekwencją promotora oraz miejscem cięcia przez DNAzym.



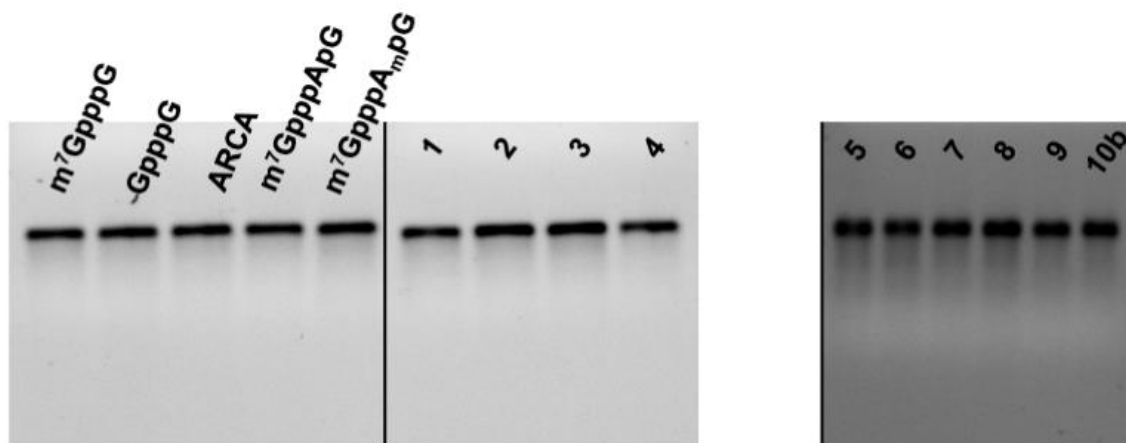
Rysunek 105. Sekwencja matrycy dsDNA do syntezy krótkich RNA wraz z sekwencją promotora $\phi 6.5$ dla polimerazy T7. W sekwencji zaznaczono miejsce cięcia DNAzymem, który był wykorzystany do analizy kapingu, oraz długość powstałego RNA po cięciu RNA DNAzymem (w zależności od struktury kapu).

W reakcji wykorzystano 6-krotny nadmiar odpowiedniego analogu kapu względem GTP, co jest zabiegiem mającym na celu zwiększenie prawdopodobieństwa inicjacji transkrypcji od analogu kapu i zmniejszenie frakcji niekapowanego (tj. zakończonego trifosforanem) RNA. Analogi kapu oraz GTP są konkurencyjnymi inicjatorami transkrypcji dla polimerazy. Odpowiednie manipulowanie stężeniem kapu pozwala przesunąć równowagę w stronę analogu kapu, co zwiększa prawdopodobieństwo wbudowania go na końcu 5' mRNA^{8, 186, 187}. Reakcje IVT prowadzono w odpowiednim dla polimerazy T7 roztworze buforowym na bazie Tris-HCl przez 1.5 h w temperaturze 37 °C. Przed przystąpieniem badania wpływu modyfikacji triazolowej na wydajność wbudowywania kapu do RNA, otrzymane i oczyszczone RNA wymagało dodatkowej obróbki. W wyniku przeprowadzonej reakcji transkrypcji *in vitro*, otrzymane transkrypty nie są homogenne. Heterogeniczność otrzymanych transkryptów wynika z dodania na końcu 3', przez polimerazę RNA T7, dodatkowych nukleotydów nie będących w sekwencji matrycy DNA¹⁸⁸. Aby poprawić homogenność transkryptów, RNA poddano reakcji z DNAzymem, który odcina heterogeny koniec 3' RNA za +25 nukleotydem w sekwencji¹⁸⁹. W wyniku reakcji transkryptów z DNAzymem otrzymano homogenne na końcu 3' RNA o długości 27-nt w przypadku zastosowania trinukleotydowych analogów kapu oraz 28-nt w przypadku tetranukleotydowych analogów kapu. Wyniki dotyczące wydajności ko-transkrypcyjnego wbudowywania kapu do RNA kodującego *Gaussia* lucyferazę zostały opisane w dalszej części niniejszej rozprawy ([rozdział III.12.3](#)).

III.12.1.2 Synteza długich, kapowanych fragmentów RNA kodujących białko *Gaussia* lucyferazę

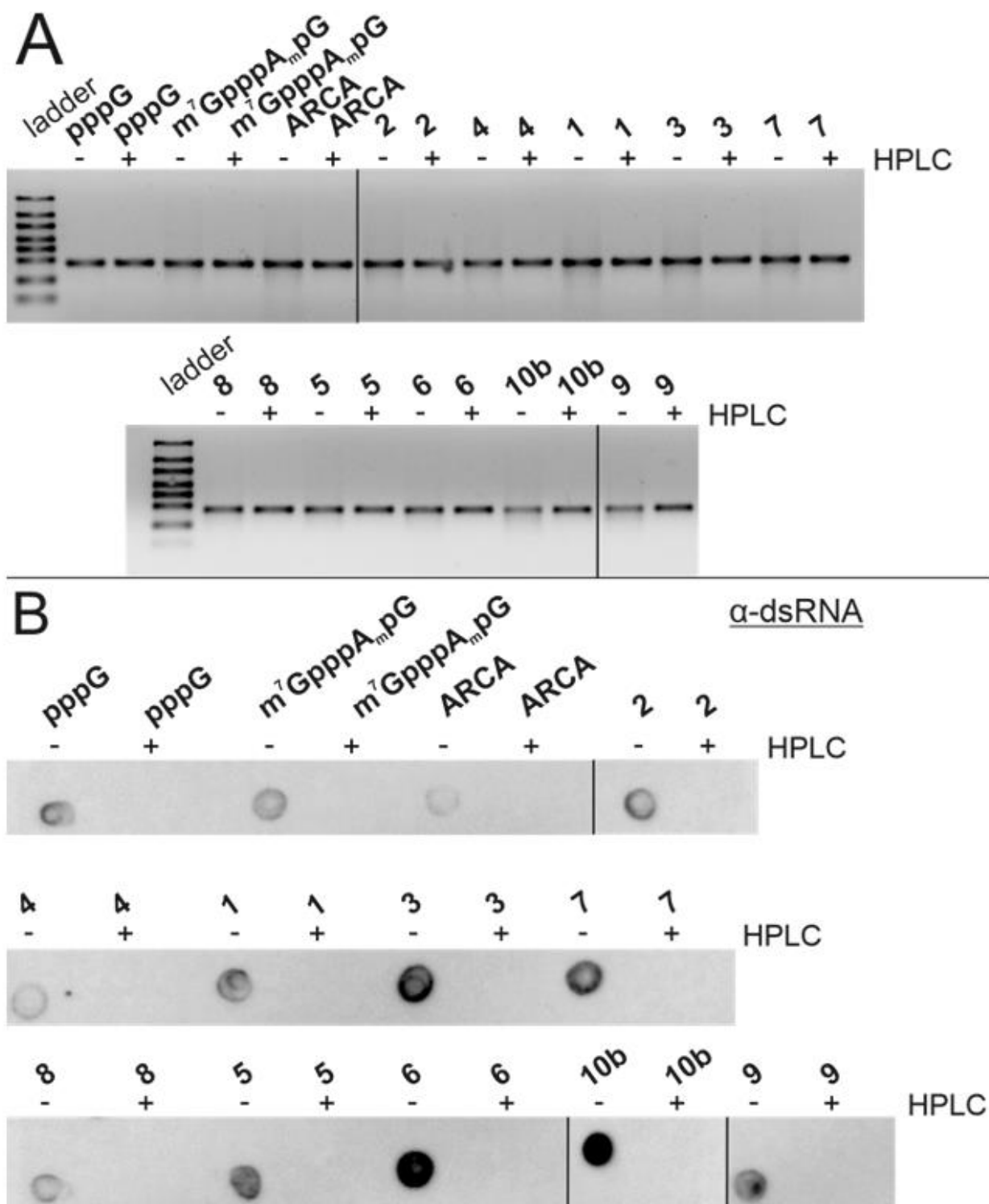
Syntezę długich fragmentów RNA, zakończonych na końcu 5' zsyntezowanymi przeze mnie triazolowymi analogami kapów ((1-9, 10b), [Rysunek 91](#), [rozdział III.11](#).) oraz niemodyfikowanymi analogami referencyjnymi (ARCA, m⁷GpppG, GpppG, kap0 oraz kap1),

przeprowadziłem za pomocą reakcji transkrypcji *in vitro* tak jak w przypadku krótkich fragmentów RNA (rozdział III.12.1.1.). Matrycą DNA to syntezy długich fragmentów RNA był plazmid pJET_T7_Gluc kodujący białko *Gaussia* lucyferazą. Plazmid ten posiadał 18-nt sekwencję promotora dla polimerazy RNA T7 oraz ogon poli(A). Plazmid pJET przed rozpoczęciem reakcji transkrypcji *in vitro*, poddałem reakcji z enzymem restrykcyjnym AarI, który przecina plazmid w odpowiednio zaplanowanym miejscu sekwencji DNA tworząc liniową matrycę. Matrycę DNA o sekwencji kodującej białko lucyferazy *Gaussia* wykorzystałem do reakcji transkrypcji *in vitro* w obecności polimerazy RNA T7, wszystkich czterech NTP oraz odpowiedniego triazolowego analogu kapu w 6-krotnym nadmiarze względem GTP. Tak jak w przypadku syntezy krótkich fragmentów RNA, 6-krotny nadmiar kapu względem GTP miał zapewnić wbudowanie przez polimerazę RNA T7 triazolowego analogu kapu na końcu 5' RNA. Reakcje IVT prowadziłem przez 3 h w temperaturze 37 °C. Po 3 h inkubacji, matrycę DNA usunąłem z mieszaniny reakcyjnej dodając DNazę I. W wyniku reakcji transkrypcji *in vitro* otrzymałem RNA, kodujące białko lucyferazę, zakończone różnymi triazolowymi analogami kapu (Rysunek 106).



Rysunek 106. Elektroforeza żelowa - 1.2% żel agarozowy (TBE) dla zsyntezowanego mRNA zakończonego różnymi analogami kapu.

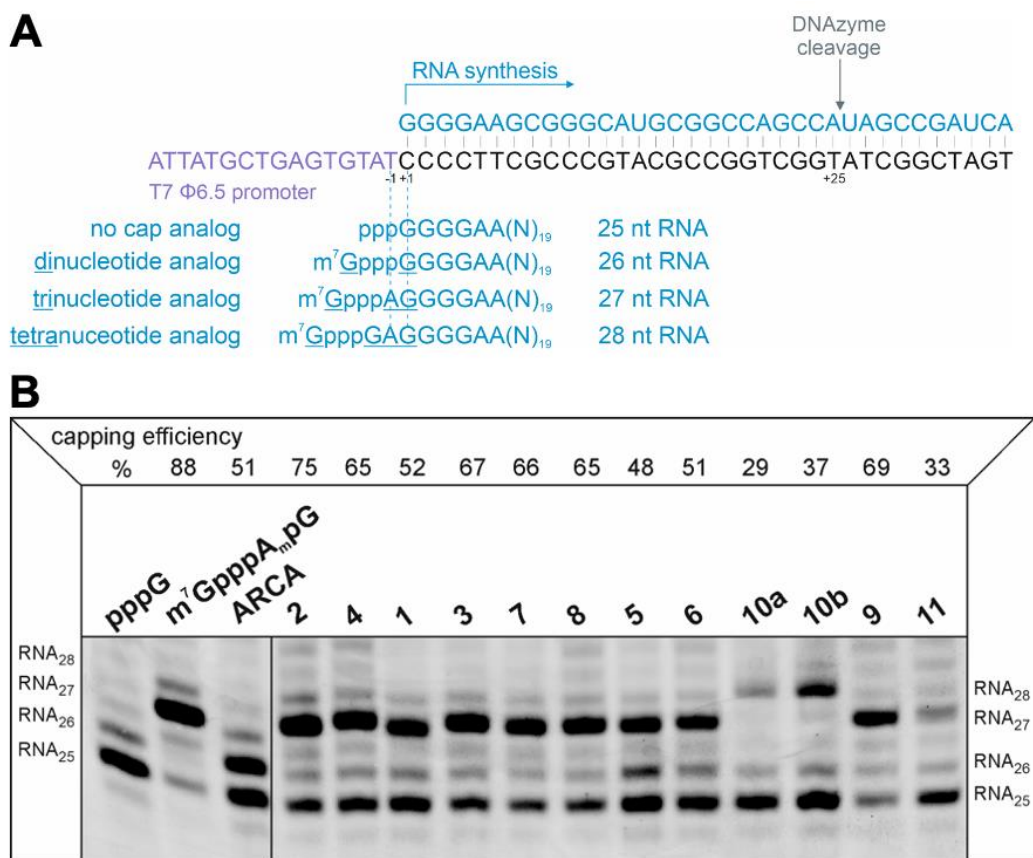
W analogicznej reakcji dr Karolina Drążkowska otrzymała długie fragmenty RNA kodujące białko *Gaussia* lucyferazę, które wykorzystała w badaniach z użyciem linii komórkowych. Dodatkowym etapem przeprowadzonym przez dr Karolinę Drążkowską było usunięcie niekapowanego RNA za pomocą RNA 5' polifosfatazy oraz enzymu Xrn1. Transkrypty wykorzystane do badań komórkowych były dodatkowo oczyszczane za pomocą RP HPLC, aby obniżyć niepożądaną reaktogenność RNA. Przy użyciu RP HPLC zostały usunięte nieprzereagowane NTP oraz analogi kapu, a także krótsze fragmenty RNA oraz dwu niciowe powstała podczas reakcji transkrypcji *in vitro*¹⁹⁰ (Rysunek 107A,B). Dodatkowe oczyszczanie za pomocą RP HPLC było kluczowe dla poprawności przeprowadzenia eksperymentów w żywych komórkach.



Rysunek 107. Analiza otrzymanego mRNA po oczyszczaniu za pomocą RP HPLC. **A.** Analiza za pomocą 1.2% żelu agarozowego (TBE). **B.** Analiza dsRNA za pomocą metody Dotblot. Rysunek został przygotowany przez dr Karolinę Drażkowską.

III.12.2 Wydajność procesu kapingu RNA

Aby chemicznie modyfikowane analogi kapu mogły być zastosowane do otrzymywania terapeutycznego mRNA muszą one być efektywnie wbudowywane do RNA. Najefektywniejszą metodą syntezy kapowanego RNA jest reakcji IVT, która została opisana w poprzednich rozdziałach. Aby synteza mRNA za pomocą reakcji IVT była możliwa, modyfikowane analogi kapu muszą być rozpoznawane przez polimerazy RNA (SP6 lub T7). W celu sprawdzenia czy zsyntezowane przez mnie triazolowe analogi kapu są rozpoznawane przez polimerazę RNA T7 przeprowadzono eksperyment, w którym sprawdzono wydajność wbudowywania tych analogów do krótkich fragmentów RNA. Eksperyment ten został przeprowadzony w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW przez dr Karolinę Drązkowską. Wydajność kapingu krótkich fragmentów RNA sprawdzono za pomocą wysokorozdzielczego żelu poliakrylamidowego (PAGE) przy użyciu wcześniej zsyntezowanych krótkich, kapowanych triazolowymi analogami kapu, fragmentów RNA ([Rozdział III.12.1.2.](#)). Zsyntezowane krótkie fragmenty RNA zostały rozwinięte za pomocą PAGE po czym densytometrycznie za pomocą programu komputerowego (1D Gel Image Analysis Software TotalLab CLIQS) zmierzono intensywność prążków odpowiadających kapowanemu i niekapowanemu RNA. Wydajność kapingu wyznaczono obliczając stosunek kapowanego i niekapowanego RNA. W przeprowadzonym eksperymencie jako kontroli pozytywnej użyto RNA kapowanego $m^7GpppA_{mp}G$ (kap1) (88%), ARCA (51%) oraz β -S-ARCA (41%), z kolei jako kontroli negatywnej użyto RNA zakończonego trifosforanem ($pppG$ -RNA) – niekapowane RNA. Spośród RNA zakończonych triazolowymi analogami kapu, najchętniej wbudowywany był związek (m^7Gppp -tr- $A_{mp}G$, **2**) (75%), w którym triazol połączony był bezpośrednio z grupą fosforanową w mostku 5',5'-trifosforanowym. Związek (m^7Gppp -tr- $A_{mp}G$, **2**) dodatkowo posiadał metylację w pozycji 2'-O rybozy pierwszego transkrybowanego nukleotydu (wersja kap1). Odpowiednik związku **2**, w wersji kap0, związek (m^7Gppp -tr- ApG , **1**), był wbudowywany do RNA ze znacznie niższą wydajnością – 52%. Analogiem kapu, który równie wydajnie był wbudowywany do RNA była kap m^7Gppp -tr- $C_2H_4pA_{mp}G$, **9**, który jako jedyny spośród wszystkich triazolowych kapów był analogiem tetrafosforanowym. Wydajność wbudowywania kapu m^7Gppp -tr- $C_2H_4pA_{mp}G$, **9**, wynosiła 69%. Pozostałe związki z modyfikacją triazolową w obrębie mostka 5',5'-trifosforanowego wbudowywały się z wydajnością 67-51%. Ze znacznie gorszą wydajnością wbudowywały się związki z modyfikacją triazolową w obrębie wiązania 3',5'-fosfodiesterowego (m^7GpppG -2'-O-Ly3- CH_2 -tr- ApG , **10a**; m^7GpppG -3'-O-Ly3- CH_2 -tr- ApG **10b**; m^7GpppA_m -3'-O CH_2 -tr- G , **11**). Związki z tą modyfikacją wbudowywały się z wydajnością mniejszą niż 40%. Pomimo, że związek **10b** był niekomplementarny względem zastosowanej matrycy DNA ([Rysunek 108A](#)), związek ten był wbudowywany do RNA z najwyższą wydajnością (37%), spośród z wszystkich analogów z modyfikacją w obrębie wiązania fosfodiesterowego.



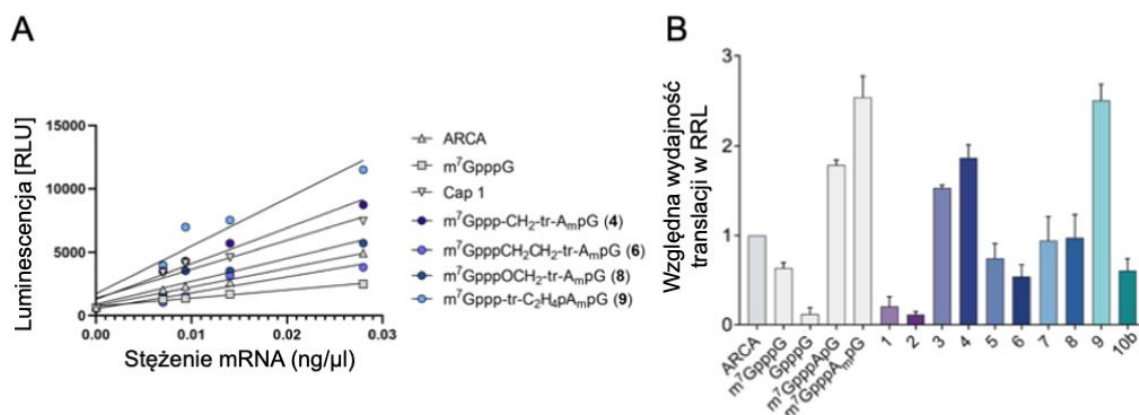
Rysunek 108. Badanie wydajności kapiu krótkiego mRNA przy użyciu triazolowych trinukleotydowych analogów kapu. **A.** Parowanie analogów kapu z matrycą DNA podczas reakcji *in vitro* transkrypcji; **B.** Poliakrylamidowy żel (PAA, 15%) otrzymanych krótkich mRNA. Rysunek zaczerpnięto z pracy Kozarski i wsp.

Związki posiadające modyfikacje w obrębie mostka 5',5' fosforanowego, wbudowywane były do RNA z większą wydajnością niż dinukleotydowe analogi kapu (ARCA, β-S-ARCA), co jest zgodne z przewidywaniem. Wprowadzone modyfikacje mostkowe obniżyły jednak wydajność kapiu RNA względem wydajności kapiu wyznaczonej dla kapu 1. Pomimo nieco gorszej wydajności kapowania niż kap 1, związki te wciąż są bardzo interesujące z punktu widzenia ich syntezy oraz ich właściwości biologicznych, które zostały zbadane w kolejnych rozdziałach. Spośród związków posiadających modyfikację w obrębie wiązania fosfodiesterowego, jedynie związek **10b**, został poddany dalszym badaniom biochemicznym.

III.12.3 Wydajność procesu translacji w lizacie komórkowym z retikulocytów króliczych (RRL)

Lizat komórkowy z retikulocytów króliczych (RRL) jest użytecznym narzędziem stosowanym w biologii molekularnej. Jest on powszechnie stosowany do badania procesu transkrypcji i translacji. Z lizatu komórkowego z retikulocytów króliczych usuwa się endogenne mRNA, które mogłyby konkurować z prowadzonym z zewnątrz modyfikowanym mRNA, aby ułatwić badania syntetycznych transkryptów. Dodatkowym atutem RRL jest brak (lub bardzo mała aktywność) maszynierii degradującej RNA, co sprawia, że wydajności białka uzyskane w RRL są niemal wyłącznie odzwierciedleniem właściwości translacyjnych mRNA, inaczej niż

ma to miejsce w liniach komórkowych, gdzie wpływ na produkcję białka mogą mieć także m.in. stabilność mRNA, mechanizmy nieswoistej odpowiedzi immunologicznej oraz niespecyficzne oddziaływania RNA. W swoich badaniach wykorzystałem RRL (Promega) do badania wpływu modyfikacji triazolowych na wydajność translacji *in vitro*, mRNA kodującego białko reporterowe lucyferazę *Gaussia*. mRNA, które wykorzystałem do badań wydajności translacji zostało otrzymane według protokołu opisanego w rozdziale III.12.1.2. Lizat z retikulocytów króliczych, w którym prowadziłem reakcje translacji *in vitro* przygotowałem według wcześniej opisanego protokołu ^{81, 114}. Mieszanina reakcyjna translacji *in vitro* zawierała odpowiednio rozcieńczony lizat komórkowy z retikulocytów króliczych (RRL, Promega), mieszaninę odpowiednich aminokwasów (dostarczoną przez producenta, Promega), octan potasu (CH₃COOK), chlorek magnezu oraz inhibitor rybonukleaz – Ribolock. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowałem w 30 °C przez 1 h, po czym dodawałem mRNA zakończone wybranym analogiem kapu (**1-9**, **10b** oraz ARCA (kontrola pozytywna), GpppG (kontrola negatywna), m⁷GpppG (kontrola pozytywna), m⁷GpppApG (kap0) i m⁷GpppA_{mp}G (kap1)) w jednym z 4 różnych stężeń. Po dodaniu mRNA do mieszaniny przez kolejną godzinę prowadziłem translację prowadzącą do nagromadzenia w próbce enzymu lucyferazy. Aktywność enzymatyczną zsyntetyzowanej lucyferazy określiłem za pomocą analizy bioluminescencji, powstałej w wyniku reakcji utleniania kolentrazyny. Wydajności translacji *in vitro* w RRL dla poszczególnych transkryptów różniących się strukturami kapu na końcu 5', wyznaczyłem na podstawie wyznaczonych wartości bioluminescencji w funkcji stężenia mRNA. Do otrzymanych punktów pomiarowych dopasowałem metodą regresji liniowej prostą, której współczynnik kierunkowy odpowiadał wydajności translacji *in vitro* (Rysunek 109A). Otrzymane współczynniki kierunkowe zostały znormalizowane względem współczynnika kierunkowego otrzymanego dla ARCA-RNA, które zostało użyte jako kontrola pozytywna. Dodatkowymi kontrolami było m⁷GpppG-RNA (kontrola pozytywna) oraz GpppG-RNA, które ze względu na brak 7-metyloguanozyny nie powinno ulegać kap-zależnej translacji (kontrola negatywna). W celu zbadania wpływu modyfikacji triazolowych na wydajność translacji *in vitro* w RRL, uzyskane wyniki porównałem z wynikami otrzymanymi dla RNA zakończonych trinukleotydowymi analogami kapu – m⁷GpppApG-RNA (kap 0) oraz m⁷GpppA_{mp}G-RNA (kap 1). Zbiorcze wyniki przedstawiłem w postaci wykresu słupkowego (Rysunek 109B), na którym przedstawiono średnie wartości wydajności translacji (3 powtórzenia).



Rysunek 109. Badanie wydajności translacji mRNA (*Gaussia* lucyferazy) zakończonego triazolowymi analogami kapu w RRL. **A.** Przykładowe krzywe zależności intensywności luminescencji od stężenia mRNA; **B.** Wykres słupkowy przedstawiający względną wydajność translacji mRNA zakończonych różnymi analogami kapu. Wyniki zostały przedstawione jako średnie z trzech powtórzeń ($\pm$ odchylenie standardowe). Wyniki zostały znormalizowane do wartości otrzymanej dla mRNA zakończonego kapem ARCA.

Otrzymane wyniki pokazują, że RNA zakończone kapem typu ARCA ulega translacji 1.3-razy wydajniej niż m⁷GpppG-RNA, co jest spowodowane wbudowywaniem się m⁷GpppG w orientacji odwrotnej do RNA. Zgodnie z założeniem, RNA zakończone GpppG nie ulega translacji. Wydajność translacji GpppG-RNA w RRL wyniosła zaledwie 0.11. RNA zakończone trinukleotydowymi kapami – m⁷GpppApG-RNA i m⁷GpppA_mpG-RNA, ulegały translacji w RRL znacznie wydajniej niż RNA zakończone dinukleotydowym kapem, 2- lub 2.5-krotnie wydajniej niż ARCA-RNA. Trinukleotydowe kapy charakteryzują się również wyższą wydajnością kapingu niż dinukleotydowe analogi kapu oraz tak samo jak analogi typu ARCA, są wbudowywane wyłącznie w poprawnej orientacji do RNA, o czym pisałem w [rozdziale II.5.](#) Spośród przetestowanych przeze mnie triazolowych analogów kapu, najlepszymi właściwościami translacyjnymi charakteryzowało się RNA zakończone związkiem m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (9). Związek ten posiadał modyfikację triazolową w obrębie mostka 5',5'-tetrafosforanowego, pomiędzy resztą fosforanową α i β . mRNA zakończone związkiem m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (9) ulegało translacji równie wydajnie jak m⁷GpppA_mpG-RNA, pomimo, że związek ten charakteryzował się niższą wartością kapingu niż kap 1 (69% vs. 88%). Najmniej wydajnie ulegało translacji mRNA zakończone kapem m⁷Gppp-tr-A_mpG (2), w którym pierścień triazolowy był połączony bezpośrednio z grupą fosforanową w pozycji α . Pomimo, że związek m⁷Gppp-tr-A_mpG (2) wbudowywał się do RNA z najwyższą wydajnością (75%, [Rozdział III.12.2](#)) spośród wszystkich triazolowych analogów kapu, m⁷Gppp-tr-A_mpG -RNA nie ulegało wydajnie translacji. Bezpośrednie połączenie grupy fosforanowej z pierścieniem triazolowym mogło zablokować naturalną ruchomość mostka 5',5' trifosforanowego, co skutkowało zaburzeniem oddziaływania końca 5' mRNA z białkami biorącymi udział w translacji. Przypuszczenia te zostały częściowo potwierdzone dzięki wynikom otrzymanym dla związków m⁷Gppp-CH₂-tr-ApG (3) i m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (4). W związkach (3) i (4) wprowadziłem dodatkową grupę metylenową pomiędzy pierścieniem triazolowym, a grupą

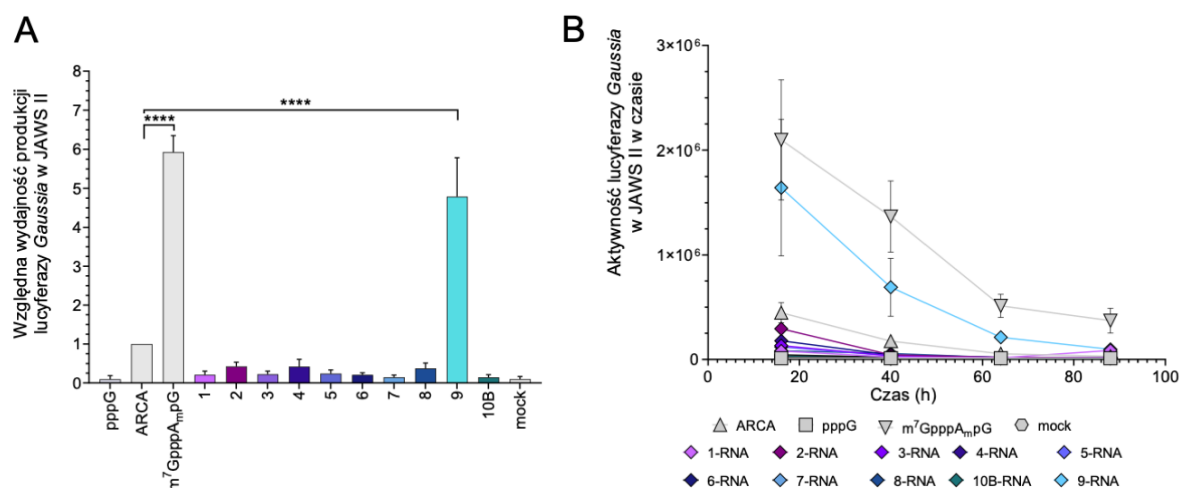
fosforanową. Wprowadzenie dodatkowej grupy metylenowej zwiększyło mobilność w mostku 5',5' trifosforanowym, co sprawiło, że wydajność translacji m⁷Gppp-tr-CH₂ApG-RNA i m⁷Gppp-tr-CH₂A_mpG-RNA znacznie wzrosła i była porównywalna z wydajnością translacji otrzymaną dla m⁷GpppApG-RNA. Wydłużenie łącznika pomiędzy pierścieniem triazolowym, a resztą fosforanową o kolejną grupę metylenową nie poprawiło własności translacyjnych mRNA posiadających na końcu 5' związku m⁷Gppp-C₂H₄-tr-ApG (**5**) i m⁷Gppp-C₂H₄-tr-A_mpG (**6**), co mogło być spowodowane pojawiającymi się w tym przypadku zawadami sterycznymi. mRNA posiadające na swoim końcu 5' związku **5** i **6** ulegały translacji porównywalnie do m⁷GpppG-RNA, posiadającego niemodyfikowany, dinukleotydowy kap (wydajność translacji 0.6 względem ARCA-RNA). Zastąpienie ugrupowania C-fosfonianowego ugrupowaniem fosfoestrowym, w związkach m⁷Gppp-OCH₂-tr-ApG (**7**) i m⁷Gppp-OCH₂-tr-A_mpG (**8**), nie poprawiło własności translacyjnych transkryptów, do których wbudowano te analogi. m⁷Gppp-tr-OCH₂A_mpG-RNA ulegało translacji tak samo wydajnie jak ARCA-RNA, czyli ok. 2.5-krotnie gorzej niż RNA ze związkiem m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (**9**). Podobne wyniki otrzymałem dla tetranukleotydowego analogu kapu, m⁷GpppG-3'OCH₂-tr-ApG (**10b**), w którym pierwsze wiązanie 3'-5' fosfodiesterowe zastąpiłem ugrupowaniem triazolowym. Wydajność translacji dla RNA posiadającego na końcu 5' kap m⁷GpppG-3'O-Ly3-CH₂-tr-ApG (**10b**), była niska i porównywalna z m⁷GpppG-RNA (0.6). Niska wydajność translacji m⁷GpppG-3'O-Ly3-CH₂-tr-ApG-RNA prawdopodobnie wynikała ze sztywności konformacyjnej powstałego w wyniku reakcji CuAAC ugrupowania triazolowego. Nie zbadałem wydajności translacji pozostałych związków z modyfikacją triazolową w obrębie wiązania 5'-3' fosfodiesterowego, m⁷GpppG-2'O-Ly3-CH₂-tr-ApG (**10a**) oraz m⁷GpppA_m-3'OCH₂-tr-G (**11**), z powodu ich niskiej wydajności kapingu (29 i 33%, [Rozdział II.12.2.](#)).

III.12.4 Produkcja białka lucyferazy *Gaussia* w komórkach dendrytycznych JAWS II

Dotychczasowo opisane badania dotyczące triazolowych analogów kapu były przeprowadzone w warunkach *in vitro*. Badania przeprowadzone w RRL pokazały, że właściwości translacyjne związków m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (**4**) i m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (**9**) są zbliżone do właściwości biologicznych niemodyfikowanego kapu – kapu 1. Aby odwzorować warunki zbliżone do tych panujących w ludzkim organizmie w ramach niniejszego projektu przeprowadzono badania w żywych komórkach, które miały na celu wyznaczenie wydajności biosyntezy białka lucyferazy *Gaussia* w komórkach dendrytycznych podczas procesu translacji mRNA zakończonego triazolowymi analogami kapu. Do badań wydajności syntezy białka wybrano komórki dendrytyczne linii JAWS II. Komórki dendrytyczne – komórki reprezentujące antygen – są komórkami układu odpornościowego indukującymi odpowiedź immunologiczną

przeciwko patogenom ¹⁹¹. Komórki dendrytyczne są wykorzystywane w immunoterapiach stosowanych przeciwko nowotworom, w których wykorzystuje się terapeutyczne mRNA ¹⁹². Z tego powodu komórki dendrytyczne wykorzystywane są do badań modyfikowanych mRNA o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym.

Badania wydajności syntezy białka lucyferazy *Gaussia* w komórkach dendrytycznych JAWS II zostały wykonane w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW przez dr Karolinę Drązkowską. Badania zostały przeprowadzone na długich mRNA, kodujących białko lucyferazę *Gaussia* i zakończonych triazolowymi analogami kapu. mRNA zostało zsyntezowane według protokołu opisanego w rozdziale 10.1. Komórki JAWS II były transfekowane otrzymanymi mRNA po czym ilość zsyntezowanego białka była mierzona po 16, 40, 64 i 88 h. Ilość zsyntezowanego białka wyznaczano poprzez pomiar luminescencji tak jak w przypadku reakcji prowadzonych w RRL (Rozdział III.12.3.). Otrzymane wyniki były porównywane z wynikami uzyskanymi dla mRNA zakończonych kapem ARCA oraz kapem 1. Niemal wszystkie przetestowane mRNA, z wyjątkiem mRNA z kapem m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (9), ulegały translacji co najmniej 2-krotnie gorzej niż mRNA zakończone dinukleotydowym kapem ARCA. mRNA zakończone związkiem m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (9) ulegało translacji najwydajniej spośród mRNA zakończonych triazolowymi analogami kapu (Rysunek 110A,B). Wydajność translacji takiego mRNA była porównywalna z wydajnością translacji mRNA z kapem 1 (Rysunek 110B).



Rysunek 110. Badanie wpływu modyfikacji kapu na ilość produkowanego białka z mRNA kodującego lucyferazę. Badanie przeprowadzono w komórkach dendrytycznych JAWSII. **A.** Produkcja białka w czasie 16, 40, 64 oraz 96 h od transfekcji; **B.** Całkowita ilość wyprodukowanego białka z mRNA w komórka dendrytycznych

Wyniki uzyskane w komórkach JAWS II pokazały, że najlepszym mimetykiem m⁷GpppA_mpG (kap 1) był kap m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (9) posiadający modyfikowany mostek tetrafosforanowy. Pozostałe triazolowe analogi kapu (1-8 oraz 10b) nie sprawdziły się jako mimetyki kapu 1 w tym układzie biologicznym. mRNA zakończone tymi analogami nie ulegało translacji w komórkach JAWS II, pomimo że niektóre z nich ulegały wydajnie translacji w RRL.

Na podstawie przeprowadzonych badań trudno jest jednoznacznie wyjaśnić z czego wynikają różnice w wydajności translacji uzyskane w komórkach JAWS II oraz RRL. Jednym z wytłumaczeń może być różnica w podatności mRNA na degradację enzymatyczną. W przypadku badań prowadzonych w RRL mRNA nie ulega degradacji. Obserwowana wydajność translacji wynika głównie z powinowactwa mRNA do maszyneryi translacyjnej. W przypadku badań prowadzonych w komórkach JAWS II, ilość wyprodukowanego białka (wydajność translacji) jest składową wielu procesów komórkowych, w które zaangażowane jest mRNA.

III.12.5 Oddziaływanie triazolowych analogów kapu z czynnikiem inicjującym translację 4E (eIF4E)

U eukariontów, podczas kap-zależnej translacji, etapem limitującym cały proces jest związanie struktury kapu przez białko eIF4E. Wytworzenie trwałego kompleksu eIF4E-m⁷G kap inicjuje kaskadę procesów mających na celu realizację procesu translacji mRNA (rozdział II.1.8.). Wysokie powinowactwo analogu kapu do białka eIF4E często koreluje z wysoką wydajnością translacji transkryptu zawierającego ten analog. Różnice w powinowactwie do eIF4E mogą być jedną z przyczyn różnic we właściwościach translacyjnych mRNA różnorodnie modyfikowanych na końcu 5'. Trwałość takiego kompleksu można wyznaczyć metodami biofizycznymi bazującymi na pomiarach spektroskopowych. Parametrem opisującym trwałość kompleksu białko-ligand jest stała dysocjacji (K_D), która jest odwrotnością stałej asocjacji (K_{AS}): $K_D = \frac{1}{K_{AS}} (\mu M^{-1})$. W niniejszej pracy do wyznaczenia stałych dysocjacji wykorzystałem metodę biofizyczną miareczkowania wygaszania fluorescencji (*ang. Fluorescent Quenching Titration; FQT*) polegającą na pomiarach zaniku naturalnej fluorescencji białka w wyniku wiązania ligandu w kieszeni wiążącej białka. Białko eIF4E w kieszeni wiążącej posiada dwie reszty tryptofanowe, które w formie niezawiązanej z ligandem, odpowiadają za jego naturalną fluorescencję w zakresie UV. W wyniku formowania się kompleksu białko eIF4E-m⁷G kap, naturalna fluorescencja białka eIF4E zostaje wygaszana. Wygaszenie fluorescencji jest spowodowane powstałym oddziaływaniem warstwowym (*ang. π - π stacking*) pomiędzy dodatnio naładowaną 7-metyloguanozyną, a tryptofanami biorącymi udział w wiązaniu ligandu. Na podstawie krzywej zaniku fluorescencji możliwe jest wyznaczenie stałej asocjacji (K_{AS}) stosując metodologię opisaną w literaturze¹⁹³. Stałą K_{AS} otrzymuje się poprzez dopasowanie odpowiedniej funkcji (4) do otrzymanych punktów, które otrzymuje się mierząc wartość fluorescencji w czasie miareczkowania białka eIF4E ligandem

¹⁹³.

$$F = F_0 - [cx] \cdot (\Delta\phi + \phi_{free-lig}) + [L] \cdot \phi_{free-lig} \quad (4)$$

$$[cx] = \frac{[L] + [P_{act}]}{2} + \frac{1 - \sqrt{(K_{AS}([L] - [P_{act}] + 1)^2 + 4K_{AS} \cdot [P_{act}])}}{2K_{AS}} \quad (5)$$

, gdzie F – intensywność fluorescencji; F_0 – fluorescencja początkowa; $\Delta\phi$ – różnica intensywności fluorescencji pomiędzy intensywnością fluorescencji białka w formie apo oraz w kompleksie z ligandem; $\phi_{free-lig}$ – fluorescencje pochodząca od ligandu (kapu); $[L]$ – stężenie ligandu, $[P_{act}]$ – stężenie aktywnego białka. W obliczeniach intensywności fluorescencji, która umożliwiła wyznaczenie krzywych miareczkowania, uwzględniłem efekt filtra wewnętrznego, zgodnie z literaturą.¹⁹³

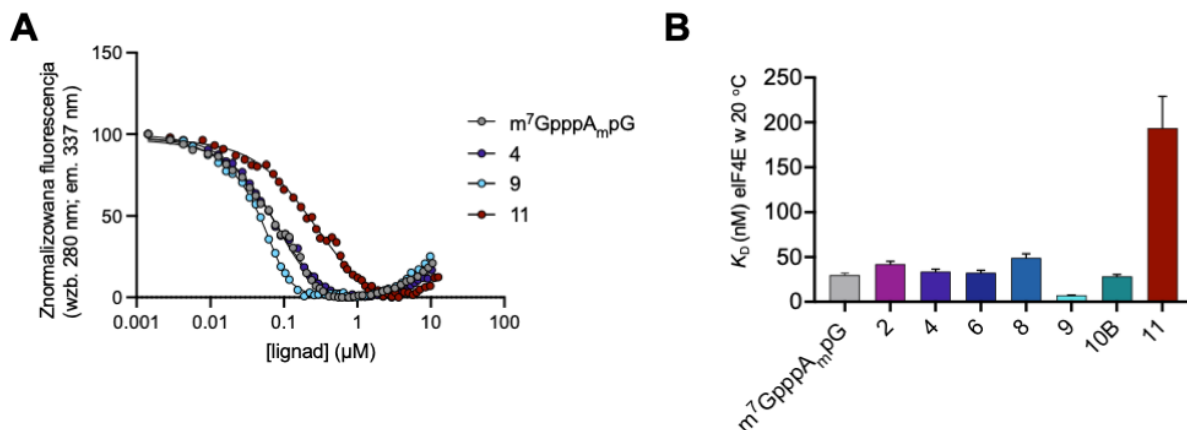
Za pomocą metody FQT wyznaczyłem stałe dysocjacji dla wybranych triazolowych analogów kapu $m^7Gppp\text{-tr-AmpG}$ (**2**), $m^7Gppp\text{-CH}_2\text{-tr-AmpG}$ (**4**), $m^7Gppp\text{-C}_2\text{H}_4\text{-tr-AmpG}$ (**6**), $m^7Gppp\text{-OCH}_2\text{-tr-AmpG}$ (**8**), $m^7Gppp\text{-tr-C}_2\text{H}_4pAmpG$ (**9**), $m^7GpppG\text{-3'O-ly3-CH}_2\text{-tr-ApG}$ (**10b**)

oraz $m^7GpppA_m\text{-3'-OCH}_2\text{-tr-G}$ (**11**), w celu określenia ich powinowactwa do białka eIF4E odpowiedzialnego za proces inicjacji translacji mRNA. Do badań powinowactwa triazolowych analogów kapu do białka eIF4E wybrałem związki posiadające dodatkową metylację w pozycji 2'-OH adenozyiny – analogi kapu1, oraz związki posiadające modyfikację w obrębie wiązania fosfodiesterowego. Stałe K_D wyznaczyłem dla mysiego białka eIF4E (*meIF4E*, 28-217 AA) zsyntezowanego i oczyszczonego w Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii UW¹⁹⁴. Miareczkowanie prowadziłem w 20 °C, w roztworze buforowym 50 mM HEPES/KOH pH 7.2 zawierającym dodatkowo 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA oraz 1 mM DTT. Białko *meIF4E* (0.1 μ M, 1400 μ l) miareczkowałem dodając w 1-minutowych odstępach po 1 μ l kapu z odpowiedniego roztworu stężonego. Pomiar fluorescencji wykonałem wzbudzając badaną próbkę (tryptofany) przy 280 nm i obserwując fluorescencję emitowaną przy 337 nm. Miareczkowanie prowadziłem do czasu wysycenia próbki ligandem, co objawiało się wzrostem obserwowanej fluorescencji po jej wcześniejszym wygaszeniu (w związku z pojawiającą się fluorescencją wolnego ligandu). Na podstawie zebranych danych, wykreśliłem krzywe zależności zaniku fluorescencji od stężenia ligandu ([Rysunek 111A](#)), uwzględniając przy tym poprawki związane z efektem filtra wewnętrznego oraz rozcieńczeniem próbki¹⁹³, a następnie do otrzymanych punktów dopasowałem krzywe o równaniu funkcji (4).

Tabela 8. Wartości stałych dysocjacji K_D wraz z niepewnościami obliczonymi metodą propagacji małych błędów. Stałe wyznaczone za pomocą metody FQT.

Związek (nr)	K_D (nM)	ΔK_D (nM)
$m^7GpppA_m\text{pG}$ – kap1	29.6	± 2.3
$m^7Gppp\text{-tr-AmpG}$ (2)	42.0	± 3.4
$m^7Gppp\text{-CH}_2\text{-tr-AmpG}$ (4)	33.7	± 2.8

m ⁷ Gppp-C ₂ H ₄ -tr-A _m pG (6)	32.5	± 2.8
m ⁷ Gppp-OCH ₂ -tr-A _m pG (8)	49.2	± 4.4
m ⁷ Gppp-tr-C ₂ H ₄ pA _m pG (9)	7.35	± 0.20
m ⁷ GpppG-3'-O-ly ³ -CH ₂ -tr-ApG (10b)	28.3	± 2.3
m ⁷ GpppA _m -3'-OCH ₂ -tr-G (11)	194	± 35.3



Rysunek 111. Wyznaczenie powinowactwa triazolowych analogów kapu do białka eIF4E za pomocą miareczkowania wygaszania fluorescencji. **A.** Przykładowe krzywe wygaszania fluorescencji białka spowodowane wiązaniem kapu w kieszeni wiążącej; **B.** Otrzymane wartości stałych asocjacji dla oddziaływania kap-eIF4E.

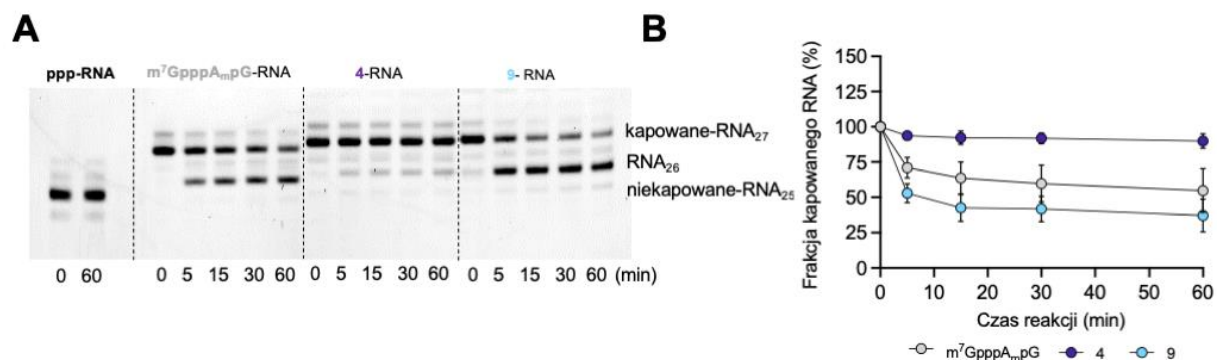
Otrzymane wartości stałej K_D (Tabela 8) porównałem ze stałą uzyskaną dla niemodyfikowanego trinukleotydowego kapu 1, który wiąże się do białka eIF4E z wysokim powinowactwem, a mRNA zakończone tym kapem ulega translacji bardzo wydajnie zarówno w warunkach *in vitro* jak i w żywych komórkach (Rozdział III.12.3 i III.12.4). Porównanie uzyskanych wartości stałych K_D pokazuje, że najwyższe powinowactwo do białka eIF4E (czyli najniższą wartość stałej dysocjacji) posiada związek m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (**9**). Stała dysocjacji dla tego związku wyniosła zaledwie 7.35 ± 0.20 nM, co jest 4-krotnie niższą wartością niż wartość uzyskana dla m⁷GpppA_mpG (kap 1) (29.6 ± 2.3 nM). Wysokie powinowactwo do białka eIF4E, związek (**9**), zawdzięcza prawdopodobnie dodatkowej grupie fosforanowej wprowadzonej w obrębie mostka 5',5' fosforanowego. Dodatkowa grupa fosforanowa wprowadza do struktury kapu dodatkowy ujemny ładunek, który oddziałuje elektrostatycznie z dodatnio naładowanymi aminokwasami znajdującymi się w kieszeni wiążącej białka eIF4E¹⁹⁵. Związki m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (**4**) i m⁷Gppp-C₂H₄-tr-A_mpG (**6**), wykazują podobne powinowactwo do białka eIF4E jak m⁷GpppA_mpG (kap 1). Stałe K_D otrzymane dla związków (**4**) i (**6**) wynoszą odpowiednio 33.7 ± 3.4 i 32.5 ± 2.8 nM. Związek, w którym pierścień triazolowy był połączony bezpośrednio z resztą fosforanową, m⁷Gppp-tr-A_mpG (**2**), wykazywał niższe powinowactwo do białka eIF4E niż niemodyfikowany analog kapu (kap 1). Wartość K_D dla tego związku wyniosła 42.0 ± 3.4 nM. Obniżenie powinowactwa związku (**2**) do białka eIF4E jest prawdopodobnie spowodowane usztywnieniem mostka 5',5'-trifosforanowego przez pierścień triazolowy. Usztywnienie to nie występuje w związkach (**4**) i (**6**), z powodu wprowadzenia linkera jedno- lub dwuwęglowego, co przekłada się na

oddziaływanie w kieszeni wiążącej białka. To samo zjawisko było widoczne w badaniach wydajności translacji w RRL ([Rozdział III.12.3.](#)). Najwyższą wartość K_D – najniższe powinowactwo do białka eIF4E, posiadał związek **8**, w którym linker łączący pierścień triazolowy z grupą fosforanową został przyłączony za pomocą wiązania estrowego. Wartość K_D otrzymana dla tego związku wynosiła 49.2 ± 4.4 nM. Wśród związków posiadających modyfikację w obrębie wiązania fosfodiesterowego najwyższym powinowactwem do białka eIF4E charakteryzował się związek **10b**, będący tetranukleotydem. Obliczona wartość K_D dla tego związku była porównywalna dla wartości otrzymanej dla kapu 1 i wynosiła 28.3 ± 2.3 nM. Z kolei związek $m^7GpppA_m-3'-OCH_2-tr-G$, którego struktura przestrzenna najbardziej przypomina strukturę niemodyfikowanego trinukleotydowego kapu, nie wykazuje powinowactwa do białka eIF4E ($K_D = 194 \pm 35.3$ nM). Pomimo doniesień literaturowych mówiących o tym, że pierścień triazolowy może być mimetykiem grupy 3',5'-fosfodiesterowej w kwasach nukleinowych¹⁹⁶, wyniki moich badań wskazują, że pierścień triazolowy nie jest dobrym mimetykiem pierwszego wiązania fosfodiesterowego w mRNA.

III.12.6 Odporność mRNA zakończonego triazolowymi analogami kapu na degradację enzymatyczną przez kompleks hDcp1/Dcp2

Nie tylko powinowactwo do białka eIF4E, ale również stabilność mRNA jest czynnikiem wpływającym na wydajność translacji mRNA. Badania opisane w poprzednim rozdziale ([Rozdział III.12.5.](#)) pokazały, że prawie wszystkie triazolowe analogi kapu wykazują podobne powinowactwo do czynnika inicjującego translację (eIF4E). Wyjątkiem był kap $m^7Gppp-tr-C_2H_4pA_m pG$ (**9**), który wykazywał 4-krotnie wyższe powinowactwo do eIF4E niż naturalnie występujący kap1. Drugim wyjątkiem był kap $m^7GpppA_m-3'OCH_2-tr-G$ (**11**), który był słabym ligandem dla białka eIF4E. Podobne powinowactwo do białka eIF4E analogów kapu (**1-8** oraz **10b**) ([Tabela 8, Rozdział III.12.5.](#)) nie koreluje z wynikami wydajności translacji w RRL oraz w komórkach JAWS II ([rozdziały III.12.3. i III.12.4.](#)). Największa rozbieżność pomiędzy wyniki w RRL i JAWSII była widoczna dla mRNA zakończonego analogiem kapu $m^7Gppp-CH_2-tr-A_m pG$ (**4**) ($K_D = 33.7 \pm 2.8$ nM), którego wydajność translacji w RRL wynosiła 1.87 ± 0.14 (w porównaniu do $m^7GpppA_m pG-RNA$ 2.54 ± 0.24 , $K_D = 29.6 \pm 2.3$ nM), podczas gdy w komórkach JAWS II wyniosła zaledwie 0.42 ± 0.19 (w porównaniu do $m^7GpppA_m pG-RNA$ 5.93 ± 0.42). Rozbieżność tych wyników, może sugerować, że mRNA zakończone analogiem kapu (**4**) w komórkach JAWS II jest niestabilne. W celu potwierdzenia tej hipotezy, przeprowadzono eksperyment, w którym sprawdzono podatność na hydrolizę, krótkiego mRNA (27-nt) zakończonego analogami kapu $m^7Gppp-CH_2-tr-A_m pG$ (**4**) oraz $m^7Gppp-tr-C_2H_4pA_m pG$ (**9**) przez kompleks hDcp1/Dcp2, odpowiedzialny za degradację mRNA od końca 5' ([rozdział II.1.9.1.](#)). Jako kontrolę w tym eksperymencie wykorzystano 27-nt RNA zakończone $m^7GpppA_m pG$ (kap1). Badania te zostały przeprowadzone w Laboratorium Chemii

Biologicznej w Centrum Nowych Technologii przez mgr Marcelinę Bednarczyk. mRNA do tego eksperymentu zostało zsyntezowane zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale III.12.1.1. Zsyntezowane mRNA zostało poddane reakcji enzymatycznej w obecności enzymu hDcp1/Dcp2. Przebieg reakcji enzymatycznej był monitorowany za pomocą wysokorozdzielczego żelu denaturującego (15% poliakrylamidowego z 8 M mocznikiem). Otrzymane wyniki zostały przedstawione na rysunku 112.



Rysunek 112. Podatność na degradację kapowanego RNA przez kompleks hDcp1/Dcp2. **A.** Reprezentatywna analiza PAGE; RNA₂₅: Niekapowane RNA. RNA₂₇ - RNA kapowane m⁷GpppA_{mp}G, związkiem 4 lub związkiem 9. RNA₂₆: odcięte przez hDcp1/Dcp2; **B.** Porównanie degradacji RNA odciętego przez m⁷GpppA_{mp}G, 4 i 9 w czasie. Dane reprezentują wartość średnią ± SD obliczoną dla dwóch powtórzeń.

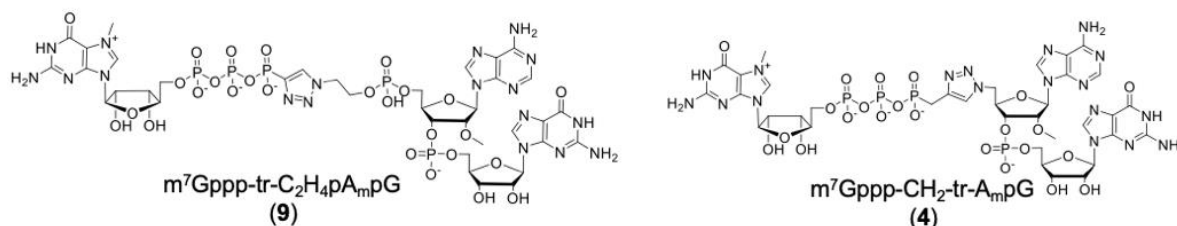
Przeprowadzone badania pokazały, że w zastosowanych warunkach, RNA zakończone analogiem kapu m⁷Gppp-CH₂-tr-A_{mp}G (4) było całkowicie odporne na degradację przez kompleks hDcp1/Dcp2. Co ciekawe, RNA zakończone analogiem kapu m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_{mp}G (9), które było wyrażane najwydajniej zarówno w RRL jak i w żywych komórkach JAWS II spośród triazolowych analogów kapu, ulegało degradacji szybciej niż RNA zakończone niemodyfikowanym analogiem kapu (m⁷GpppA_{mp}G). Uzyskane wyniki, zestawione wraz z wynikami eksperymentów dotyczących wydajności translacji w RRL i komórkach JAWS II (rozdziały III.12.3. i III.12.4.) oraz z wynikami dotyczącymi powinowactwo analogów kapu do białka eIF4E (rozdział III.12.5.) mogą sugerować, że powinowactwo do białka eIF4E oraz elastyczność konformacyjna triazolowych analogów kapu mają większy wpływ na właściwości translacyjne mRNA w komórkach dendrytycznych JAWS II niż odporność na degradację enzymatyczną przez kompleks hDcp1/Dcp2.

III.13 Perspektywy na dalsze badania triazolowych trinukleotydowych analogów końca 5' mRNA

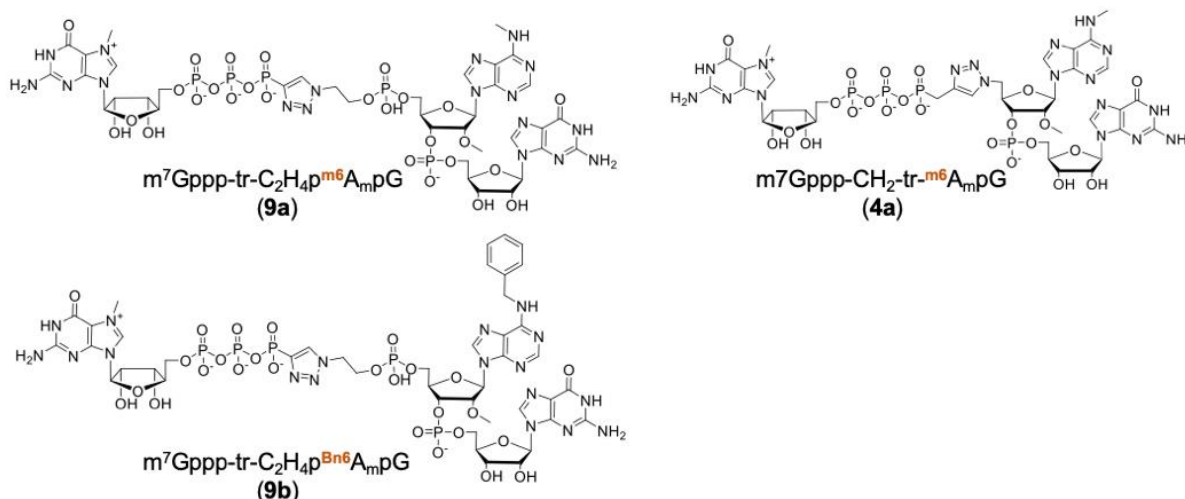
Mapowanie transkryptomu pokazało, że metylacja pozycji N6 adenozyiny jest najczęściej występującą modyfikacją eukariotycznego mRNA. N6-metyloadenozyna znacząco wpływa na cały metabolizm mRNA w tym splicing mRNA, eksport mRNA, translację mRNA, a także wpływa na jego stabilność¹⁹⁷. Fakt ten sprawia, że modyfikacja ta zaczęła być szerzej eksplorowana, również w kontekście analogów końca 5' mRNA⁸. Wykorzystując widzę

zdobytą podczas niniejszego projektu doktorskiego, na temat triazolowych trinukleotydowych analogów kapu, zaprojektowałem i zsyntezowałem nowe triazolowe analogi kapu posiadającą modyfikację w pozycji N6 adenozyiny. W nowo zaprojektowanych związkach połączyłem modyfikacje triazolowe, dające najlepsze wyniki w badaniach w RRL i w żywych komórkach, z modyfikacjami zasady azotowej pierwszego transkrybowanego nukleotydu – pozycji N6 adenozyiny. Zastosowanymi modyfikacjami triazolowymi były modyfikacje wprowadzone w związkach $m^7Gppp-CH_2-tr-A_m pG$ (**4**) i $m^7Gppp-tr-C_2H_4pA_m pG$ (**9**). Wprowadzonymi modyfikacjami w obrębie zasady azotowej była metylacja oraz benzylacja N6 pozycji adenozyiny. Połączenie modyfikacji triazolowych z modyfikacjami w obrębie zasad azotowej, w założeniu miały na celu zwiększenie właściwości translacyjnych triazolowych analogów kapu przy jednoczesnym uproszczeniu syntezy tych związków, dzięki zastosowaniu syntezy za pomocą reakcji CuAAC. Nowo zsyntezowane związki wykorzystałem do wstępnych badań w RRL w celu określenia ich właściwości translacyjnych. Struktury zaprojektowanych związków przedstawiłem na rysunku 113. Związki te zsyntezowałem wykorzystując opracowane przeze mnie procedury, które zostały opisane w niniejszej pracy w poprzednich rozdziałach (III.11.3 i III.11.4.).

Triazolowe trinukleotydowe analogi kapu o najlepszych właściwościach biologicznych i biochemicznych



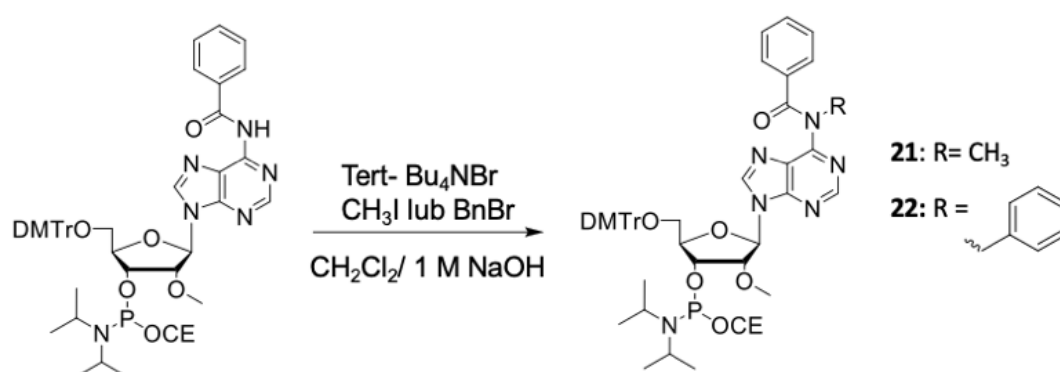
Nowe triazolowe trinukleotydowe analogi kapu z modyfikacjami w obrębie N6 pozycji adenozyiny



Rysunek 113. Struktury chemiczne nowych trinukleotydowych pochodnych końca 5' mRNA, z modyfikacjami w obrębie N6 pozycji adenozyiny.

Tak jak w przypadku syntezy związków (**1-9**), syntezę trinukleotydowych triazolowych analogów kapu rozpocząłem od syntezy dinukleotydów posiadających terminalne

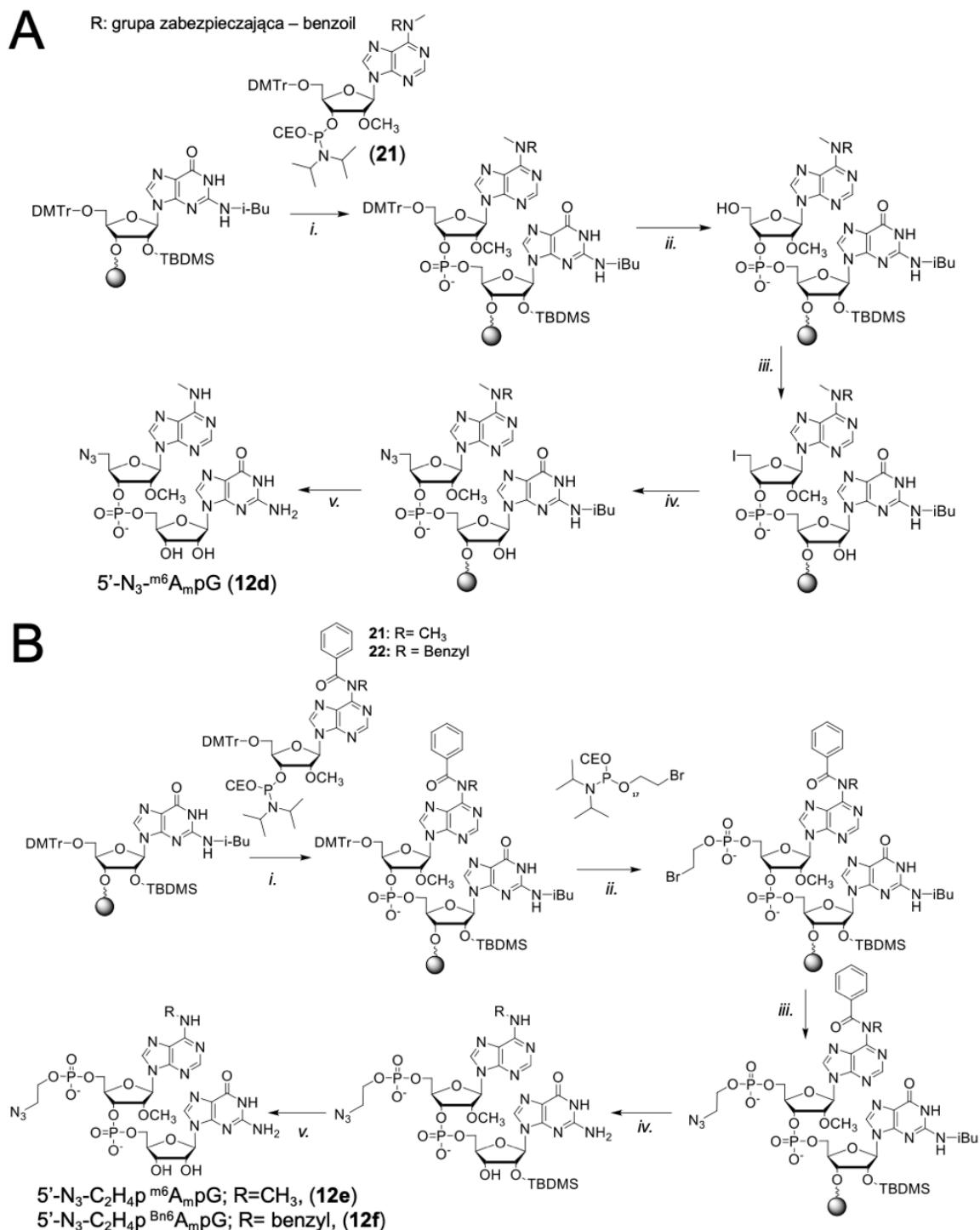
ugrupowanie azydkowe, który otrzymałem za pomocą syntezy na podłożu stałym. Jednakże, w tym przypadku do syntezy na podłożu stałym użyłem modyfikowanych w pozycji N6, grupą metylową oraz benzyłową, amidofosforynów. Modyfikowane w pozycji N6 amidofosforyny adenozyiny zsyntezowałem za pomocą reakcji katalizy przeniesienia międzyfazowego (*ang. Phase Transfer Catalysis*, PTC). Reakcja katalizy przeniesienia międzyfazowego jest jedną z technik stosowanych w chemii organicznej polegająca na syntezie chemicznej układzie heterofazowym z udziałem katalizatora przeniesienia fazowego (*ang. Phase transfer catalyst*). Katalizator przeniesienia fazowego jest odpowiedzialny za transfer reagentów z fazy, w której są rozpuszczalne do fazy, w której zachodzi reakcja. W swojej pracy, wcześniej zoptymalizowane i opisane w literaturze warunki reakcji, wykorzystałem do otrzymania amidofosforynów posiadających grupę metylową (5'-O-DMTr-2'-OMe-3'-amidofosforyn N6-metylo-adenozyiny, **21**) oraz benzyłową (5'-O-DMTr-2'-OMe-3'-amidofosforyn N6-benzylo-adenozyiny, **22**) w pozycji N6 adenozyiny¹⁹⁸. Punktem startowym syntezy był handlowo dostępny amidofosforyn (5'-O-DMTr-2'-OMe-3'-amidofosforyn N6-benzoil-adenozyiny). Odczynnikami alkilującymi był jodek metylu (CH₃I) lub bromek benzyłu (BnBr). W przeprowadzonych przeze mnie reakcji, fazą organiczną był chlorek metylenu (CH₂Cl₂), a fazą nieorganiczną był wodny roztwór wodorotlenku sodu (NaOH_{aq}, 1 M). Katalizatorem w reakcji PTC był bromek *tert*-Butylo amonu (*tert*Bu⁺NBr⁻), który był odpowiedzialny w tej reakcji za transfer anionu z fazy wodnej do fazy organicznej. Transfer anionu (OH⁻) powodował deprotonację N6 pozycji amidofosforynu umożliwiając tym samym podstawienie grupą metylową lub benzyłową (metyl lub benzył)([Rysunek 114](#)).



Rysunek 114. Schemat syntezy amidofosforynów modyfikowanych w obrębie N6 zasady azotowej. Modyfikacja metylowa oraz benzyłowa.

W wyniku reakcji PTC otrzymałem dwa amidofosforyny, każdy w postaci mieszaniny dwóch diastereoizomerów. Otrzymane związki oczyściłem za pomocą chromatografii cieczowej ze złożem krzemionkowym w układzie heksan: octan etylu (od 0-100% octanu etylu), a następnie wykorzystałem z powodzeniem do syntezy modyfikowanych dinukleotydów przy użyciu

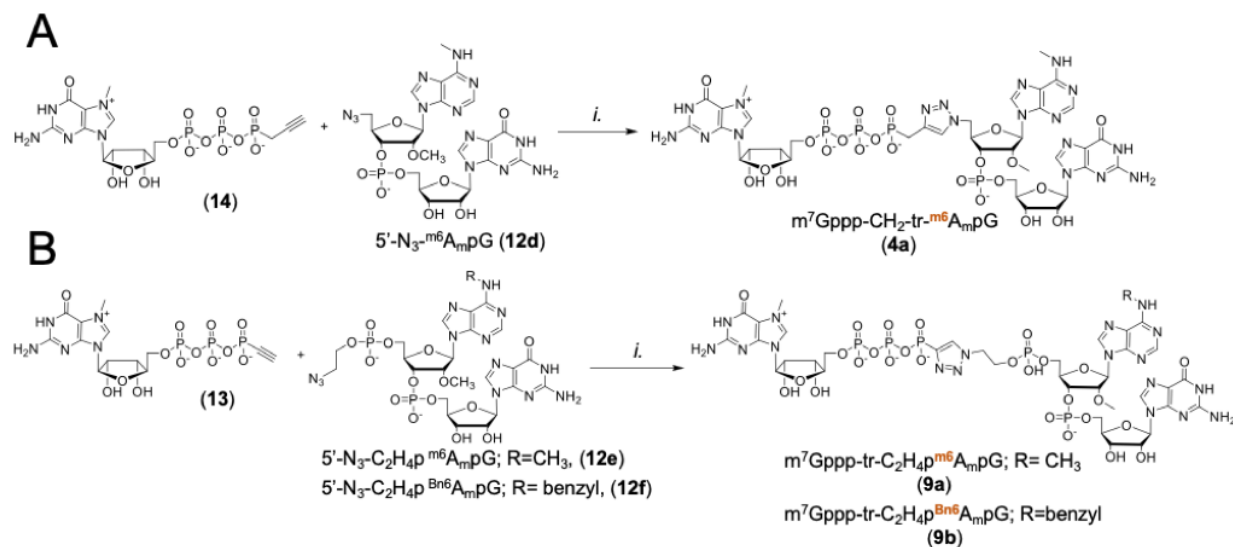
syntezy na podłożu stałym (Rysunek 115 A,B), stosując procedurę opisaną w rozdziale III.11.1..



Rysunek 115. Syntezy dinukleotydw z grupą azydkową z dodatkową modyfikacją w obrębie pozycji N6 adenozy. **A.** Synteza dinukleotydu z przyłączoną grupą azydkową bezpośrednio w pozycji 5' rybozy. Etapy syntezy *i.* Detritylacja – kwas dichlorooctowy (DCA) 3%, Aktywacja amidofosforynu i reakcja sprzęgania z amidofosforynem **21** w obecności 5-benzyltiol-1H-tetrazol, Utlenianie grupy fosforanowej – 0.05 M roztwór jodu w pirydynie; *ii.* Detritylacja – kwas dichlorooctowy (DCA) 3%; *iii.* Jodowanie pozycji 5'-OH - (Ph₃PCH₃⁺I⁻) w DMF; *iv.* Azydowanie – nasycony roztwór NaN₃ w DMF, 1 h, 60 °C; *v.* Odbezpieczanie oraz odcinanie od złoza – roztwór amoniak : metyloamina (AMA) (1:1, v/v), 37 °C, 4 h; **B.** Synteza dinukleotydu z grupą azydkową przyłączoną do grupy fosforanowej w pozycji 5'. . Detritylacja – kwas dichlorooctowy (DCA) 3%, Aktywacja amidofosforynu i reakcja sprzęgania z amidofosforynem **22** w obecności 5-benzyltiol-1H-tetrazol; Utlenianie grupy fosforanowej – 0.05 M

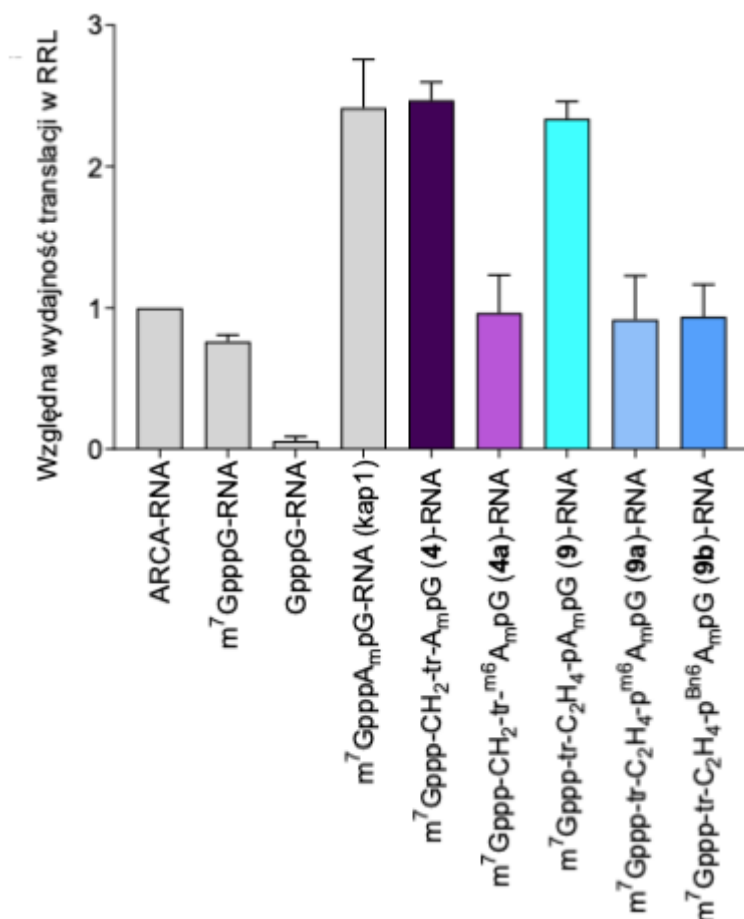
roztwór jodu w pirydynie; ; Detrytylacja – kwas dichlorooctowy (DCA) 3%; *ii.* reakcja sprzęgania z amidofosforem **17** w obecności 5-benzyltiol-1H-tetrazol; Utlenianie grupy fosforanowej – 0.05 M roztwór jodu w pirydynie; *iii.* Azydowanie – nasycony roztwór NaN₃ w DMF, 1 h, 60 °C; *iv.* Odbezpieczanie: TEA · 3HF, DMSO, 3 h, 65 °C; *v.* Odbezpieczanie oraz odcinanie od złoza – roztwór amoniak : metyloamina (AMA) (1:1, v/v), 37 °C, 4 h. .

Nowe triazolowe analogi kapu otrzymałem łącząc za pomocą reakcji CuAAC odpowiednie dinukleotydy, z ugrupowaniem azydkowym, z 5'-trifosforanami 7-metyloguanozyny posiadającymi terminalną grupę alkilową, stosując procedurę opisaną w rozdziale III.11.3.



Rysunek 116. Schemat syntezy triazolowych trinukleotydowych analogów kapu. *i.* CuSO₄, askorbinian sodu, H₂O, rt.

Zsyntezowane analogi kapu (Rysunek 116), posiadające modyfikacje triazolowe oraz dodatkową grupę metylową lub benzylową, w pozycji N6 pierwszej transkrybowanej adenozy, wykorzystałem do badań mających na celu sprawdzenie wpływu modyfikacji w pozycji N6 adenozy na translację mRNA. Otrzymane analogi kapu wbudowałem do długich fragmentów RNA, kodujących białko lucyferazę *Gaussia*, za pomocą reakcji IVT korzystając z wcześniej opracowanych warunków (Rozdział III.12.1.2). Otrzymane w wyniku reakcji IVT kapowane mRNA wykorzystałem do badań w lizatach komórkowym z retikulocytów króliczych (RRL). Badania przeprowadzone w lizatach komórkowych (RRL) przeprowadziłem w uprzednio opisanych warunkach (Rozdział III.12.3.). Jako kontrolę wykorzystałem mRNA kodujące *Gaussia* lucyferazę zakończoną związkami: ARCA, m⁷GpppG, GpppG (kontrola negatywna), m⁷GpppAmpG (kap 1), m⁷GpppCH₂tr-AmpG (**4**) oraz m⁷Gppp-tr-C₂H₄pAmpG (**9**). Otrzymane wyniki znormalizowałem względem wyników uzyskanych dla mRNA zakończonego związkiem ARCA (Rysunek 117).



Rysunek 117. Względna wydajność translacji w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych. Wyniki zostały przedstawione w postaci histogramu reprezentującego średnią wartość z trzech powtórzeń technicznych (Mean $\pm$ SD). Wyniki zostały znormalizowane względem mRNA zakończonego kapem ARCA.

Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że połączenie modyfikacji N6 metylowej i benzylowej z triazolowymi mostkowymi modyfikacjami nie wpłynęły pozytywnie na wydajność translacji mRNA zakończonego nowymi analogami kapu) w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych (RRL) (Rysunek 117, Tabela 9). Otrzymane przeze mnie transkrypty zakończone analogami kapu (4a, 9a i 9b, Rysunek 116) ulegały translacji mniej wydajnie niż transkrypty zakończone analogami kapu niemodyfikowanymi w pozycji N6 (m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (4) oraz m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (9)). mRNA zakończone związkami m⁷Gppp-CH₂-tr-m⁶A_mpG (4a), m⁷Gppp-tr-C₂H₄p^{m6}A_mpG (9a) oraz m⁷Gppp-tr-C₂H₄p^{Bn6}A_mpG (9b) ulegały translacji w RRL porównywalnie do mRNA zakończonego dinukleotydowym związkiem ARCA, podczas gdy mRNA zakończone m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (4) oraz m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (9) – bez modyfikacji N6, ulegały translacji 2.5-krotnie wydajniej – porównywalnie do mRNA zakończonego m⁷GpppA_mpG (kap1).

Tabela 9. Względna wydajność translacji mRNA kodującego białko lucyferazę *Gaussia* w RRL. Wyniki zostały znormalizowane względem mRNA zakończonego kapem ARCA. Wyniki przedstawiają wartość średnią z 3 powtórzeń technicznych $\pm$ SEM.

Kapowane -RNA	Względna wydajność translacji $\pm$ SEM
ARCA	1
m ⁷ GpppG	0.76 $\pm$ 0.03
GpppG	0.06 $\pm$ 0.02
n ⁷ GpppA _m pG (kap1)	2.41 $\pm$ 0.24
m ⁷ Gppp-CH ₂ -tr-A _m pG (4)	2.47 $\pm$ 0.09
m ⁷ Gppp-CH ₂ -tr- ^{m6} A _m pG (4a)	0.97 $\pm$ 0.16
m ⁷ Gppp-tr-C ₂ H ₄ -pA _m pG (9)	2.34 $\pm$ 0.07
m ⁷ Gppp-tr-C ₂ H ₄ -p ^{m6} A _m pG (9a)	0.92 $\pm$ 0.18
m ⁷ Gppp-tr-C ₂ H ₄ -p ^{Bn6} A _m pG (9a)	0.94 $\pm$ 0.13

Otrzymane przeze mnie wyniki pokazały, że modyfikacja pozycji N6 adenozyiny grupami metylową lub benzyłową w połączeniu z modyfikacjami triazolowymi w obrębie mostka trifosforanowego nie zwiększają bezpośrednio wydajności (szybkości) translacji mRNA w badanym układzie (RRL). Wcześniejsze badania przeprowadzone w laboratorium chemii biologicznej (CeNT UW)(badania nieopublikowane) pokazały znaczny wzrost produkcji białka z RNA zakończonego analogami kapu z modyfikacjami pozycji N6 pierwszej transkrybowanej adenozyiny. Jednak wzrost ten był widoczny dopiero na poziomie badań komórkowych oraz *in vivo*. Wyniki te sugerują, że wzrost syntezy białka z mRNA nie wynika bezpośrednio ze zwiększenia szybkości translacji mRNA (co obserwowane jest w RRL), a z innych czynników (procesów komórkowych), które w RRL nie zachodzą. Z tego powodu, aby w pełni potwierdzić oraz zrozumieć wpływ modyfikacji w pozycji N6 adenozyiny triazolowych analogów kapu należałoby wykonać dodatkowe badania w żywych komórkach, gdzie efekt tej tych modyfikacji może być zaobserwowany.

III.14 Podsumowanie drugiej części rozprawy doktorskiej dotyczącej triazolowych analogów kapu

Druga część badań mojej rozprawy doktorskiej dotyczyła badania wpływu modyfikacji końca 5' mRNA (kapu) na wydajność translacji mRNA. W ramach tej części projektu zaprojektowałem nową ścieżkę syntezy chemicznej trinukleotydowych analogów kapu, w której wykorzystałem chemię typu „click” – reakcję CuAAC. Przy użyciu reakcji CuAAC zsyntezowałem 9 analogów kapu posiadających modyfikację w obrębie mostka trifosforanowego (m⁷Gppp-tr-ApG (1), m⁷Gppp-tr-A_mpG (2), m⁷Gppp-CH₂-tr-ApG (3), m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (4), m⁷Gppp-C₂H₄-tr-ApG (5), m⁷Gppp-C₂H₄-tr-A_mpG (6), m⁷Gppp-OCH₂-tr-ApG (7), m⁷Gppp-OCH₂-tr-A_mpG (8) oraz m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (9)), a także 3 analogi kapu posiadające modyfikacje w orbębie pierwszego wiązania fosfodiesterowego (m⁷GpppG-2'O-karb-CH₂-tr-ApG (10a), m⁷GpppG-3'O-karb-CH₂-tr-ApG (10b) oraz m⁷GpppA_m-3'OCH₂-tr-G (11). W pierwszej kolejności, w celu zsyntezowania wyżej wymienionych związków, zsyntezowałem odpowiednie podjednostki dinukleotydowe posiadające terminalną grupę azydkową (5'-N₃ApG (12a), 5'-N₃-A_mpG (12b)

oraz 5'-N₃-C₂H₄pA_mpG (**12c**)). Związki **12a-c** otrzymałem za pomocą syntezy na podłożu stałym. Synteza związku **12c** dodatkowo wymagała zsyntezowania modyfikowanego amidofosforiny z dwu węglowym łącznikiem, do którego był przyłączony brom (związek **17**). W następnym kroku, związki **12a-c** połączyłem w reakcji CuAAC z odpowiednio modyfikowanymi (grupami alkilowymi) pochodnymi m⁷GTP (związki **13-16**) lub pochodnymi kapu (m⁷GpppG_{Ly3} (izomer 2' i 3') oraz m⁷GpppA_m-3'OC₃H₃ (**20**)). Dzięki zoptymalizowanym warunkom CuAAC czas ostatniego etapu syntezy skróciłem do maksymalnie 2 h, podczas gdy powszechnie stosowana procedura, wykorzystująca P-imidazolid m⁷GDP, wymaga co najmniej 24 h. Struktury otrzymanych związków potwierdziłem przy użyciu metod spektroskopowych (NMR). Otrzymane przeze mnie analogi kapu posłużyły jako narzędzie do badania translacji RNA. Związki te, w pierwszej kolejności zostały wbudowane do krótkiego RNA (35 nt) podczas reakcji transkrypcji *in vitro*. Przy użyciu powstałego RNA został wyznaczony wydajność kapingu (wydajność ko-transkrypcyjnego wbudowywania kapu do RNA). Najwyższą wydajnością kapingu charakteryzował się związek m⁷Gppp-tr-A_mpG (**2**, 75%), podczas gdy niemodyfikowany kap – m⁷GpppA_mpG wbudowywał się do RNA z wydajnością 88%. Wysoką wydajnością kapingu charakteryzował się również związek m⁷Gppp-tr-C₂H₄pA_mpG (**9**, 69%). Pozostałe analogi kapu wbudowywał się z wydajnością od 66-29%. Najniższymi wydajnościami kapingu charakteryzowały się związki m⁷GpppG-2'O-karb-CH₂-tr-ApG (**10a**) i m⁷GpppA_m-3'OCH₂-tr-G (**11**) posiadające modyfikację w obrębie wiązania fosfodiesterowego. Dość dobra wydajność kapingu >60% świadczy o tym, że wprowadzone modyfikacje są rozpoznawane przez polimerazę T7. Kolejnym krokiem było wykorzystanie związków **1-9** oraz **10b** (dla których wydajność kapingu była wyższa niż 33%) do otrzymania długiego RNA, kodującego białko reporterowe lucyferazę *Gaussia*. Za pomocą otrzymanych RNA zbadałem wpływ modyfikacji analogu kapu na wydajność translacji w lizatach komórkowych RRL. W tych badaniach najwyższą wydajność translacji uzyskałem dla RNA zakończonego analogiem kapu m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (**4**) i m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (**9**), które ulegało translacji równie wydajnie jak RNA zakończone niemodyfikowanym kapem (m⁷GpppApG i m⁷GpppA_mpG). Zsyntezowane w ten sam sposób RNA zostało również wykorzystane do badań translacji w komórkach dendrytycznych JAWS II. Otrzymane wyniki pokazały, że RNA zakończone m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (**9**) ulega translacji równie wydajnie jak RNA zakończone kapem m⁷GpppA_mpG. Wynik ten sugeruje, że związek m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (**9**) może być dobrym mimetykiem naturalnego kapu m⁷GpppA_mpG, przy czym synteza związku m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (**9**), przy zastosowaniu zoptymalizowanej przeze mnie reakcji CuAAC jest znacznie szybsza. Dodatkowo, zbadana została stabilność RNA zakończonego kapami m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (**4**) i m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (**9**) na degradację przez kompleks Dcp1/Dcp2. Otrzymane wyniki pokazały, że związek (**4**) był całkowicie odporny na degradację enzymatyczną w testowanych warunkach, podczas gdy związek m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (**9**) ulegał degradacji szybciej niż niemodyfikowany kap.

Na koniec wyznaczyłem powinowactwo otrzymanych analogów kapu (**2**, **4**, **6**, **8**, **9**, **10b** oraz **11**) względem białka eIF4E za pomocą metody spektroskopowej (FQT). Niemal wszystkie zbadane związki posiadały zbliżone powinowactwo do białka eIF4E jak niemodyfikowany analog kapu ($m^7GpppA_{mp}G$, $K_D = 29.6 \pm 2.3$ nM). Wyjątkami był związek $m^7Gppp\text{-tr-C}_2\text{H}_4\text{-pA}_{mp}G$ (**9**), który 4-krotnie silniej wiązał się do białka eIF4E niż niemodyfikowany kap ($m^7GpppA_{mp}G$, $K_D = 7.35 \pm 0.2$ nM) oraz związek **11**, które z kolei wykazywał znacznie obniżone powinowactwo do eIF4E ($K_D = 195 \pm 35.5$ nM). Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że $m^7Gppp\text{-tr-C}_2\text{H}_4\text{-pA}_{mp}G$ (**9**) posiada porównywalne właściwości biologiczne jak naturalnie występujący kap ($m^7GpppA_{mp}G$), jednak jego uproszczona synteza sprawia, że związek (**9**) może być potencjalnie wykorzystywany jako narzędzie do badania metabolizmu mRNA i białek w zaangażowany w ten proces, a także w terapiach wykorzystujących technologię mRNA. Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących badania translacji mRNA zaprojektowałem dodatkowo, trzy nowe analogi kapu. Punktem wyjściowym do zaprojektowania nowych związków były analogi kapu $m^7Gppp\text{-CH}_2\text{-tr-A}_{mp}G$ (**4**) oraz $m^7Gppp\text{-tr-C}_2\text{H}_4\text{pA}_{mp}G$ (**9**) posiadające najlepsze właściwości biologiczne. Nowo zaprojektowane związki posiadały modyfikacje w obrębie mostka trifosforanowego, takie jak występują w związkach (**4**) i (**9**), z dodatkową grupą metylową lub benzyłową w pozycji N6 adenozyiny ($m^7Gppp\text{-CH}_2\text{-tr-}^{m6}A_{mp}G$ (**4a**), $m^7Gppp\text{-tr-C}_2\text{H}_4\text{p}^{m6}A_{mp}G$ (**9a**) oraz $m^7Gppp\text{-tr-C}_2\text{H}_4\text{p}^{Bn6}A_{mp}G$ (**9b**)). W celu otrzymania związków **4a**, **9a** oraz **9b** konieczna była synteza nowych dinukleotydów z terminalną grupą azydkową ($5'\text{-N}_3\text{-}^{m6}A_{mp}G$ (**12d**), $5'\text{-N}_3\text{-C}_2\text{H}_4\text{p}^{m6}A_{mp}G$ (**12e**) oraz $5'\text{-N}_3\text{-C}_2\text{H}_4\text{p}^{Bn6}A_{mp}G$ (**12f**)). Związki te zostały otrzymane przy użyciu syntezy na podłożu stałym. Finalnie, nowe analogi kapu, zostały otrzymane przy użyciu reakcji CuAAC, łącząc ze sobą odpowiednie podjednostki azydkowe (**12d-f**) z podjednostkami alkinowymi (**13** i **14**). Struktury nowych analogów kapu zostały potwierdzone za pomocą NMR. Związki **4a**, **9a** i **9b** zostały, za pomocą reakcji IVT, wbudowane do RNA kodującego lucyferazę *Gaussia* i wykorzystane w RRL do zbadania wydajności translacji, tak przygotowanego mRNA. Badania w RRL pokazały, że dodatkowa modyfikacja w pozycji N6 adenozyiny, nie zwiększa wydajności translacji mRNA w RRL, w porównaniu do wcześniej zbadanych związków **4** i **9**. Jednak, aby ostatecznie zbadać potencjał związków **4a**, **9a** i **9b** niezbędne są dodatkowe badania w żywych komórkach oraz *in vivo*.

IV Podsumowanie

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z dwóch części, których wspólnym mianownikiem było badanie białek zaangażowanych w metabolizm końca 5' mRNA przy użyciu modyfikowanych nukleotydów. Badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy dotyczyły dwóch ludzkich białek – białka cN-IIIB zaangażowanego w metabolizm produktów powstałych w wyniku degradacji kapu oraz białka eIF4E, odpowiedzialnego za inicjację translacji mRNA. Każda z części niniejszego projektu składała się z części syntetycznej w ramach, której zajmowałem się syntezą modyfikowanych nukleotydów oraz części biofizyczno-biochemicznej, w której modyfikowane nukleotydy były wykorzystywane do badań procesów, w które białka cN-IIIB i eIF4E są zaangażowane.

Pierwsza część badań zawartych w niniejszej rozprawie, dotyczyła tworzenia narzędzi molekularnych do badania enzymu cN-IIIB. Poniżej podsumuję najważniejsze osiągnięcia i wnioski związane z realizacją tych badań:

- Zebrałem bibliotekę „I-generacji” składającą się w sumie z 41 związków (9 naturalnie występujących nukleotydów oraz 32 modyfikowanych nukleotydów – pochodnych m⁷GMP). Zebraną bibliotekę wykorzystałem do badań przesiewowych (przy użyciu HPLC w odwróconych fazach) mających na celu poznanie ich właściwości substratowych i inhibitorowych względem enzymu cN-IIIB.
- Na podstawie wstępnych badań przesiewowych wytypowałem 3 związki wiodące, charakteryzujące się odpornością na degradację enzymatyczną przez enzym cN-IIIB oraz najsilniejszymi właściwościami inhibitorowymi względem tego enzymu. Były to związki m⁷G-triazolP (**S14**) (scharakteryzowany wcześniej, pierwszy inhibitor enzymu cN-IIIB), Bn⁷GMP (**S19**) oraz Bn⁷GDP (**S20**).
- Wytypowane związki na podstawie wstępnych badań poddałem dalszej analizie, wyznaczając dla nich parametr IC₅₀ przy użyciu analizy zieleni malachitowej. Spośród trzech wytypowanych związków, najniższą wartość parametru IC₅₀ posiadał związek Bn⁷GMP (**S19**, IC₅₀= 10.0 ± 1.0 μM), która była 10-krotnie niższa niż wartość otrzymana dla pierwszego znanego inhibitora enzymu cN-IIIB – m⁷G-triazolP (**S14**, IC₅₀= 101.8 ± 7.8 μM). Wartość parametru IC₅₀ dla związku Bn⁷GDP (**S20**) wyniosła 52.8 ± 5.7 μM.
- Na podstawie trzech struktur wiodących zaprojektowałem i zsyntezowałem 11 nowych związków (**S19**, **S19-1-3**, **S20**, **S20-1**, **S33-36** oraz **S36-1**), które posiadały modyfikację w obrębie zasady azotowej, rybozy lub reszcie fosforanowej. Struktury tych związków potwierdziłem przy użyciu technik spektroskopowych.

- Nowo otrzymane związki wykorzystałem do badań biofizycznych mających na celu wyznaczyć ich potencjał substratowy i inhibitorowy względem enzymu cN-IIIB. Do tego celu wykorzystałem analizę zieleni malachitową. Wszystkie z nowo otrzymanych związków były odporne na degradację enzymatyczną przez enzym cN-IIIB. Spośród badanych związków najsilniejszym inhibitorem enzymu cN-IIIB okazał się być związek 3Me-Bn⁷GMP (**S36**, $IC_{50} = 2.3 \pm 0.3 \mu M$), którego wartość IC_{50} była prawie 5-krotnie niższa niż dla najsilniejszego inhibitora z pierwszej biblioteki związków (Bn⁷GMP, **S19**, $IC_{50} = 10.0 \pm 1.0 \mu M$).
- Na podstawie zebranych wyników (metoda SAR) wytypowałem modyfikacje wpływające na zwiększenie aktywności związku względem enzymu cN-IIIB. Modyfikacją tą okazała się być grupa benzylowa w pozycji N7 guanozyny (związki 3Me-Bn⁷GMP oraz Bn⁷GMP). Na podstawie wyników uzyskanych metodą SAR zebrałem trzecią bibliotekę związków. Biblioteka ta składała się z ośmiu związków – pochodnych Bn⁷GMP. Nowe związki posiadały dodatkowe podstawniki metylowe (3Me-Bn⁷GMP (**S36**), 3Me-Bn⁷G-triazolP (**S36-1**, dodatkowa modyfikacja w obrębie reszty fosforanowej), 4Me-Bn⁷GMP(**S36-2**) oraz 3,5Me₂-Bn⁷GMP (**S36-3**)), fluorowe (3,4diF-Bn⁷GMP (**S37**), 2,4diF-Bn⁷GMP (**S37-1**) oraz 3,4,5triF-Bn⁷GMP (**S37-2**) lub trifluorometylowe (4-CF₃-Bn⁷GMP (**S38**) w obrębie pierścienia benzylowego. Związki te wykorzystałem do poznania właściwości substratowych i inhibitorowych enzymu cN-IIIB. Właściwości inhibitorowe tych związków zbadałem poprzez wyznaczenie dla nich parametru IC_{50} względem białka cN-IIIB. Najsilniejszymi inhibitorami enzymu cN-IIIB okazały się być związki 3Me-Bn⁷GMP (**S36**) oraz 3,4-diF-Bn⁷GMP (**S37**), których parametry IC_{50} wyniosły odpowiednio 2.3 ± 0.3 oraz $2.5 \pm 0.2 \mu M$. Otrzymane parametry IC_{50} były 50-krotnie niższe niż otrzymane dla pierwszego inhibitora enzymu cN-IIIB (m⁷G-triazolP, **S14**, $IC_{50} = 101.8 \pm 7.8 \mu M$). Pozostałe związki z tej biblioteki związków również wykazywały aktywność względem enzymu cN-IIIB. Otrzymane wartości parametru IC_{50} dla związków **S36-1**, **S36-2**, **S36-3**, **S37-1**, **S37-2** oraz **S38** wynosiły od $7.3 \pm 0.9 \mu M$ (dla **S38**) do $89 \pm 27 \mu M$ (dla **S36-1**). Wartości te były niższe niż te otrzymane dla pierwszego znanego inhibitora enzymu cN-IIIB (m⁷G-triazolP, **S14**, $IC_{50} = 101.8 \pm 7.8 \mu M$), co również czyni te związki dobrymi inhibitorami enzymu cN-IIIB. Wytypowane najsilniejsze inhibitory enzymu cN-IIIB zbadałem w kontekście ich selektywności względem enzymu cN-IIIA oraz białka eIF4E.
- Zbadałem selektywność siedmiu najsilniejszych wytypowanych inhibitorów (Bn⁷GMP (**S19**), 3Me-Bn⁷GMP (**S36**), 4Me-Bn⁷GMP(**S36-2**), 3,5Me₂-Bn⁷GMP (**S36-3**), 3,4diF-Bn⁷GMP (**S37**), 2,4diF-Bn⁷GMP (**S37-1**) oraz 4-CF₃-Bn⁷GMP (**S38**)) porównując wartości parametru IC_{50} wyznaczonego dla enzymu cN-IIIB z wartościami parametru IC_{50} otrzymanymi dla enzymu cN-IIIA. Uzyskane wartości parametru IC_{50} dla enzymu cN-IIIA pokazały, że związki (Bn⁷GMP, 3Me-Bn⁷GMP (**S36**), 4Me-Bn⁷GMP(**S36-2**), 3,5Me₂-

- Bn⁷GMP (**S36-3**), 3,4diF-Bn⁷GMP (**S37**), 2,4diF-Bn⁷GMP (**S37-1**) oraz 4-CF₃-Bn⁷GMP (**S38**) wykazują niską aktywność względem enzymu cN-IIIA. Wartości parametru IC₅₀ (cN-IIIA) dla najsilniejszych inhibitorów enzymu cN-IIIB wynosiły Bn⁷GMP (**S19**, IC₅₀(cN-IIIA)= 113.4 ±38.5 μM), 3Me-Bn⁷GMP (**S36**, IC₅₀(cN-IIIA)= 126.8 ±35.6 μM), 3,4diF-Bn⁷GMP (**S37**, IC₅₀(cN-IIIA)= 105.8 ±26.6 μM) oraz 4-CF₃-Bn⁷GMP (**S38**, IC₅₀(cN-IIIA)= 42.5 ±8.3 μM). Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczyłem parametr SI (Selectivity Index), który jest definiowany jako iloraz wartości parametru IC₅₀ (cN-IIIB) i wartości parametru IC₅₀ (cN-IIIA). Wartości SI wyniosły kolejno 0.09 dla Bn⁷GMP, 0.02 dla 3Me-Bn⁷GMP i 3,4diF-Bn⁷GMP oraz 0.17 dla 4-CF₃-Bn⁷GMP. Wartości SI równe 0.02 świadczą o wysokiej selektywności związków (**S36** i **S37**) względem enzymu cN-IIIB.
- Dla związków (Bn⁷GMP (**S19**), 3Me-Bn⁷GMP (**S36**), 3,4diF-Bn⁷GMP (**S37**) oraz 4-CF₃-Bn⁷GMP (**S38**) zbadałem selektywność w kontekście białka eIF4E wyznaczając parametr EC₅₀ przy użyciu sondy fluorescencyjnej typu „Turn-on; Turn-off”. Wartości EC₅₀ dla tych związków wyniosły 15.8 ± 2.8 μM (**S19**, SI_{cNIIIB/eIF4E}= 0.62), 22.6 ± 4.3 μM (**S36**, SI_{cNIIIB/eIF4E} = 0.10), 39.9 ± 8.5 μM (**S37**, SI_{cNIIIB/eIF4E}= 0.06) oraz 117.5 ± 66.4 μM (**S38**, SI_{cNIIIB/eIF4E}=0.06). Otrzymane wartości były co najmniej 2-krotnie wyższe niż te uzyskane dla m⁷GMP (8.4 ± 1.7 μM), będącego słabym inhibitorem białka eIF4E. Ogólnie wyniki te potwierdzają wysoką selektywność badanych inhibitorów względem białka cN-IIIB.
 - Uwzględniając parametry takie jak IC₅₀ (cN-IIIB) oraz selektywność inhibitorów enzymu cN-IIIB (SI) względem enzymu cN-IIIA oraz białka eIF4E, najlepszym niekowalencyjnym inhibitorem enzymu cN-IIIB okazał się być związek 3,4-diF-Bn⁷GMP (**S37**). Związek ten został wykorzystany do dalszych badań biologicznych i biochemicznych, które przybliżyły mechanizm działania enzymu cN-IIIB.
 - Związek 3,4-diF-Bn⁷GMP (**S37**) wykorzystano do otrzymania, po raz pierwszy, struktury krystalograficznej ludzkiego enzymu cN-IIIB wraz z ligandem. Struktura krystalograficzna ludzkiego enzymu cN-IIIB oraz przeprowadzone badania obliczeniowe – dokowanie – wyjaśniły sposób wiązania benzylovych analogów m⁷GMP oraz mechanizm inhibicji enzymu cN-IIIB przez te związki. Mechanizm inhibicji enzymu cN-IIIB przez benzylovne pochodne m⁷GMP polega na zablokowaniu enzymu w konformacji otwartej uniemożliwiając przebieg reakcji enzymatycznej.
 - Znalezione przeze mnie inhibitory enzymu cN-IIIB wykorzystano w eksperymentach z użyciem spektrometrii mas, które pokazały, że enzym cN-IIIB jest odpowiedzialny za degradację m⁷GMP w lizatach komórek HEK 293T. Otrzymane narzędzie (inhibitory enzymu cN-IIIB) mogą posłużyć do monitorowania aktywności enzymu cN-IIIB w innych liniach komórkowych lub tkankach, gdzie aktywność tego enzymu może być różna.

- Opracowałem ścieżki syntezy chemicznej, która pozwoliła otrzymać najsilniejsze niekowalencyjne inhibitory enzymu cN-IIIB w postaci pronukleotydów, mogących przenikać przez błonę komórkową. Otrzymane pronukleotydowe inhibitory enzymu cN-IIIB mogą w przyszłości umożliwić badanie aktywności enzymu cN-IIIB w komórkach lub *in vivo*. Potencjalne działanie chemosensytyzujące tych związków względem komórek nowotworowych może być również istotne w kontekście rozwijania nowych terapii.
- Scharakteryzowałem zestaw pochodnych Bn⁷GMP zawierających grupy funkcyjne ulegające reakcjom typu SuFEX (grupa SO₂F i SO₃F) w pozycjach *meta* oraz *para* pierścienia benzyłowego i zidentyfikowałem kowalencyjny inhibitor (pSO₂FBn⁷GMP) enzymu cN-IIIB. Tworzenie kowalencyjnego połączenia z białkiem potwierdziłem poprzez badania funkcjonalne oraz metodą spektrometrii mas. Związek ten, należący do grupy tzw. *suicide inhibitors*, hamował aktywność cN-IIIB już w stężeniach nanomolarnych (IC₅₀ = 67 nM) i jest on pierwszym odkrytym inhibitorem nukleotydaz tego typu.

Druga część mojej rozprawy doktorskiej dotyczyła optymalizacji syntezy trinukleotydowych analogów kapu, które wykorzystałem jako narzędzia do badania białka eIF4E, będącego jednym z czynników inicjujących translację mRNA. Najważniejsze osiągnięcia tej części projektu zostały wymienione poniżej.

- Opracowałem nową ścieżkę syntezy tri- oraz tetranukleotydowych analogów kapu. Do syntezy nowych analogów kapu wykorzystałem reakcję CuAAC, dzięki której znacząco skróciłem czas ostatniego etapu syntezy tego typu związków (z 48 h do maksymalnie 1 h).
- Opracowałem syntezę modyfikowanych dinukleotydów posiadających terminalną grupę azydkową przy użyciu syntezy na podłożu stałym. W pierwszej części badań otrzymałem trzy, modyfikowane ugrupowaniem azydkowym, dinukleotydy (5'-N₃ApG, 5'-N₃A_mpG oraz N₃-C₂H₄pA_mpG).
- Dinukleotydy z ugrupowaniem azydkowym (5'-N₃ApG, 5'-N₃A_mpG oraz N₃-C₂H₄pA_mpG) wykorzystałem do syntezy 9 trinukleotydowych analogów kapu z modyfikacjami w obrębie mostka polifosforanowego (m⁷Gppp-tr-ApG (**1**), m⁷Gppp-tr-A_mpG (**2**), m⁷Gppp-CH₂-tr-ApG (**3**), m⁷Gppp-CH₂-tr-A_mpG (**4**), m⁷Gppp-C₂H₄-tr-ApG (**5**), m⁷Gppp-C₂H₄-tr-A_mpG (**6**), m⁷Gppp-OCH₂-tr-ApG (**7**), m⁷Gppp-OCH₂-tr-A_mpG (**8**) oraz m⁷Gppp-tr-C₂H₄-pA_mpG (**9**)).
- Związek 5'-N₃ApG wykorzystałem do syntezy dwóch tetranukleotydowych analogów kapu posiadających modyfikację w obrębie pierwszego wiązania fosfodiesterowego: m⁷GpppG-2'O-karb-CH₂-tr-ApG (**10a**) oraz m⁷GpppG-3'O-karb-CH₂-tr-ApG (**10b**).

- Zsyntezowałem dinukleotydowy analog kapu $m^7GpppA_m-3'OC_3H_3$ z ugrupowaniem alkilowym w pozycji 3' rybozy, który wykorzystałem do syntezy trinukleotydowego analogu kapu z modyfikacją triazolową w obrębie wiązania fosfodiesterowego ($m^7GpppA_m-3'OCH_2-tr-A_m pG$ (**11**)).
- Struktury wszystkich związków potwierdziłem za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektrometrii mas.
- W pierwszej części tego projektu syntezowałem łącznie 12 nowych analogów kapu
- Dla otrzymanych 12 analogów kapu zbadano procent kapingu (wydajność ko-transkrypcyjnego wbudowywania analogów kapu do RNA). Najwyższą wydajnością kapingu charakteryzował się związek $m^7Gppp-tr-A_m pG$ (**2**) (75%), podczas gdy wydajność kapingu dla niemodyfikowanego analogu kapu (kap1) wynosiła 88%. Wysoką wartością kapingu otrzymano również dla związku $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**) (69%).
- Otrzymane mRNA, zakończone różnymi analogami kapu, zostało wykorzystane do badania translacji RNA w lizacie z komórek (retikulocytów króliczych, RRL).
- Badania w RRL pokazały, że mRNA zakończone związkami $m^7Gppp-CH_2-tr-A_m pG$ (**4**) oraz $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**) ulega translacji równie wydajnie jak mRNA zakończone naturalnie występującym kapem (kap0 i kap1), przy czym synteza tych analogów kapu jest znacząco krótsza.
- mRNA zakończone triazolowymi analogami kapu zostało wykorzystane do badań translacji mRNA w komórkach dendrytycznych JAWS II.
- Badania komórkowe pokazały, że najlepszymi właściwościami translacyjnymi charakteryzuje się mRNA zakończone analogiem kapu $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**). Wydajność translacji tego mRNA było porównywalne z mRNA zakończone naturalnym kapem (kap1). mRNA zakończone pozostałymi analogami kapu nie ulegało wydajnie translacji w badanym układzie.
- Zbadałem powinowactwo związków $m^7Gppp-tr-A_m pG$ (**2**), $m^7Gppp-CH_2-tr-A_m pG$ (**4**), $m^7Gppp-C_2H_4-tr-A_m pG$ (**6**), $m^7Gppp-OCH_2-tr-A_m pG$ (**8**), $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**), $m^7GpppG-3'O-karb-CH_2-tr-A_pG$ (**10b**) oraz $m^7GpppA_m-3'OCH_2-tr-A_m pG$ (**11**) do białka eIF4E poprzez wyznaczenie stałe dysocjacji K_D (eIF4E) za pomocą metody spektroskopowej (FQT). Otrzymane K_D (eIF4E) dla badanych związków porównałem ze K_D (eIF4E) otrzymaną dla niemodyfikowanego kapu (kap1). Najniższą K_D (eIF4E), czyli największe powinowactwo do białka eIF4E, posiadał związek (**9**), którego K_D (eIF4E) wyniosło 7.35 ± 0.20 nM. Wartość K_D (eIF4E) uzyskana dla związku (**9**) była 4-krotnie niższa niż wartość K_D (eIF4E) otrzymana dla niemodyfikowanego kapu (kap1, 29.6 ± 2.3 nM). Wartości K_D (eIF4E) otrzymane dla pozostałych analogów kapu były porównywalne lub nieco wyższe niż dla niemodyfikowanego kapu (kap1, 29.6 ± 2.3 nM). Wyjątkiem był

analog kapu $m^7GpppA_m-3'OCH_2-tr-A_m pG$ (**11**), którego stała dysocjacji wyniosła 194 ± 35.3 nM.

- Związek $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**), posiadający najlepsze właściwości biologiczne (wydajny kaping oraz translacja mRNA), posłużył mi jako wzorzec do syntezy nowych analogów kapu posiadających dodatkową modyfikację w obrębie zasady azotowej pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Zaproponowanymi przeze mnie związkami był związek $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{m6}A_m pG$ posiadający metylację w pozycji N6 adenozyiny oraz $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{Bn6}A_m pG$ posiadający grupę benzyłową w pozycji N6 adenozyiny. Dodatkowym związkiem był analog związku $m^7Gppp-CH_2-tr-A_m pG$ (**4**) – związek $m^7Gppp-CH_2-tr-^{m6}A_m pG$.
- W celu syntezy związków $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{m6}A_m pG$, $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{Bn6}A_m pG$ oraz $m^7Gppp-CH_2-tr-^{m6}A_m pG$, w pierwszej kolejności zsyntezowałem za pomocą syntezy na podłożu stały 3 nowe dinukleotydy: $5'-N_3-C_2H_4-p^{m6}A_m pG$, $5'-N_3-C_2H_4-p^{Bn6}A_m pG$ oraz $5'-N_3-^{m6}A_m pG$, których struktury potwierdziłem za pomocą NMR oraz spektrometrii mas.
- Dinukleotydy: $5'-N_3-C_2H_4-p^{m6}A_m pG$, $5'-N_3-C_2H_4-p^{Bn6}A_m pG$ oraz $5'-N_3-^{m6}A_m pG$ wykorzystałem do syntezy, przy użyciu reakcji CuAAC, trzech nowych analogów kapu $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{m6}A_m pG$, $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{Bn6}A_m pG$ oraz $m^7Gppp-CH_2-tr-^{m6}A_m pG$. Struktury tych związków potwierdziłem za pomocą NMR oraz spektrometrii mas.
- Nowo otrzymane związki wbudowałem ko-transkrypcyjnie od mRNA kodującego lucyferazę *Gaussia* i wykorzystałem do badania translacji w RRL.
- Otrzymane mRNA zakończone nowymi analogami kapu $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{m6}A_m pG$, $m^7Gppp-tr-C_2H_4-p^{Bn6}A_m pG$ oraz $m^7Gppp-CH_2-tr-^{m6}A_m pG$, w testowanych warunkach, ulegało translacji 2.5-krotnie mniej wydajnie niż mRNA zakończone związkami $m^7Gppp-CH_2-tr-A_m pG$ (**4**) oraz $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**).
- Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowałem związek $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**) jako najlepszy mimetyk naturalnie występującego kapu (kap1). Dzięki dostępności syntetycznej opartej na chemii „click”, związek $m^7Gppp-tr-C_2H_4-pA_m pG$ (**9**) może mieć potencjalne zastosowanie w terapiach wykorzystujących mRNA w tym terapiach przeciwnowotworowych. Struktura tego związku może również być pomocna w opracowywaniu metod chemicznego, post-transkrypcyjnego kapingu mRNA.

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej stały się przedmiotem dwóch publikacji, których to jestem pierwszym współautorem:

- *Substrate-Based Design of Cytosolic Nucleotidase IIIB Inhibitors and Structural Insights into Inhibition Mechanism*; Dorota Kubacka§, Mateusz Kozarski§, Marek R. Baranowski,

Radosław Wójcik, Joanna Panecka-Hofman, Dominika Strzelecka, Jerome Basquin, Jacek Jemielity, Joanna Kowalska; *Pharmaceuticals* **2022**, 15(5), 554

- Towards superior mRNA caps accessible by click chemistry: synthesis and translational properties of triazole-bearing oligonucleotide cap analogs; Mateusz Kozarski, Karolina Drazkowska, Marcelina Bednarczyk, Marcin Warminski, Jacek Jemielity and Joanna Kowalska; *RSC Advances* **2023**, 13, 12809-1282

oraz

- M. Chrominski, M. Kozarski i wsp. Proximity-induced SuFEx increases the potency of substrate-derived inhibitors of cytosolic nucleotidase IIIB - w przygotowaniu

V Część eksperymentalna

V.1 Informacje ogólne

Wszystkie rozpuszczalniki oraz odczynniki chemiczne i biologiczne zostały zakupione ze źródeł komercyjnych i zostały użyte bez dodatkowego oczyszczania. Rozpuszczalniki zakupiono z firm POCh oraz Merck. Rozpuszczalniki takie jak DMF, DMSO oraz acetonitryl wysuszono nad sitami molekularnymi 4Å. Guanozyna została zakupiona od firmy Carbosynth. Podstawione bromki benzylu zostały zakupione od firmy Merck (Sigma-Aldrich). Podłoże polistyrenowe [Primer Support™ 5G ribo G 300 (309 µmol ribo G/g)] do syntezy na podłożu stałym zakupiono od firmy GE Healthcare. Amidofosforyny wykorzystywane do syntezy na podłożu stałym zostały zakupione od firmy ChemGenes. C-fosfonianowe analogi nukleotydów otrzymano zgodnie z wcześniej opisanymi procedurami (Walczak i wsp.)^{81, 114, 176}. Amidofosforyn **17** zsyntetyzowano na podstawie wcześniej opublikowanego protokołu w pracy Hebert i wsp.¹⁷⁵. Benzylowe analogi m⁷GMP (**S36**, **S36-2**, **S36-3**, **S37**, **S37-1**, **S37-2**, **S**), zbadane pod kątem inhibicji enzymu cN-IIIB, zostały zsyntezowane przez dr Marka Baranowskiego oraz Radosława Wójcika. Synteza tych związków została opisana w pracy Wójcik R. & Baranowski M. i wsp.¹⁹⁹ oraz Kubacka D. & Kozarski M i wsp.¹⁶⁶ Sufexowe analogi m⁷GMP wykorzystane do badań nad enzymem cN-IIIB ([rozdział III.9](#)) zostały zsyntezowane przez dr. Mikołaja Chromińskiego w Laboratorium Chemii Biologicznej w CeNT UW. Badanie kapingu oraz badania przeprowadzone na żywych komórkach JAWS II ([rozdział III.12.5](#)) zostały wykonane przez dr Karolinę Drażkowską w Laboratorium Chemii Biologicznej w CeNT UW. Podatność triazolowych kapów na degradację przez kompleks enzymów Dcp1/Dcp2 ([rozdział III.12.6](#)) została zbadana przez mgr Marcelinę Bednarczyk w Laboratorium Chemii Biologicznej w CeNT UW.

V.2 Techniki chromatograficzne

V.2.1 Chromatografia kolumnowa ze złożem jonowymiennym

Chromatografię kolumnową ze złożem jonowymiennym wykorzystywano do wstępnego oczyszczania otrzymanych związków chemicznych. Stosowanym złożem było anionitowe złożo DEAE-Sephadex A-25, w formie HCO₃⁻. Oczyszczanie związków prowadzono w liniowym gradiencie buforu TEAB w wodzie. W zależności od ładunku związku oraz wielkości kolumny, końcowe stężenie buforu TEAB wynosiło 0.2-0.6 M. O Zebrane frakcje badano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorpcji, w kwarcowej kuwecie (1 x 1 cm) przy długości fali 260 nm za pomocą spektrometru UV 1800 Shimadzu. Frakcje zawierające oczekiwany produkt łączono, a następnie odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem za

pomocą wyparki wolnoobrotowej. W celu rozłożenia buforu TEAB, do zatężonych frakcji dodawano kilkakrotnie porcje 96% oraz 99% etanolu. Otrzymane w ten sposób związki, w postaci soli TEA poddawano dalszym reakcjom lub w przypadku związków końcowych, dodatkowemu oczyszczaniu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

V.2.2 Chromatografia kolumnowa ze złożem krzemionkowym

Do chromatografii ze złożem krzemionkowym wykorzystywałem aparat Reveleris X2 Flash Chromatography System (BUCHI) z detekcją UV przy długości fali 254 nm. Ilość złoża krzemionkowego była dostosowywana w zależności od skali reakcji.

V.2.3 Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) analityczna i półpreparatywna

Wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) wykorzystywano do monitorowania przebiegu reakcji chemicznych oraz jako drugiego etapu oczyszczania końcowych związków chemicznych. W badaniach wykorzystywano dwa aparaty HPLC: Agilent Technologies Series 1200 oraz Shimadzu RF-20A w układzie faz odwróconych (*ang. reverse phase, RP*) z detekcją UV przy długości fali 254 nm z dodatkowym detektorem fluorescencyjnym (detekcja fluorescencji – wzbudzenie 260 nm; emisja 370 nm). Do monitorowania reakcji chemicznych wykorzystywano kolumny analityczne Gemini 3 μm NX-C18 110 Å 150 x 4.6 mm z liniowym gradientem metanolu w 0.05 M buforze amonowym, pH 5.9. Do oczyszczania końcowych związków używano kolumn półpreparatywnych Gemini 5 μm NX-C18 110 Å 150 x 10 mm (kolumna A) lub HiChrom Vydac Denali 5 μm C18 120 Å 150 x 10 mm (kolumna B) lub Dr. Maisch VisionHT C18 Highload 25 cm x 2 cm, 10 μm (kolumna C) z liniowym gradientem acetonitrylu w 0.05 M buforze amonowym, pH 5.9.

V.2.3.1 Metody RP HPLC stosowane podczas monitorowania przebiegu reakcji chemicznych oraz oczyszczania związków.

W zależności od polarności badanego związku stosowano różne metody rozdzielania na RP HPLC. Stosowane metody analityczne oraz półpreparatywne zostały przedstawione poniżej (Tabela 10).

Tabela 10. Metody analityczne oraz półpreparatywne stosowane podczas rozdzielania za pomocą RP HPLC

Metody analityczne			
Metoda	Bufor A	Bufor B	Gradient
A	0.05 M octan amonu, pH 5.9	Bufor A/MeOH (v/v, 1/1)	Gradient liniowy 0%- 50% buforu B; 15 min; 1ml/min
B	0.05 M octan amonu, pH 5.9	Bufor A/MeOH (v/v, 1/1)	Gradient liniowy 0%- 100% buforu B; 15 min; 1ml/min

C	0.05 M octan amonu, pH 5.9	Bufor A/MeOH (v/v, 1/1)	Gradient liniowy 0%- 50% buforu B; 7.5 min; 1ml/min
D	0.05 M octan amonu, pH 5.9	Acetonitryl	Gradient liniowy 0%- 100% buforu B; 15 min; 1ml/min
Metoda półpreparatywna			
D	0.05 M octan amonu, pH 5.9	Bufor A/acetonitryl (v/v, 7/3)	Gradient liniowy 0%- 50% buforu B; 60 min; 4.7 ml/min

V.3 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometria mas (MS) i wysokorozdzielcza spektrometria mas (HRMS)

V.3.1 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang. Nuclear Magnetic Resonance, NMR*)

Struktury zsyntezowanych związków oraz ich czystość sprawdzono za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego. Jednowymiarowe widma ^1H oraz ^{31}P zarejestrowano za pomocą spektrometru Bruker AVANCE III HD 500 MHz z sondą 5 mm PAB- BOBB/ ^{19}F - $^1\text{H/D}$ Z-GRD Z119470/0188 przy 500.24 MHz (^1H NMR), 202.49 MHz (^{31}P NMR) lub Varian 400 MHz z sondą OneNMR_W016 przy częstotliwości 399,90 MHz (^1H NMR) i 161,89 MHz (^{31}P NMR) w temperaturze 25.2 °C. Próbkę do analizy za pomocą NMR przygotowano poprzez rozpuszczenie analizowanych związków w deuterowanych rozpuszczalnikach: D_2O , d^6 -DMSO, d^4 - CH_3OH lub CDCl_3 . Na zarejestrowanych widmach NMR, przesunięcia chemiczne przedstawiono w ppm (*ang. parts per milion*) stosując jako wzorce: TSP (2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetylosililo)-propionian sodu) (^1H NMR) (wzorzec wewnętrzny) oraz 20% kwas fosforowy w D_2O (^{31}P NMR) (wzorzec zewnętrzny), a stałe sprzężenia w Hz (Hertz).

V.3.2 Spektrometria mas (MS) i wysokorozdzielcza spektrometria mas (HR MS)

W celu szybkiej analizy otrzymanych związków przeprowadzono pomiary ich masy za pomocą spektrometru masowego firmy ABSciex API 3200 z jonizacją typu elektrosprej (ESI). Analizę próbek przeprowadzono trybie jonów ujemnych (MS -) lub dodatnich (MS +).

Dodatkową weryfikacją struktur otrzymanych związków były pomiary mas za pomocą wysokorozdzielczego spektrometru masowego Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos z ujemną lub dodatnią jonizacją typu elektrosprej (ESI). Pomiary HR MS zostały wykonane przez Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN .

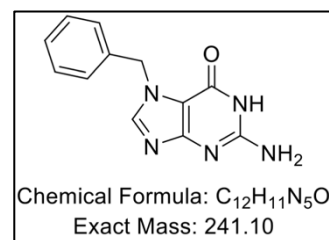
V.4 Syntezy chemiczne

V.4.1 Benzyłowe analogi guaniny – procedura ogólna (A)

Guanozynę (Carbosynth) (1 ekw., 400 mg/ml) zawieszono w bezwodnym DMSO. Otrzymaną zawiesinę intensywnie mieszano przez 20 min w temperaturze pokojowej, po czym dodawano odpowiedni bromek benzyłu (bromek benzyłu, bromek 3-metylobenzyłu lub bromek 3,4-difluorobenzyłu) (1.1 ekw.) i kontynuowano mieszanie przez 24 h. Po 24 h, mieszaninę reakcyjną podgrzewano do 70 °C, a następnie dodawano 10% wodny roztwór HCl (227 mg/ml, 1.6 ml / 1 ml mieszaniny reakcyjnej) i pozostawiono ją na 2 h, mieszając. Po 2 h, mieszaninę reakcyjną schłodzono. Powstały, podczas reakcji, osad przefiltrowano na lejku Schotta. Otrzymany osad przemywano kilkakrotnie zimną wodą i zawieszano w wodzie. Powstałą zawiesinę zobojętniono 6 M NaOH. Osad ponownie przefiltrowywano, przemywano zimną wodą i wysuszono w eksykatorze nad P₂O₅. Końcowe związki zostały wykorzystane od badań bez dodatkowego oczyszczania.

V.4.1.1 Synteza 7-Benzyloguaniny (S19')

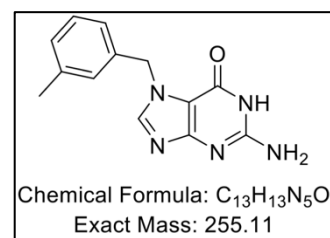
7-Benzyloguaninę otrzymano według ogólnej procedury (A), zawieszając guanozynę (283 mg, 1 mmol, 1 ekw.) w 0.75 ml bezwodnego DMSO, po czym dodając bromek benzyłu (188.1 mg, 1.1 mmol, 1.1 ekw.). 7-Benzyloguanozynę (38.3 mg, 0.16 mmol) otrzymano z wydajnością 16%.



¹H NMR δ_H (399.90 MHz; DMSO-*d*₆; TSP) 10.71 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, C8), 7.36–7.26 (m, 4H, aromatyczne), 6.12 (s, 2H, NH₂), 5.41 (s, 2H, CH₂).

V.4.1.2 Synteza 7-(3-Metylobenzylo)guaniny (S36')

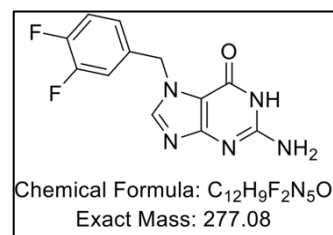
7-(3-Metylobenzylo)guaninę otrzymano według ogólnej procedury (A), zawieszając guanozynę (283 mg, 1 mmol, 1 ekw.) w 0.75 ml bezwodnego DMSO, po czym dodając bromek 3-metylobenzyłu (203.5 mg, 1.1 mmol, 1.1 ekw.). 7-(3-Metylobenzylo)guaninę (53 mg, 0.21 mmol) otrzymano z wydajnością 21%.



¹H NMR δ_H (399.90 MHz; DMSO-*d*₆; TSP) 10.70 (s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, C8), 7.26–7.06 (m, 4H, aromatyczne), 6.11 (s, 2H, NH₂), 5.37 (s, 2H, CH₂), 2.26 (s, 3H, CH₃).

V.4.1.3 Synteza 7-(3,4-Difluorobenzyl)guaniny (**S37'**)

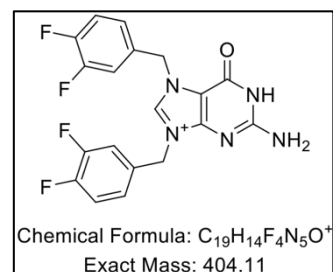
7-(3,4-Difluorobenzyl)guaninę otrzymano według ogólnej procedury (A), zawieszając guanozynę (283 mg, 1 mmol, 1 ekw.) w 0.75 ml bezwodnym DMSO, po czym dodając bromek 3-metylobenzylu (261.8 mg, 1.1 mmol, 1.1 ekw.). 7-(3,4-Difluorobenzyl)guaninę (98.7 mg, 0.36 mmol) otrzymano z wydajnością 36%.



1H NMR δ_H (399.90 MHz; DMSO- d_6 ; TSP) 10.76 (s, 1H, NH), 8.09 (s, 1H, C8), 7.49–7.17 (m, 3H, aromatyczne), 6.15 (s, 2H, NH₂), 5.38 (s, 2H, CH₂); ^{19}F NMR δ_F (376.25 MHz; DMSO- d_6) –138.22–(–138.34) (m, 1F), –139.88–(–140.00) (m, 1F)

V.4.1.4 Synteza N7,9-bis-(3,4-Difluorobenzyl) guaniny (**S37''**)

Guaninę (50 mg, 0.33 mmol, 1 ekw.) zawieszono w bezwodnym DMSO (0.2 ml). Do otrzymanej zawiesiny dodano bromek 3,4-difluorobenzylu (471 mg, 1.98 mmol, 6 ekw.). Powstałą mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 h w 50 °C. W wyniku reakcji otrzymano trzy produkty – N7, N9 oraz N7,9-bis podstawioną guaninę, gdzie głównym produktem była N7,9-bis-(3,4-Difluorobenzyl)guanina. Po 24 h, otrzymane produkty wytrącono z mieszaniny reakcyjnej dodając do niej 1 ml zimnej wody. Powstały osad przefiltrowano i przemyto 3-krotnie eterem dietylowym. Otrzymaną mieszaninę izomerów rozpuszczono w 2% roztworze MeOH w DCM i oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej ze złożem krzemionkowym. Elucję prowadzono w liniowym gradiencie MeOH w DCM (od 2 do 20% MeOH). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem za pomocą wyparki wolnoobrotowej otrzymując związek (**S37''**) (10.1 mg, 0.025 mmol) z wydajnością 7.6%.



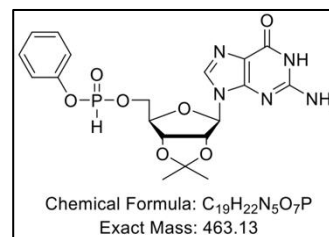
1H NMR δ_H (399.90 MHz; DMSO- d_6 ; TSP) 9.48 (s, 1H, C8), 7.64–7.27 (m, 7H, aromatyczne), 5.58 (s, 2H, CH₂), 5.35 (s, 2H, CH₂); ^{19}F NMR δ_F (376.25 MHz; DMSO- d_6) –137.77–(–138.00) (m, 2F), –138.65–(–138.77) (m, 1F), and –138.88–(–139.00) (m, 1F).

V.4.2 Synteza 5'-amidofosforanu N7-3,4-Difluorobenzylloguanozyny – 3,4diFBn⁷GMP(OPh)-Ala-Bn

Synteza 5'-amidofosforanu N7-3,4-difluorobenzylloguanozyny – 3,4diFBn⁷GMP(OPh)-Ala-Bn była czteroetapową syntezą składającą się z: H-fosfonylacji, utleniania, odbezpieczania oraz N7 alkilacji ([Rysunek 83](#), [Rozdział III.8.1](#)).

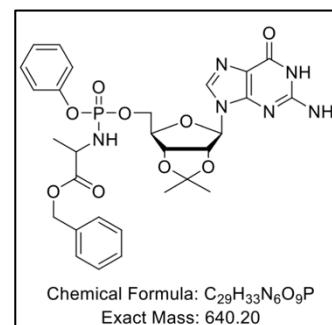
V.4.2.1 Synteza 5'-O-Ph-H-fosfonianu 2',3'-izopropylidenoguanozyny (40)

2',3'-izopropylidenoguanozynę (200 mg, 0.62 mmol, 1 ekw.) umieszczono w okrągłodennej kolbie, którą następnie podłączono do pompy olejowej. 2',3'-izopropylidenoguanozynę suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 30 min, po czym, kolbę zamknięto gumowym septum i podłączono balon z argonem. Za pomocą strzykawki, do kolby dodano bezwodną pirydynę (700 µl). Otrzymaną zawiesinę schłodzono w łaźni lodowej do 0 °C. Po schłodzeniu do mieszaniny reakcyjnej dodano, za pomocą strzykawki, fosfonian difenyłu (464 mg, 1.86 mmol, 3 ekw. 980 µl). Reakcję prowadzono przez 3 h w łaźni lodowej. Po 3 h z mieszaniny reakcyjnej usunięto pirydynę poprzez odparowanie jej pod zmniejszonym ciśnieniem za pomocą wyparki wolnoobrotowej. Resztek pirydyny pozbywano się na drodze kilkukrotnej destylacji azeotropowej z niewielkimi porcjami bezwodnego toluenu z pomocą wyparki wolnoobrotowej. Po odparowaniu pirydyny otrzymany związek (40) bezpośrednio poddano dalszym reakcjom. HRMS (ESI +) obliczone dla $[C_{19}H_{23}N_5O_7P]^+$ 464.1330 m/z; znalezione 464.13361



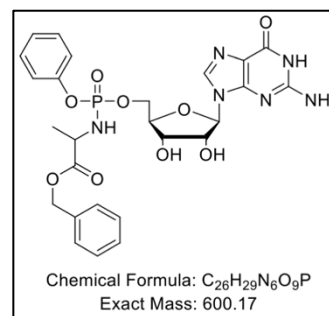
V.4.2.2 Synteza 5'-O-Ph-Ala-amidofosforynu 2',3'-izopropylidenoguanozyny (41)

5'-O-Ph-H-fosfonian 2',3'-izopropylidenoguanozyny (40) poddano reakcji utleniania. W tym celu, kolbę z 5'-O-Ph-H-fosfonianem 2',3'-izopropylidenoguanozyny (200 mg, 0.62 mmol, 1 ekw.) zamknięto szczelnie gumowym septum i podłączono balon z argonem. Do kolby dodano, za pomocą strzykawki, bezwodny acetonitryl (3.2 ml). Następnie dodano benzylowy ester L-alaniny w postaci soli *p*-toluenosulfonowej (185 mg, 0.86 mmol, 1.4 ekw.) oraz bezwodną trietyloaminę (261 mg, 2.6 mmol, 6 ekw., 360 µl). Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni lodowej i schłodzono do 0 °C, po czym dodano tetrachlorek węgla – CCl_4 (400 µl). Reakcję utleniania prowadzono przez 30 min. Po 30 min, mieszaninę reakcyjną dwukrotnie rozcieńczano wodą, a następnie poddano ją ekstrakcji w obecności octanu etylu. Związek (41) znajdował się w warstwie organicznej, którą odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Związek (41) przed kolejnym etapem syntezy oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej ze złożem krzemionkowym za pomocą Reveleris X2 Flash Chromatography System (BUCHI). Elucję prowadzono w liniowym gradiencie MeOH w DCM (0-10% MeOH). Frakcję, w których znajdował się syntezowany związek połączono i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Po potwierdzeniu masy związku za pomocą spektrometrii mas (MS ESI) związek w całości wykorzystano do dalszych syntez.



V.4.2.3 Synteza 5'-O-Ph-Ala-amidofosforynu guanozyny (42)

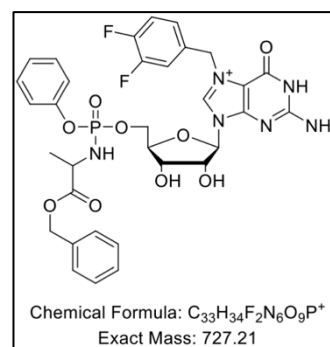
Oczyszczony związek 5'-O-Ph-Ala-amidofosforyn 2',3'-izopropylidenoguanozyny poddano reakcji zabezpieczania (usunięcie grupy 2',3'-izopropylidenu). W tym celu, 5'-O-Ph-amidofosforyn 2',3'-izopropylidenoguanozyny rozpuszczono w mieszaninie TFA : H₂O (v/v, 8/2, 1 ml) i intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej. Po 1 h, mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany



związek (42) oczyszczono za pomocą kolumny ze złożem RP C18. Elucję związku prowadzono w liniowym gradiencie ACN w 0.05 M buforze amonowym, pH 5.9 (5-100% ACN w 80 min). Po oczyszczaniu, do połączonych frakcji zawierających produkt dodano porcję 0.6 M buforu TEAB i całość odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Po usunięciu rozpuszczalników, otrzymany produkt wysuszono na pompie membranowej, otrzymując 142 mg, 0.2 mmol. Wydajność po trzech etapach syntezy wyniosła 30%. Po potwierdzeniu masy związku za pomocą spektrometrii mas (MS ESI) związek w całości wykorzystano do dalszych syntez. HRMS (ESI +) obliczone dla [C₂₆H₃₀N₆O₉P⁺] 601.18060 m/z; znalezione 601.18186

V.4.2.4 Synteza 5'-O-Ph-Ala-amidofosforynu N7-(3,4-Difluorobenzyl)guanozyny (ProTide S37)

5'-O-Ph-Ala-amidofosforyn guanozyny (42) (142 mg, 0.2 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w bezwodnym DMSO (2 ml). Następnie dodano bromek 3,4-difluorobenzylu (124.2 mg, 0.6 mmol, 3 ekw., 76 µl). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 18 h w temperaturze pokojowej, do czasu całkowitej konwersji substratu w produkt, co monitorowano za pomocą RP HPLC z kolumną C18 (Gradient D, [Tabela 10](#)). Po 18 h reakcji, mieszaninę reakcyjną rozcieńczono



metanolem i bezpośrednio oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej ze złożem RP C18. Elucję związku prowadzono w liniowym gradiencie ACN w 0.05 M buforze amonowym, pH 5.9 (5-100% ACN w 80 min). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Ostatecznie, uzyskano 73 mg, 0.1 mmol. Wydajność ostatniego etapu wyniosła 50%. Całkowita wydajność otrzymywania pronukleotydu (4 etapy) wyniosła 16%.

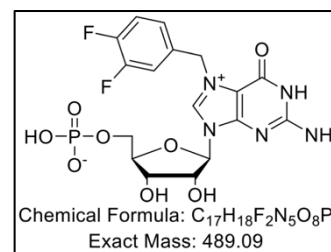
¹H NMR δ_H (500.24 Hz, CD₃OD) 7.54-7.46 (2H, m, aromatyczne, oba izomery); 7.36- 7.12 (24H, m, aromatyczne, oba izomery); 5.98 (1H, d, J= 3.7, H1', izomer 1); 5.94 (1H, d, J= 3.6, H1', izomer 2); 5.60-5.49 (5H, m, CH₂); 4.66 (1H, dd, J₁= 4.7, J₂= 3.7, H2' izomer 1); 4.60 (1H, dd, J₁= 4.9, J₂= 3.6, H2' izomer 2); 4.48-4.28 (10H, m, H3', H4', H5' and H5''; oba izomery);

4.01-3.95 (2H, m, CH alfa, oba izomery); 1.35-1.27 (7H, m, CH₃ Calfa, oba izomery); HRMS (ESI +) obliczone dla [C₃₃H₃₄F₂N₆O₉P⁺] 727,2087 m/z; znalezione 727.21070

V.4.3 Synteza 3,4-diFB⁷GMP-TA

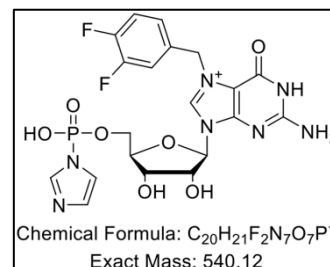
V.4.3.1 Synteza 3,4-diFBn⁷GMP (S37)

GMP (sól TEAH⁺) (611 mg, 1.32 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w bezwodnym DMSO (4.5 ml). Następnie, do roztworu dodano bromek 3,4-difluorobenzylu (819 mg, 3.96 mmol, 3 ekw., 506 µl). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 30 h mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego. Po 30 h reakcje zakończono poprzez 2-krotne rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej wodą MQ. Otrzymany wodny roztwór przemyto 3-krotnie octanem etylu, w celu usunięcia nieprzereagowanego bromku 3,4-difluorobenzylu. Fazę wodną nałożono na kolumnę chromatograficzną ze złożem DEAE-Sephadex w celu wyizolowania otrzymanego produktu. Elucję prowadzono za pomocą 0.7 M wodnego roztworu TEAB. Po oczyszczaniu otrzymano 0.98 mmol 3,4-difluorobn⁷GMP w postaci soli TEAH⁺, z wydajnością 69%. Strukturę otrzymanego związku potwierdzono za pomocą spektrometrii mas. HR MS ESI [M-H]⁻ m/z znalezione: 488.07962 (obliczona dla C₁₇H₁₇F₂N₅O₈P⁻, 488.0788



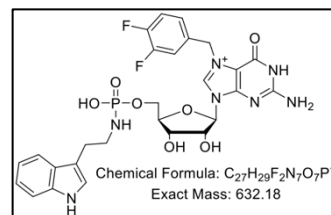
V.4.3.2 Synteza 5'-imidazolowej pochodnej 3,4-diFBn⁷GMP

Imidazolową pochodną otrzymałem według standardowej procedury, wykorzystywanej w Laboratorium Chemii Biofizycznej na Wydziale Fizyki UW. W tym celu, 3,4-difluorobn⁷GMP (250 mg, 0.51 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w bezwodnym DMF (7.6 ml). Następnie dodano imidazol (348 mg, 5.1 mmol, 10 ekw.), 2,2'-ditiopirydynę (338 mg, 1.54 mmol, 3 ekw.) oraz trietyloaminę (155 mg, 1.54 mmol, 0.2 mmol). Tak przygotowaną mieszaninę pozostawiono na 10 min, mieszając. Po 10 min dodano trifenylofosfinę (Ph₃P) (403 mg, 1.54 mmol, 3 ekw.) i kontynuowano mieszanie przez 5 h w temperaturze pokojowej. Po 5 h reakcji, reakcje zakończono poprzez wytrącenie otrzymanego produktu przy użyciu zimnego roztworu nadchloranu sodu (NaClO₄) w suchym acetonie (250 mg, 2.4 mmol, 4 ekw., 76 ml). Wytrącono osad przemywano kilkakrotnie zimnym acetonem aż wytrącony osad uzyskał barwę białą. Następnie osad wysuszono nad P₂O₅. 5'-imidazolid 3,4-diFBn⁷GMP otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 35%. 5'-imidazolid 3,4-diFBn⁷GMP wykorzystano bezpośrednio do dalszych syntez.



V.4.3.3 Synteza 3,4-diFB⁷GMP-TA

3,4-diFBn⁷GMP-Im (100 mg, 0.18 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w buforze HEPES, pH 8 (1.9 ml). Po rozpuszczeniu substratu, do mieszaniny reakcyjnej dodano tryptaminę (95 mg, 0.59 mmol, 3.2 ekw.). Mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano przez 30 h w temperaturze pokojowej. Po 30 h, mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą MQ i nałożono na kolumnę RP C18 i oczyszczono za pomocą chromatografii na Flash Chromatography System, Reveleris. Ostateczny związek otrzymano w postaci soli amonowej z wydajnością 3 %.

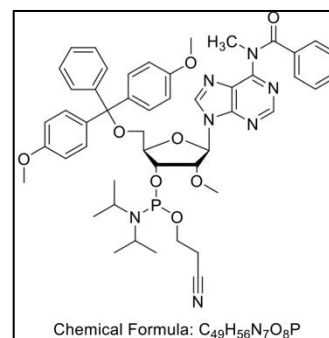


¹H NMR (500.24 MHz, Methanol-d₄) δ_H 7.51 (ddd, J = 10.8, 7.7, 2.3 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.35 – 7.27 (m, 2H), 7.11 (dt, J = 10.5, 8.3, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.02 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.86 (t, J = 7.5, 1H), 6.01 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 14.6, 1H), 5.38 (d, J = 14.5 Hz, 1H), 4.39 (t, J = 5.0, 1H), 4.27 (dd, J = 5.1, 2.4, 1H), 4.18 (ddd, J = 11.7, 4.8, 2.5, 1H), 3.98 (ddd, J = 11.8, 4.1, 1.6, 1H), 3.22 (dt, J = 9.4, 7.4, 2H), 2.92 (td, J = 7.2, 3.3, 2H), 1.39 – 1.29 (m, 2H), 1.00 – 0.88 (m, 1H); ³¹P NMR (202.49 MHz, Methanol-d₄) δ_P 8.36 (s, 1P); ¹⁹F NMR (471 MHz, Methanol-d₄) δ_F -139.21 (ddd, J = 20.0, 10.9, 7.9, 1F), -139.84 – -139.97 (m, 1F).

V.4.4 Synteza amidofosforynów do syntezy dinukleotydów na podłożu stałym

V.4.4.1 Synteza 5'-amidofosforynu N6,2'-O- -dimetyloadenozyny (5'-O-DMT-2'-OMe-N6-MeA-Pac)

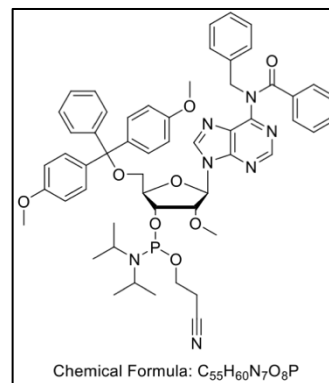
Handlowo dostępny 5'-amidofosforyn 2'-O- -metyloadenozyny (5'-O-DMT-2'-OMe-A-Pac) (ChemGenes) (1 g, 1.08 mola, 1 ekw.) rozpuszczono w DCM (10.8 ml). Następnie dodano jodek metylu (Sigma-Aldrich) (270 μl, 4.32 mmol, 4 ekw.), po czym do mieszaniny reakcyjnej dodano 1 M wodny roztwór NaOH (10.8 ml) z TBAB (348 mg, 1.08 mmol, 1 ekw.). Reakcję prowadzono przez 30 min intensywnie mieszając. Po 30 min do mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 200 ml wody, a następnie ekstrahowano eterem dietylowym. Zebraną warstwę organiczną odparowano i oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie ze złożem krzemionkowym za pomocą Reveleris X2 Flash Chromatography System (BUCHI). Oczyszczanie prowadzono w liniowym gradiencie octanu etylu w 0.5% roztworze TEA w heksanie. Końcowy związek otrzymano z wydajnością 67%. Strukturę i czystość otrzymanego amidofosforynu potwierdzono za pomocą NMR. ¹H NMR (500.24 MHz, Chloroform-d) δ 8.64 (d, J = 6.6, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.47 (t, J = 8.6, 4H), 7.37 (dd, J = 11.0, 7.5, 8H), 7.32 – 7.18 (m, 8H), 6.92 (t, J = 7.4, 2H), 6.84 (t, J = 8.5, 8H), 6.74 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 6.22 (dd, J = 9.3, 5.1, 2H), 5.18 (s, 4H), 4.68 (ddt, J = 29.1, 17.4, 4.9, 4H), 4.47



(q, J = 4.0 Hz, 1H), 4.41 (q, J = 4.0, 1H), 3.96 (dq, J = 13.2, 6.7, 5.5, 1H), 3.90 (q, J = 7.0, 1H), 3.82 – 3.77 (m, 17H), 3.75 – 3.66 (m, 1H), 3.65 (s, 6H), 3.69 – 3.59 (m, 2H), 3.62 – 3.46 (m, 10H), 3.42 (td, J = 11.3, 4.1, 2H), 2.66 (t, J = 6.4, 2H), 2.41 (t, J = 6.3, 2H), 1.24 (dd, J = 12.1, 6.4, 23H), 1.12 (d, J = 6.8, 6H); ^{31}P NMR (202.49 MHz, Chloroform-d) δ 150.96 (h, J = 9.0 Hz, 1P), 150.35 (p, J = 9.7, 1P).

V.4.4.2 Synteza 5'-amidofosforynu N6-benzyl-2'-O- -metyloadenozyny (5'-O-DMT-2'-OMe-N6-Bn-A-Pac)

Handlowo dostępny 5'-amidofosforyn 2'-O- -metyloadenozyny (5'-O-DMT-2'-OMe-A-Pac) (ChemGenes) (1 g, 1.08 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w DCM (10.8 ml). Następnie dodano bromek benzylu (Sigma-Aldrich) (513 μl , 4.32 mmol, 4 ekw.), po czym do mieszaniny reakcyjnej dodano 1 M wodny roztwór NaOH (10.8 ml) z TBAB (348 mg, 1.08 mmol, 1 ekw.). Reakcję prowadzono przez 30 min intensywnie mieszając. Po 30 min do mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 200 ml wody, a następnie ekstrahowano



eterem dietylowym. Zebraną warstwę organiczną odparowano i oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie ze złożem krzemionkowym za pomocą Reveleris X2 Flash Chromatography System (BUCHI). Oczyszczanie prowadzono w liniowym gradiencie octanu etylu w 0.5% roztworze TEA w heksanie. Końcowy związek otrzymano z wydajnością 72%. Strukturę i czystość otrzymanego amidofosforynu potwierdzono za pomocą NMR. ^1H NMR (500.24 MHz, Chloroform-d) δ_{H} 8.64 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.48 (dd, J = 10.4, 7.7 Hz, 4H), 7.42 – 7.14 (m, 26H), 6.93 (t, J = 7.3, 2H), 6.86 (dt, J = 9.5, 4.7, 8H), 6.68 (dd, J = 8.4, 3.2, 4H), 6.20 (dd, J = 9.0, 4.8, 2H), 5.70 (s, 4H), 5.18 (s, 3H), 4.73 (dt, J = 9.5, 4.7, 1H), 4.69 – 4.62 (m, 2H), 4.60 (t, J = 4.9, 1H), 4.47 (q, J = 4.0, 1H), 4.41 (q, J = 3.8, 1H), 3.97 (dd, J = 12.0, 5.3, 1H), 3.90 (q, J = 6.9, 1H), 3.83 – 3.78 (m, 11H), 3.77 – 3.57 (m, 5H), 3.59 – 3.46 (m, 9H), 3.42 (ddt, J = 17.2, 10.4, 5.1, 2H), 2.66 (t, J = 6.3, 2H), 2.41 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 1.85 (s, 1H), 1.25 (td, J = 7.2, 2.5, 21H), 1.13 (d, J = 6.8, 6H); ^{31}P NMR (202.49 MHz, Chloroform-d) δ_{P} 151.00 (h, J = 9.1, 1P), 150.36 (p, J = 9.7, 1P).

V.4.5 Synteza 5'-azydo-5'-deoksydinukleotydów na podłożu stałym – procedury ogólne

V.4.5.1 Synteza dinukleotydów na podłożu stałym za pomocą syntetyzera RNA – procedura ogólna B

Syntezy dinukleotydów na podłożu stałym przeprowadzono za pomocą syntetyzera RNA AKTA Oligopilot plus 10 Synthesizer (GE HealthCare). W tym celu, polistyrenowe złożo 5'-O-DMT-2'-O-TBDMS- rG-iBu 3'-Icaa PrimerSupport 5G (obsadzenie złoża: 301 $\mu\text{mol/g}$) (50 μmol , 166 mg) odważono i umieszczono w specjalnej kolumnie, którą zamontowano w syntetyzerze RNA. Kolumnę ze złożem przemyto bezwodnym acetonitrylem (Supleco®), po

czym rozpoczęto syntezę dinukleotydów na podłożu stałym. Synteza na podłożu stałym jest wieloetapową syntezą składającą się z czterech głównych etapów:

Detrzytlacja – usunięcie grupy trifenyloetylowej z pozycji 5' rybozy przy użyciu 3% (v/v) roztworu kwasu dichlorooctowego w toluenie

Aktywacja i sprzęganie – aktywatorem amidofosforynów w reakcji sprzęgania był 0.3 M roztwór 5-(benzylotio)-1- H-tetrazolu w acetonitrylu (Sigma-Aldrich). Do reakcji sprzęgania stosowano: 5'-O-DMT-2'-OPivOM A-Pac, 5'-O-DMT-2'-OMe-A-Pac, 5'-O-DMT-2'-OMe-N6-Me-A-Pac, 5'-O-DMT-2'-OMe-N6-Bn-A-Pac oraz/lub amidofosforyn **17**

Utlenianie – do utleniania P (III) wykorzystano 0.05 M roztwór jodu w bezwodnej pirydynie

Usuwanie grup cyjanoetylowych – do usunięcia grupy 2-cyjanoetylowej stosowano 20% roztwór dietyloaminy w acetonitrylu.

Po zakończeniu syntezy na podłożu stałym za pomocą syntetyzera RNA, kolumnę ze złożem wymontowywano z syntetyzera, przemywano bezwodnym acetonitrylem i suszono strumieniem argonu. Tak otrzymany dinukleotyd zakończony grupą 5'-hydroksylową poddawano dalszym reakcjom na podłożu stałym.

V.4.5.2 Manualna synteza dinukleotydów na podłożu stałym – procedura ogólna C

Z powodu ograniczeń syntetycznych wynikających z wielkości kolumny (możliwość przeprowadzenia syntezy w skali nie większej niż 50 μ mol złoża) wykorzystywanej w syntetyzerze RNA AKTA Oligopilot plus 10 Synthesizer (GE HealthCare) syntezę na podłożu stałym przeprowadzono manualnie w polipropylenowych strzykawkach. W tym celu, polistyrenowe złożo 5' -O-DMT-2' -O-TBDMS- rGiBu 3'-Icaa PrimerSupport 5G (ca. 301 μ mol/g loading) (200 μ mol, 664 mg) odważono i umieszczono w 10 ml polipropylenowej strzykawce. Odważone złożo przemyto bezwodnym acetonitrylem (Supleco®) 20 ml. Manualna synteza dinukleotydów na podłożu stałym obejmowała te same etapy oraz wykorzystano w niej te same odczynniki i reagenty jak w przypadku syntezy za pomocą syntetyzera RNA.

V.4.5.3 Synteza 5'-jodo-5'-deoksydinukleotydów – procedura ogólna D

Dinukleotydy zakończone grupą 5'-OH, otrzymane w wyniku syntezy na podłożu stałym, przekształcono w 5' jodo dinukleotydy. W celu podstawienia grupy 5'-OH grupą 5'-I, złożo z przyłączonym dinukleotydem przemywano 4 razy roztworem jodku trifenoksymetylofosfoniowego (250 mg) w DMF (1 ml). W przypadku syntezy dinukleotydów w skali 200 μ mol, złożo z przyłączonym dinukleotydem zawieszono w roztworze jodku trifenoksymetylofosfoniowego (1 g) w DMF (5 ml) i intensywnie mieszano przez 15 min. Po inkubacji złoża z roztworem jodku trifenoksymetylofosfoniowego złożo przemywano

bezwodnym DMF i acetonitrylem do momentu odbarwienia złoża. Po syntezie, złożo wysuszono strumieniem argonu i poddano dalszym reakcjom.

V.4.5.4 Synteza 5'-azydo-5'-deoksydinukleotydów – procedura ogólna E

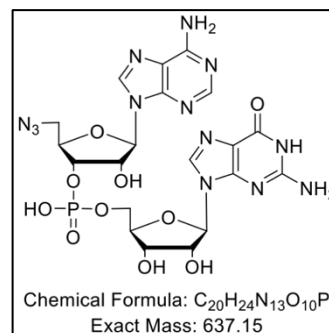
5'-jodo-5'-deoksydinukleotydy zsyntezowane według procedury D przekształcono 5'-azydo-5'-deoksydinukleotydy na drodze reakcji podstawienia nukleofilowego. W tym celu, złożo z przyłączonym 5'-jodo-5'-deoksydinukleotydem zawieszono w nasyconym roztworze azydku sodu w DMF (5 ml). Tak powstałą zawiesinę inkubowano przez 1 h w 60 °C intensywnie mieszając (1000 RPM). Po 1 h inkubacji, złożo przemyto DMF, H₂O oraz acetonitrylem, a następnie wysuszono strumieniem argonu.

V.4.5.5 Odbezpieczanie i odcinanie dinukleotydów od podłoża – procedura ogólna F

Po ostatnim etapie syntezy na podłożu stałym (reakcja azydowania), produkty końcowe (5'-azydo-5'-deoksydinukleotydy) poddano reakcji usuwania grup zabezpieczających oraz odcinania od podłoża. W tym celu złożo z przyłączonym dinukleotydem inkubowano w 33% wodnym roztworze amoniaku i 40% metyloaminy (1:1, v/v) przez 1 h w 55 °C. Po 1 h inkubacji zawiesinę przefiltrowano oddzielając warstwę wodną do podłoża. Podłoże dodatkowo przemyto wodą. Zebrane wodne frakcje połączono i liofilizowano. Otrzymany liofilizat ponownie rozpuszczono w wodzie i oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii cieczowej na złożu DEAE-*Sephadex* A-25, w formie HCO₃⁻. Końcowe związki wyeluowano z kolumny za pomocą liniowego gradientu TEAB (0 do 0.6 M). Etap usuwania grupy 2'-OTBDMS zabezpieczającej grupę 2'-OH nukleotydu przyłączonego do podłoża pominięto, ponieważ wszystkie grupy zabezpieczające usuwane w warunkach kwasowych zostały usunięta podczas reakcji jodowania.

V.4.5.6 Synteza 5'-N₃-ApG (12a)

5'-N₃ApG zsyntezowano w skali 50 μmoli według procedur ogólnych B, D, E i F za pomocą syntetyzera RNA AKTA Oligopilot plus 10 Synthesizer (GE HealthCare). Stosując 5'-O-DMT-2'-O-PivOM A-Pac (6 ekw.) podczas etapu sprzęgania. Końcowy związek otrzymano z wydajnością 26% otrzymując 5'-N₃ApG w postaci soli TEAH⁺. Strukturę oraz czystość związku potwierdzono za pomocą NMR oraz HR MS.

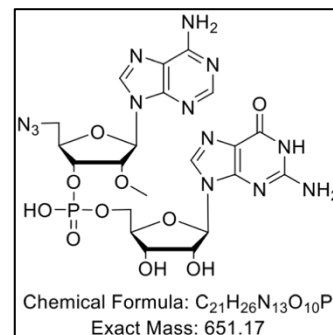


¹H NMR, (500.24 MHz, D₂O, TSP); δ_H 8.19 (s, 1H); 8.08 (s, 1H); 7.91 (s, 1H), 5.92 (d, 1H, J = 4.3, H1'), 5.78 (d, 1H, J = 4.6, H1'), 4.75- 4.73 (m, 1H, H2'), 4.68-4.62 (m, 2H, H2' and H3'), 4.51-4.47 (m, 1H, H3'), 4.37- 4.33 (m, 1H, H4'), 4.32- 4.24 (m, 1H, H4' i H5'), 4.20- 4.14 (m, 1H, H5''), 3.66 (dd, 1H, J = 13.7, J = 3.2, H5'), 3.60 (dd, 1H, J = 13.7, J = 5.1, H5''), 3.19 (q, 9H, J = 7.4, TEA), 1.27 (t, 14H, 7.4, TEA); ³¹P NMR δP (202.49 MHz, D₂O, kwas fosforowy); δP -

0.73 (s, 1P); HRMS (ESI ⁻) obliczono dla [C₂₀H₂₃N₁₃O₁₀P⁻]: 636.1434; m/z zmierzono: 636.1436

V.4.5.7 Synteza 5'-N₃-AmpG (12b)

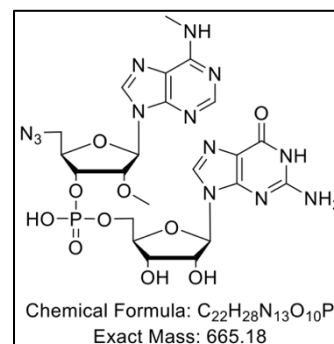
5'-N₃AmpG (**12b**) zsyntezowano w skali 50 μmoli według procedur ogólnych B, D, E i F za pomocą syntetyzera RNA AKTA Oligopilot plus 10 Synthesizer (GE HealthCare). Stosując 5'-O-DMT-2'-O-Me A-Pac (6 ekw.) podczas etapu sprzęgania. Końcowy związek otrzymano z wydajnością 52% otrzymując 5'-N₃-AmpG w postaci soli TEAH⁺. Strukturę oraz czystość związku potwierdzono za pomocą NMR oraz HR MS.



¹H NMR, (500.24 MHz, D₂O, TSP) δ_H 8.25 (s, 1H); 8.14 (s, 1H); 7.93 (s, 1H); 6.04 (d, 1H, J = 4.7, H1'), 5.82 (d, 1H, J= 4.9, H1'), 4.76- 4.72 (m, 1H, H2'), 4.54- 4.48 (m, 2H, H2' i H3'), 4.32 (dd, 1H, J= 8.5, J= 4.7, H3'), 4.22- 4.18 (m, 2H, H4'), 3.59 (dd, 2H, J= 4.3, J= 2.9, H5' and H5''), 3.49 (s, 3H, CH₃), 3.57- 3.51 (m, 1H, H5'), 3.46- 3.41 (m, 1H, H5''); ³¹P NMR (202.49 MHz, D₂O, kwas fosforowy); δP -0.15 (d, 1P, J= 8.4); HRMS (ESI ⁻) obliczono dla [C₂₁H₂₅N₁₃O₁₀P⁻]: 650.1590 m/z zmierzono 650.1599

V.4.5.8 Synteza 5'-N₃-^{m6}AmpG (12d)

5'-N₃-^{m6}AmpG (**12d**) zsyntezowano w skali 50 μmoli według procedur ogólnych B, D, E i F za pomocą syntetyzera RNA AKTA Oligopilot plus 10 Synthesizer (GE HealthCare). Stosując 5'-O-DMT-2'-O-Me ^{m6}A-Pac (6 ekw.) podczas etapu sprzęgania. Końcowy związek otrzymano z wydajnością 22% otrzymując 5'-N₃-^{m6}AmpG (**12d**) w postaci soli TEAH⁺. Strukturę związku potwierdzono za pomocą HR MS. HRMS (ESI ⁻) obliczono dla [C₂₂H₂₇N₁₃O₁₀P⁻]: 664.1747 m/z; zmierzono 664.17603



V.4.6 Synteza 5'-(2-azydo-etylo)-fosforanu dinukleotydu – procedura ogólna F

V.4.6.1 Synteza 5'-(2-bromoetylo)-fosforanu dinukleotydu

5'-(2-bromoetylo)-fosforanu dinukleotyd zsyntezowano w skali 200 μmoli według procedury ogólnej C za pomocą manualnej syntezy na podłożu stałym. Do etapu sprzęgania zastosowano 5'-O-DMT-2'-O-Me A-Pac (1.5 ekw.) z dodatkowym etapem sprzęgania z 2-cyanoetylo 2-bromoetylo N,N-diisopropylamidofosforinem (2.5 ekw.). Otrzymany związek poddano dalszym reakcjom.

V.4.6.2 Reakcja 5'-azydowania

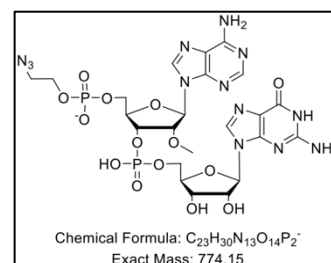
Reakcje azydowania 5'-Br-C₂H₄pA_mpG przeprowadzono zawieszając złoże z przyłączonym 5'-bromoetylo-dinukleotydem w nasyconym roztworze azydku sodu w DMF (5 ml). Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano w temperaturze 60 °C przez 1 h, po czym złoże przefiltrowano i przemyto DMF, H₂O, EtOH oraz acetonitrylem. Przemyte złoże wysuszono strumieniem argonu i poddano dalszym reakcjom.

V.4.6.3 Odbezpieczanie i odcinanie dinukleotydu

Złoże z przyłączonym dinukleotydem zawieszono w 33% wodnym roztworze amoniaku i 40% metyloaminy (1:1, v/v) (20 ml) i inkubowano przez 1 h w 55 °C. Po 1h inkubacji złoże przefiltrowano, zbierając warstwę wodną. Złoże dodatkowo przemyto 20 ml wody. Zebrane frakcje wodne zliofilizowano usuwając tym samym amoniak z próbki. Po liofilizacji usunięto grupę zabezpieczającą 2'-O- TBDMS poprzez rozpuszczenie 5'-azydo dinukleotydu(nr) w bezwodnym, DMSO (250 µl) w 65 °C, po czym dodano TEA (125 µl) oraz TEA·3HF 65 µl. Tak przygotowaną próbkę inkubowano w 65 °C przez 4 h. Po 4 h inkubacji próbkę schłodzono i dodano 0.05 M NaHCO₃ w celu zobojętnienia próbki do pH 6-7. Otrzymany związek rozcieńczono 2-krotnie wodą i oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii cieczerwowej na złożu DEAE-Sephadex A-25, w formie HCO₃⁻, eluując właściwy związek za pomocą liniowego gradientu TEAB (0-0.6 M).

V.4.6.4 Synteza 5'-N₃-C₂H₄pA_mpG (12c)

Związek 5'-N₃-C₂H₄pA_mpG zsyntezowano stosując procedurę ogólną F. Podczas etapu sprzęgania wykorzystano 5'-O-DMT-2'-OMe-A-Pac (1.5 ekw.) z dodatkowym etapem sprzęgania z 2-cyanoetylo 2-bromoetylo N,N-diisopropylamidofosforynem (2.5 ekw.).

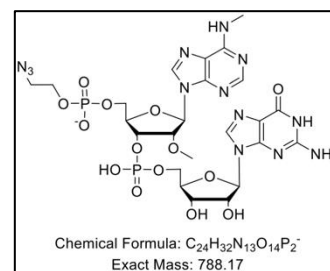


Końcowy związek otrzymano z wydajnością 45% otrzymując 5'-N₃-C₂H₄pA_mpG w postaci soli TEAH⁺. Strukturę oraz czystość związku potwierdzono za pomocą NMR oraz HR MS.

¹H NMR, (500.24 MHz, D₂O, TSP): δ_H 8.25 (s, 1H); 8.41 (s, 1H); 8.23 (s, 1H); 7.97 (s, 1H), 6.10 (d, 1H, J= 5.6, H1'), 5.86 (d, 1H, J= 5.5, H1'), 4.96 (ddd, 1H, J= 8.2, J= 4.8, J= 3.6, H3'), 4.55-4.48 (m, 2H, H2' i H3'), 4.48-4.43 (m, 1H, H4'), 4.37- 4.32 (m, 1H, H4'), 4.22 (t, 2H, J= 4.0, H5' i H5''), 4.06 (dt, 1H, J=11.7, J=3.6, H5'), 3.98 (ddd, 1H, J= 11.7, J= 4.9, J= 2.6, H5''), 3.95-3.86 (m, CH₂), 3.53 (q, 2H, J= 7.3, EtOH), 3.48 (s, 3H, CH₃), 3.44-3.34 (m, 2H, CH₂), 3.20 (q, 5H, J=7.3, TEA) 1.33 (t, J= 7.3, EtOH), 1.28 (t, J= 7.3, TEA); ³¹P NMR δ_P (202.49 MHz, D₂O, kwas fosforowy); δ_P -0.14 (s, 1P), 0.58 (s, 1P); HRMS (ESI -) obliczono dla [C₂₃H₃₀N₁₃O₁₄P₂]⁻: 774.1516; m/z zmierzono 774.15205.

V.4.6.5 Synteza 5'-N₃-C₂H₄p^{m6}A_mpG (12e)

Związek 5'-N₃C₂H₄pA_mpG zsyntezowano stosując procedurę ogólną F. Podczas etapu sprzęgania wykorzystano 5'-O-DMT-2'-OMe-N6-Me-A-Pac (1.5 ekw.) z dodatkowym etapem sprzęgania z 2-cyanoetylo 2-bromoetylo N,N-diisopropylamidofosforem (2.5 ekw.).

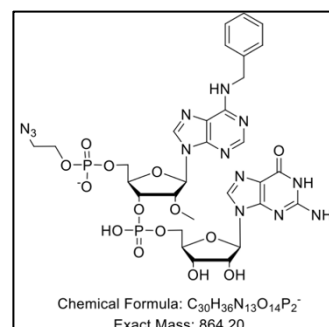


Końcowy związek otrzymano z wydajnością 35% otrzymując 5'-N₃-C₂H₄p^{m6}A_mpG w postaci soli TEAH⁺. ¹H NMR (500.24 MHz, D₂O, TSP): δ_H 8.30 (s, 1H); 8.14 (s, 1H); 7.93 (s, 1H), 6.06 (d, 1H, J= 5.4, H1'), 5.83 (d, 1H, J= 5.1, H1'), 4.93 (dt, 1H, J= 8.3, J= 4.3, J= 4.3, H3'), 4.52-4.45 (m, 2H, H2' i H3'), 4.44-4.38 (m, 1H, H4'), 4.36- 4.30 (m, 1H, H4'), 4.26-4.17 (m, 1H, H5'), 4.05 (dt, J = 11.8, 3.7 Hz, 1H), 3.99 – 3.90 (m, 1H), 3.93 – 3.82 (m, 2H), 3.49 (s, 3H, CH₃), 3.27 (q, J = 7.2 Hz, 3H, TEAH), 3.22 – 3.12 (m, 6H), 3.10 – 3.02 (m, 6H) ; ³¹P NMR δ_P (202.49 MHz, D₂O, H₃PO₄); δ_P -0.19 (s, 1P), 0.86 (s, 1P)

HRMS (ESI -) obliczono dla [C₂₄H₃₂N₁₃O₁₄P₂⁻]: 788.1672; m/z zmierzono 788.1684

V.4.6.6 Synteza 5'-N₃-C₂H₄p^{Bn6}A_mpG (12f)

Związek 5'-N₃C₂H₄pA_mpG zsyntezowano stosując procedurę ogólną F. Podczas etapu sprzęgania wykorzystano 5'-O-DMT-2'-OMe-N6-Bn-A-Pac (1.5 ekw.) z dodatkowym etapem sprzęgania z 2-cyanoetyl 2-bromoetyl N,N-diisopropylamidofosforem (2.5 ekw.).



Końcowy związek otrzymano z wydajnością 68% otrzymując 5'-N₃-C₂H₄p^{Bn6}A_mpG w postaci soli TEAH⁺. Strukturę oraz czystość związku potwierdzono za pomocą NMR. ¹H NMR (500.24 MHz, D₂O, TSP) δ_H 8:32 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.15-7.00 (m, 5H, aromatyczne Bn6), 6.04 (d, 1H, J= 6.2 Hz, H1'), 5.81 (d, 1H, J= 5.2 Hz, H1'), 4.96 (ddd, 1H, J= 7.9, J= 4.9, J= 2.9, H3'), 4.71 (t, 1H, J= 5.2, H2'), 4.55-4.47 (m, 3H, H2'; H3'; CH₂-Bn6), 4.46-4.43 (m, 1H, H4'), 4.33-4.28 (m, 1H, H4'), 4.24-4.17 (m, 2H, H5'; H5''), 4.08-4.02 (m, 1H, H5'), 3.98-3.93 (m, 1H, H5''), 3.89-3.81 (m, 2H, N₃CH₂), 3.43 (s, 3H, N7-CH₃), 3.31-3.26 (m, 1H, CH₂-OP), 3.08 (q, 10H, TEA), 1.18 (t, 15H, TEA); ³¹P NMR (202.49 MHz, D₂O, H₃PO₄) δ_P -0.23 (s, 1P, 5'-P), -0.83 (s, 1P, 3'-5' P)

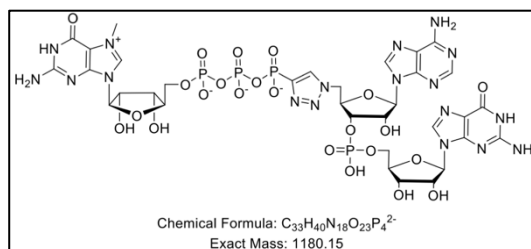
V.4.7 Synteza trinukleotydowych analogów kapu przy użyciu reakcji CuAAC – procedura ogólna G

Do wodnego roztworu 5'-azydo dinukleotydu (sól TEAH⁺) (15-30 mM) dodano analog m⁷GTP (1-3 ekw.), posiadający terminalną grupę alkinową w obrębie reszty fosforanowej γ, rozpuszczony w buforze TEA/CH₃COOH, pH 7.5 lub w wodzie (w jak najmniejszej objętości).

Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano przez 10 min w temperaturze 25-40 °C, po czym dodano CuSO₄ lub kompleks CuSO₄:THPTA (1:1) (0.2-0.5 ekw.) rozpuszczony w wodzie. Reakcje rozpoczęto dodając do mieszaniny reakcyjnej askorbinian sodu (10 ekw.) rozpuszczony w buforze TEA/CH₃COOH lub w wodzie. Reakcje prowadzono przez 0.5-3 h w temperaturze 25-40 °C. Reakcje zakończono poprzez skompleksowanie jonów Cu²⁺ za pomocą wodnego roztworu Na₂EDTA (1-1.5 ekw., w zależności od ilości CuSO₄ dodanego do reakcji). Otrzymane związki oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii cieczowej ze złożem DEAE-Sephadex A-25, w formie HCO₃⁻ oraz dodatkowo za pomocą RP HPLC z kolumną półpreparatywną. Struktury oraz czystość finalnych związków potwierdzono za pomocą NMR oraz HR MS.

V.4.7.1 Synteza m⁷Gppp-tr-ApG (1)

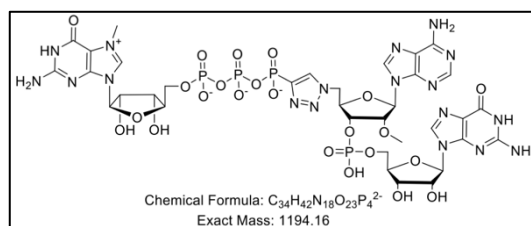
Związek m⁷Gppp-tr-ApG (**1**) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃ApG (**12a**) (6.5 μmol, 1 ekw., 300 μl H₂O), m⁷GpppC₂H (**13**) (6.5 μmol, 1 ekw., 300 μl TEA/CH₃COOH, pH 7.5), CuSO₄/THPTA (3.25 μmol, 0.5 ekw., 5 μl) oraz AscNa (65 μmol, 10 ekw., 30 μl). Reakcję prowadzono przez 1 h w 37 °C. Reakcję zakończono rozcieńczając mieszaninę reakcyjną wodnym roztworem Na₂EDTA (9.75 μmol, 1.5 ekw., 600 μl). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10). Związek m⁷Gppp-tr-ApG otrzymano z wydajnością 35.9% w postaci soli amonowej.



¹H NMR (399.90 MHz; D₂O; TSP) δ_H 9.13 (s, 1H, H8 m⁷G), 8.21 (s, 1H, H8), 8.20 (s, 1H, H8), 8.18 (s, 1H, H2), 8.01 (s, 1H, Htriazol), 5.95 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H1'), 5.93 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H1'), 5.82 (d, J = 4.9 Hz, 1H, H1'), 5.00 – 4.87 (m, 1H, H3'), 4.68 – 4.59 (m, 2H, H2' jeden proton H2' przykryty przez sygnał pochodzący od H₂O), 4.56 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H3'), 4.49 (dt, J = 15.0, 4.4 Hz, 2H, H3' i H4'), 4.35 (s, 1H, H4'), 4.33 – 4.12 (m, 7H, H5' i H5'' i H4'), 4.03 (s, 3H, CH₃). ³¹P NMR (161.89 MHz, D₂O, kwas fosforowy) δ_P - 0.74 (s, 1P, ApG), -7.94 (d, J = 22.2 Hz), -11.49 (d, J = 19.1 Hz), -23.32 (t, J = 20.6 Hz, 1P, Pβ). HRMS (ESI-) obliczone dla [C₃₃H₄₀N₁₈O₂₃P₄]⁻ 1181.15479; m/z zmierzone: 1181.15634

V.4.7.2 Synteza m⁷Gppp-tr-AmpG (2)

Związek m⁷Gppp-tr-AmpG (**2**) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃AmpG (**12b**) (3.7 μmol, 1 ekw., 150 μl H₂O), m⁷GpppC₂H (**13**) (3.7 μmol, 1 ekw., 150 μl TEA/CH₃COOH, pH 7.5), CuSO₄/THPTA (1.85 μmol, 0.5 ekw., 2.5 μl) oraz AscNa (37 μmol, 10 ekw., 10 μl). Reakcję prowadzono przez 30 min w 37 °C. Reakcję

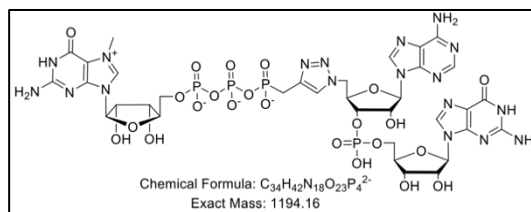


zakończono rozcieńczając mieszaninę reakcyjną wodnym roztworem Na₂EDTA (5.55 μ mol, 1.5 ekw., 300 μ l). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC ([metoda D](#), [Tabela 10](#)). Związek m⁷Gppp-tr-ApG otrzymano z wydajnością 24.5% w postaci soli amonowej.

¹H NMR (399.90 MHz; D₂O; TSP) δ_H 9.12 (s, 1H, H8 m⁷G), 8.21 (s, 1H, H8), 8.19 (s, 1H, H8), 8.16 (s, 1H, H2), 7.94 (s, 1H, Htriazol), 6.02 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H1'), 5.94 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H1'), 5.80 (d, J = 5.19 Hz, 1H, H1'), 5.00 (dt, J1=8.4; J2=5.70 Hz, 1H, H3'), 4.61 (dd, J1=4.87; J2=3.70, 1H, H2'), 4.56 (dd, J1=10, J2=5.73, 1H, H3'), 4.50 (dd, J1=5.0; J2=4.80, H4') 4.46 (t, J=5.0 Hz, 1H, H3'), 4.39 (dd, J1=5.2; J2=3.7 Hz, 1H, H2'), 4.36-4.33 (m, 1H, H4'), 4.31-4.29 (m, 1H, H4'), 4.27-4.12 (m, 5H, H5' i H5''), 4.02 (s, 3H, CH₃ (m⁷G)), 3.47 (m, 3H, CH₃, 2'-O-Me); ³¹P NMR (161.89 MHz, D₂O, kwas fosforowy): δ_P -1 (s, 1P, ApG), -7.96 (d, J = 22.16 Hz), -11.49 (d, J = 17.3 Hz), -23.35 (t, J = 22 Hz, 1P, P β); HRMS (ESI-) obliczone dla [C₃₄H₄₃N₁₈O₂₃P₄]⁻ 1195.1704; m/z zmierzone: 1195.17123

V.4.7.3 Synteza m⁷Gppp-CH₂-tr-ApG (3)

Związek m⁷Gppp-CH₂-tr-ApG (**3**) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃ApG (**12a**) (6.5 μ mol, 1 ekw., 300 μ l H₂O), m⁷GpppC₃H₃ (**14**) (6.5 μ mol, 1 ekw., 300 μ l TEA/CH₃COOH, pH 7.5), CuSO₄/THPTA (3.25 μ mol, 0.5 ekw., 5 μ l)

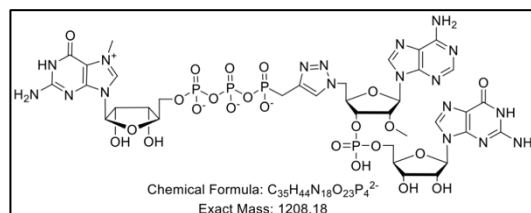


oraz AscNa (65 μ mol, 10 ekw., 30 μ l). Reakcję prowadzono przez 15 min w 37 °C. Po 15 min, m⁷GpppC₃H₃ całkowicie przereagowało w produkt, dlatego do mieszaniny reakcyjnej dodano kolejną porcję m⁷GpppC₃H₃ (6.5 μ mol, 1 ekw.). Inkubację kontynuowano przez kolejne 45 min po czym ją zakończono poprzez rozcieńczając mieszaninę reakcyjnej wodnym roztworem Na₂EDTA (9.75 μ mol, 1.5 ekw., 300 μ l). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC ([metoda D](#), [Tabela 10](#)). Związek m⁷Gppp-tr-ApG otrzymano z wydajnością 56.9% w postaci soli amonowej.

¹H NMR (399.90 MHz; D₂O; TSP) δ_H 9.17 (s, 1H, H8), 8.21 (s, 1H, H8), 8.10 (s, 1H, H8), 7.94 (s, 1H, H2), 7.77 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Htriazol), 5.96 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1'), 5.92 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H1'), 5.80 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H1'), 4.89 (dt, J1= 7.8, J2= 5.6 Hz, 1H, H3'), 4.75 (t, J = 5.0 Hz, 1H, H2'), 4.72 – 4.66 (m, 3H, H2' i H3',H4'), 4.63 (dd, J = 4.9, 3.6 Hz, 1H, H2'), 4.61 – 4.54 (m, 1H, H4'), 4.50 (q, J = 5.1 Hz, 2H, H3' i H4'), 4.38 – 4.26 (m, 4H, H5',H5''), 4.25 – 4.14 (m, 1H, H5'',H5'), 4.03 (s, 3H, CH₃), 3.64-3.55 (m, 1H) 3.14 (dq, J = 20.5, 15.5 , 2H, HCH₂); ³¹P NMR δ_P (161.89 MHz, D₂O, kwas fosforowy) 10.56 (dd, J1 = 45.3 Hz, J2= 24.6 Hz 1P), -0.80 (s, 1P, ApG), -11.56 (d, J = 19.5 Hz, 1P), -23.10 (dd, J = 25.5, 19.3 Hz, 1P, P β); HRMS(ESI-) obliczono dla [C₃₄H₄₂N₁₉O₂₃P₄]⁻ 1195.17044; m/z zmierzone 1195.17216

V.4.7.4 Synteza m⁷Gppp-CH₂-tr-AmpG (4)

Związek m⁷Gppp-CH₂-tr-AmpG (**4**) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃AmpG (**12b**) (3.7 μmol, 1 ekw., 150 μl H₂O), m⁷GpppC₃H₃ (**14**) (3.7 μmol, 1 ekw., 150 μl TEA/CH₃COOH, pH 7.5), CuSO₄/THPTA (1.85 μmol, 0.5 ekw., 2.5 μl)

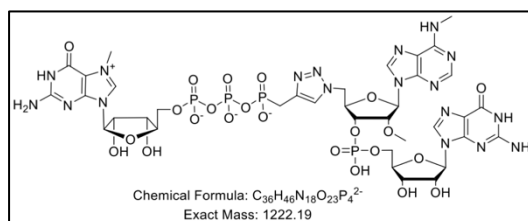


oraz AscNa (37 μmol, 10 ekw., 10 μl). Reakcję prowadzono przez 30 min w 37 °C. Po 30 min reakcję zakończono poprzez rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej wodnym roztworem Na₂EDTA (5.55 μmol, 1.5 ekw., 150 μl). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10). Związek m⁷Gppp-CH₂-tr-AmpG (**4**) otrzymano z wydajnością 29.3% w postaci soli amonowej.

¹H NMR (399.90 MHz; D₂O; TSP) δ_H 9.17 (s, 1H, H8 m⁷G), 8.23 (s, 1H, H8), 8.12 (s, 1H, H8), 7.95 (s, 1H, H2), 7.74 (d, J = 2.1 Hz, 1H, HTriazol), 6.04 (d, J = 3.51 Hz, 1H, H1'), 5.97 (d, J = 3.63 Hz, 1H, H1'), 5.82 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H1'), 5.02 (dt, J₁=8.13; J₂=5.60 Hz, 1H, H3'), 4.68 (d, J=4.76 Hz, 2H, H2' and H3'), 4.64 (dd, J₁=4.88; J₂=3.70 Hz, 1H, H2'), 4.56-4.47 (m, 5H, H2', H3', H4'), 4.36-4.30 (m, 3H, H5', H5''), 4.26-4.15 (m, 3H, H5', H5''), 4.03 (s, 3H, CH₃), 3.49 (s, 3H, CH₃ 2'O-Me), 3.22-3.05 (m, 2H, CH₂), ³¹P NMR (161.89 MHz, D₂O, H₃PO₄) δP 10.39 (q, J₁ = 22.39 Hz, 1P), -1.04 (s, 1P, ApG), -11.56 (d, J = 19.45 Hz, 1P), -23.10 (dd, J = 25.14, 19.45 Hz, 1P, Pβ); HRMS (ESI-) obliczony dla [C₃₅H₄₅N₁₈O₂₃P₄]⁻ 1209.18609; m/z zmierzone 1209.18648

V.4.7.5 Synteza m⁷Gppp-CH₂-tr-^{m6}AmpG (4a)

Związek m⁷Gppp-CH₂-tr-^{m6}AmpG (**4a**) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃^{m6}AmpG (**12d**) (18.5 μmol, 1 ekw., 1000 μl H₂O), m⁷GpppC₃H₃ (**14**) (37 μmol, 2 ekw., 300 μl H₂O), CuSO₄ (9.25 μmol, 0.5 ekw., 10 μl)

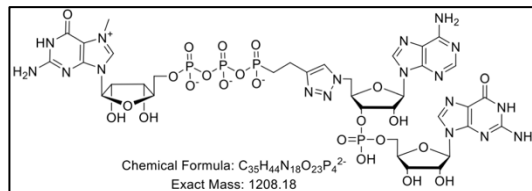


oraz AscNa (185 μmol, 36 mg, 10 ekw.). Reakcję prowadziłem w temperaturze 37 °C przez 2 h. Po 2 h reakcję zakończyłem dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór Na₂EDTA (37 μmol, 2 ekw., 1 ml). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10). Związek m⁷Gppp-CH₂-tr-^{m6}AmpG (**4a**) otrzymano z wydajnością 40% (9.6 mg, 8 μmol) w postaci soli amonowej. ¹H NMR (500.24 MHz, D₂O, TSP) δ_H 8.10 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 6.01 (d, 1H, J= 3.4, H1'), 5.92 (d, 1H, J= 3.8, H1'), 5.79 (d, 1H, J= 4.7, H1'), 4.97-4.90 (m, 1H, H3'), 4.71 (t, 1H, J= 4.70, H2'), 4.64-4.57 (m, 2H), 4.48 (dt, 2H, J= 9.1, J= 5.1, CH₂), 4.42-4.36 (m, 1H,), 4.37-4.30 (m, 2H, H5', H5''), 4.29- 4.23 (m, 2H, H5', H5''), 4.22- 4.14 (m, 2H, H5', H5''), 3.96 (s, 3H, CH₃ N7), 3.53 (s, 3H, CH₃ 2'OMe), 3.09 (s, 3H, ^{m6}A).

^{31}P NMR (202.49 MHz, D_2O , H_3PO_4) δ_{P} 10.69 (d, 1P, $J=25.6$), -0.97 (s, 1P), -11.51 (d, 1P, $J=19.0$), -22.83- (-23.25) (m, 1P); HRMS (ESI -) obliczone dla $[\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_{18}\text{O}_{23}\text{P}_4]^-$: 1223.2017 m/z, znalezione 1223.2033 m/z.

V.4.7.6 Synteza $\text{m}^7\text{Gppp-C}_2\text{H}_4\text{-tr-ApG}$ (5)

Związek $\text{m}^7\text{Gppp-C}_2\text{H}_4\text{-tr-ApG}$ (5) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując $5'\text{-N}_3\text{ApG}$ (12a) (5.5 μmol , 1 ekw., 300 μl H_2O), $\text{m}^7\text{GpppC}_4\text{H}_5$ (15) (5.5 μmol , 1 ekw., 150 μl TEA/ CH_3COOH , pH

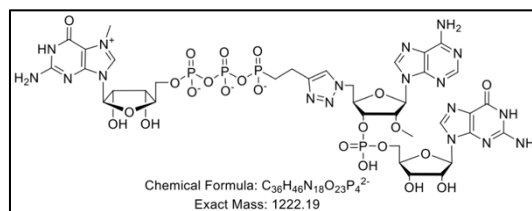


7.5), CuSO_4 (2.2 μmol , 0.4 ekw., 3 μl) oraz AscNa (55 μmol , 10 ekw., 30 μl). Reakcję prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po 1 h reakcji, $\text{m}^7\text{GpppC}_4\text{H}_5$ zostało całkowicie przekształcone w produkt. Z tego powodu do reakcji oddano dodatkową porcję $\text{m}^7\text{GpppC}_4\text{H}_5$ (2 μmol , 0.4 ekw.). Po dodaniu dodatkowej porcji substratu, reakcję inkubowano przez dodatkowe 10 min po czym ją zakończono dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór Na_2EDTA (8.25 μmol , 3 ekw., 600 μl). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10). Związek $\text{m}^7\text{Gppp-C}_2\text{H}_4\text{-tr-ApG}$ otrzymano z wydajnością 41.2% w postaci soli amonowej.

^1H NMR (399.90 MHz; D_2O ; TSP) δ_{H} 8.07 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.84 (s, 1H, Htriazol), 5.91-5.89 (m, 2H, $\text{H1}'$), 5.80 (d, 1H, $J=4.49$, $\text{H1}'$), 4.89 (s, 1H), 4.74-4.69 (m, 2H, $\text{H2}'$, pik został przykryty przez pik pochodzący od H_2O), 4.64 (dd, 1H, $J_1=5.09$, $J_2=2.06$, $\text{H2}'$), 4.61-4.58 (m, 1H), 4.55 (s, 3H), 4.49 (dd, 2H, $J_1=10.16$, $J_2=5.33$), 4.36-4.30 (m, 4H), 4.23-4.16 (m, 2H), 4.02 (s, 3H, CH_3), 2.81-2.70 (m, 2H, CH_2), 2.05-1.91 (m, 2H, CH_2); ^{31}P NMR (161.89 MHz, D_2O , kwas fosforowy) δ_{P} 17.20-16.82 (m, 1P, $\text{P}\alpha$), -0.80 (s, 1P, $3' \text{ P}$), -11.52 (d, $J=18.36$, 1P, $\text{P}\gamma$), -23.02 (dd, $J=25.15$, $J_2=19.03$ Hz, 1P β); HRMS(ESI-) obliczone dla $[\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{N}_{18}\text{O}_{23}\text{P}_4]^-$ 1209.18609; m/z zmierzone 1209.18608

V.4.7.7 Synteza $\text{m}^7\text{Gppp-C}_2\text{H}_4\text{-tr-AmpG}$ (6)

Związek $\text{m}^7\text{Gppp-C}_2\text{H}_4\text{-tr-AmpG}$ (6) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując $5'\text{-N}_3\text{AmpG}$ (12b) (3.7 μmol , 1 ekw., 200 μl H_2O), $\text{m}^7\text{GpppC}_4\text{H}_5$ (15) (3.7 μmol , 1 ekw., 100 μl TEA/ CH_3COOH , pH 7.5), CuSO_4 (1.5 μmol , 0.4 ekw., 3 μl) oraz AscNa

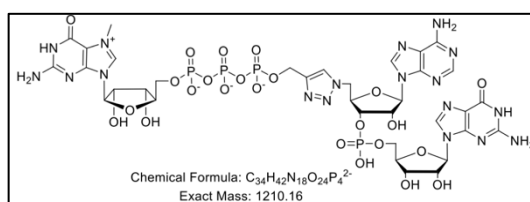


(37 μmol , 10 ekw., 30 μl). Reakcję prowadzono przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po 30 min zakończono dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór Na_2EDTA (4.4 μmol , 1.2 ekw., 150 μl). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D). Związek $\text{m}^7\text{Gppp-C}_2\text{H}_4\text{-tr-ApG}$ otrzymano z wydajnością 29.3% w postaci soli amonowej.

^1H NMR (399.90 MHz; D_2O ; TSP) δ_{H} 9.17 (s, 1H, H8 m^7G), 8.24 (s, 1H, H8), 8.10 (s, 1H, H8), 7.98 (s, 1H, H2), 7.48 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, HTriazol), 6.08 (d, $J = 2.13$ Hz, 1H, H1'), 5.98 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H1'), 5.82 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H1'), 5.08 (dt, $J_1=7.2$; $J_2=5.0$ Hz, 1H, H3'), 4.69-4.67 (m, 1H, H2'), 4.57-4.53 (m, 2H, H2' and H3'), 4.50-4.44 (m, 4H, H3' i H4'), 4.39-4.34 (m, 3H, H5', H5''), 4.30-4.24 (m, 2H, H5', H5''), 4.20-4.12 (m, 1H, H5', H5''), 4.07 (s, 3H, CH_3), 3.53 (s, 3H, CH_3 2'-O-Me), 2.74-2.68 (m, 2H, CH_2), 1.99-1.91 (m, 2H, CH_2); ^{31}P NMR (161.89 MHz, D_2O , kwas fosforowy) δ_{P} 17.10-16.50 (m, 1P, Py), -0.95- (-0.93) (m, 1P, ApG), -11.45 (d, $J = 18.70$ Hz, 1P, $\text{P}\alpha$), -22.83- (-23.11) (m, 1P, $\text{P}\beta$); HRMS (ESI-) obliczone dla $[\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_{18}\text{O}_{23}\text{P}_4]^-$ 1223.20174; m/z zmierzone: 1223.20144

V.4.7.8 Synteza of $\text{m}^7\text{GpppOCH}_2\text{-tr-ApG}$ (7)

Związek $\text{m}^7\text{GpppOCH}_2\text{-tr-ApG}$ (7) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'- N_3ApG (12a) (2.5 μmol , 1 ekw., 300 μl H_2O), $\text{m}^7\text{GpppOC}_3\text{H}_3$ (16) (2.5 μmol , 1 ekw., 50 μl TEA/ CH_3COOH , pH

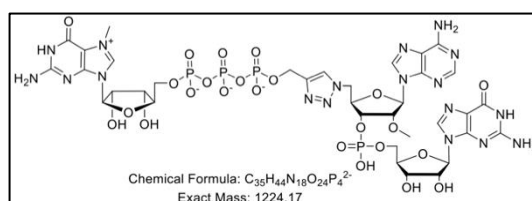


7.5), CuSO_4 (1 μmol , 0.4 ekw., 1.4 μl) oraz AscNa (25 μmol , 10 ekw., 25 μl). Reakcję prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po 1 h zakończono dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór Na_2EDTA (3.75 μmol , 1.5 ekw., 150 μl). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10). Związek $\text{m}^7\text{GpppOCH}_2\text{-tr-ApG}$ otrzymano z wydajnością 41.2% w postaci soli amonowej.

^1H NMR (399.90 MHz; D_2O ; TSP) δ_{H} 9.14 (s, 1H, H8 m^7G), 8.16 (s, 1H, H8), 8.11 (s, 1H, H8), 7.95 (s, 1H, C2), 7.84 (s, 1H, HTriazol), 5.97 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H1'), 5.94 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H1'), 5.81 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H1'), 5.02 – 4.97 (m, 1H, H3'), 4.89-4.88 (m, 2H, CH_2), 4.77-4.75 (m, 1H, H2', przykryte przez pik pochodzący od wody), 4.73 (dd, 1H, $J_1=5.24$; $J_2=2.54$, H2'), 4.66 (dd, 1H, $J_1=4.88$; $J_2=3.77$, H2'), 4.63-4.62 (m, 2H, H3'), 4.54-4.49 (m, 3H, H4'), 4.38-4.16 (m, 5H, H5', H5''), 4.06 (s, 3H, CH_3); ^{31}P NMR δ_{P} (161.89 MHz, D_2O , kwas fosforowy) - 0.73 (s, 1P, ApG), -11.43- (-11.75) (m, 2P, $\text{P}\alpha$, Py), -22.88 (t, $J = 18.75$, 1P, $\text{P}\beta$); HRMS (ESI-) obliczone dla $[\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_4]^-$ 1211.16535; m/z zmierzone 1211.16549

V.4.7.9 Synteza $\text{m}^7\text{GpppOCH}_2\text{-tr-AmpG}$ (8)

Związek $\text{m}^7\text{GpppOCH}_2\text{-tr-AmpG}$ (8) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'- N_3AmpG (12b) (9.4 μmol , 1 ekw., 300 μl H_2O), $\text{m}^7\text{GpppOC}_3\text{H}_3$ (16) (15.8 μmol , 1.7 ekw., 100 μl TEA/ CH_3COOH , pH 7.5), CuSO_4 (1 μmol , 0.4 ekw., 1.4 μl) oraz



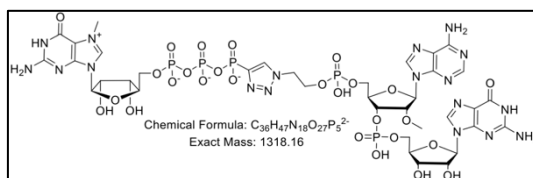
AscNa (25 μmol , 10 ekw., 25 μl). Reakcję prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po 1 h zakończono dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór Na_2EDTA (18.8 μmol , 2 ekw., 150 μl). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz

RP HPLC ([metoda D](#), [Tabela 10](#)). Związek $m^7GpppOCH_2-tr-AmpG$ otrzymano z wydajnością 45% w postaci soli amonowej.

1H NMR (399.90 MHz; D_2O ; TSP) δ_H 9.14 (s, 1H, H8 m^7G), 8.18 (s, 1H, H8), 8.11 (s, 1H, H8), 7.95 (s, 1H, C2), 7.83 (s, 1H, Htriazol), 6.05 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H1'), 5.97 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H1'), 5.81 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H1'), 5.14-5.07 (m, 1H, H3'), 4.88 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.66 (dd, 1H, $J_1=4.9$; $J_2=3.7$ Hz, H2'), 4.60 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H, H3'), 4.53-4.46 (m, 4H, H2' i H4'), 4.40-4.32 (m, 3H, H5' i H5''), 4.31- 4.13 (m, 3H, H5' and H5''), 4.05 (s, 3H, CH_3 m^7G), 3.51 (s, 3H, CH_3 , 2'O- Me); ^{31}P NMR δ_P (161.89 MHz, D_2O , kwas fosforowy) -0.11 (m, 1P, 3'P), -10.69 (d, $J = 18.8$ Hz, 1P, P α lub P γ) and -10.89 (d, $J = 18.3$ Hz, 1P, P α lub P γ), -22.87 (dd, $J = 18.8$ i $J = 18.3$ Hz, 1P, P β); HRMS(ESI-) obliczone dla $[C_{35}H_{45}N_{18}O_{24}P_4]^-$ 1225.18100; m/z zmierzone 1225.18098

V.4.7.10 Synteza $m^7Gppp-tr-C_2H_4AmpG$ (9)

Związek $m^7Gppp-tr-C_2H_4-AmpG$ (9) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃-C₂H₄pAmpG (12c) (5.75 μ mol, 1 ekw., 100 μ l H_2O), m^7GpppC_2H (13) (5.75 μ mol, 1 ekw., 100 μ l

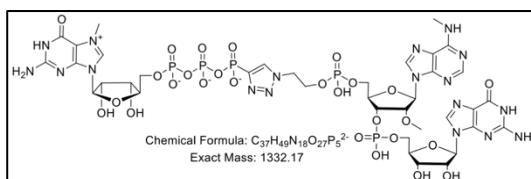


TEA/ CH_3COOH , pH 7.5), $CuSO_4$ (1.15 μ mol, 0.2 ekw., 10 μ l) oraz AscNa (57.5 μ mol, 10 ekw., 25 μ l). Reakcję prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po 1 h zakończono dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór Na_2EDTA (5.75 μ mol, 1 ekw., 500 μ l). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC ([metoda D](#), [Tabela 10](#)). Związek $m^7Gppp-tr-C_2H_4-AmpG$ (9) otrzymano z wydajnością 42.2% w postaci soli amonowej.

1H NMR (500.24 MHz; D_2O ; TSP) δ_H 9.12 (s, 1H, H8 m^7G), 8.38 (s, 1H, H8), 8.26 (s, 1H, H8), 8.21 (s, 1H, H2), 7.97 (s, 1H, Htriazol), 6.05 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H1'), 5.96 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H1'), 4.94 (dt, $J = 8.3$ and $J = 4.4$ Hz, 1H, H3'), 4.61 (dd, $J = 4.8$ i $J = 3.6$ Hz, 1H, H1'), 4.56 (q, 2H), 4.53- 4.49 (m, 2H), 4.47 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.44- 4.38 (m, 1H), 4.37- 4.31 (m, 2H); ^{31}P NMR: δ_P (202.53 MHz; D_2O ; H_3PO_4) δ_P -0.36 (1P, s), -0.93 (1P, s), -7.46 (1P, d, $J = 21.6$, P α lub P γ), -11.45 (1P, d, $J = 17.5$, P α lub P γ), -23.14 (1P, t, $J = 20.3$, P β)

V.4.7.11 Synteza $m^7Gppp-tr-C_2H_4p^{m6}AmpG$ (9a)

Związek $m^7Gppp-tr-C_2H_4p^{m6}AmpG$ (9a) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃-C₂H₄p^{m6}AmpG (12e) (25 μ mol, 1 ekw., 300 μ l), $m^7Gppp-C_2H$ (13) (40 μ mol, 1.6 ekw., 300 μ l), $CuSO_4$ (6.25 μ mol, 0.25 ekw., 50 μ l), AscNa (250 μ mol, 10 ekw., 300 μ l). Reakcję prowadzono przez 2.5 h w 30 °C. Po 2.5 h reakcję zakończono dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny

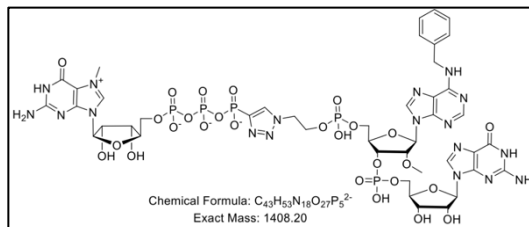


roztwór Na₂EDTA (62.5 µmol, 2.5 ekw., 1 ml). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10) otrzymując związek m⁷Gppp-tr-C₂H₄p^{m6}AmpG z wydajnością 50% w postaci soli amonowej.

¹H NMR (500.24 MHz, D₂O, TSP) δ 9.15 (s, 1H, H8 m⁷G), 8.35 (s, 1H, H8), 8.26 (s, 1H, H8), 8.23 (s, 1H, H2), 7.98 (s, 1H, Htriazol), 6.05 (d, J = 5.1, 1H, H1'), 5.96 (d, J = 3.6, 1H, H1'), 5.84 (d, J = 5.5, 1H, H1'), 4.97 – 4.91 (m, 1H), 4.62 (dd, J = 4.2 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.49 (dt, J = 9.4, 4.8 Hz, 3H), 4.43 – 4.38 (m, 1H), 4.37 – 4.31 (m, 2H), 4.29 – 4.21 (m, 1H), 4.23 – 4.14 (m, 2H), 4.05 (s, 3H, CH₃ m⁷G), 4.03 – 3.97 (m, 1H), 3.97 – 3.90 (m, 1H), 3.48 (s, 3H, CH₃, 2'OMe), 3.18 (s, 3H, m6A); ³¹P NMR: δ_P (202.53 MHz; D₂O; H₃PO₄) δ_P -0.30 (1P, s), -0.94 (1P, s), -7.63 (1P, d, J = 22.14, Pα lub Pγ), -11.52 (1P, d, J = 19.04, Pα lub Pγ), -23.34 (1P, t, J = 20.71, Pβ); HRMS (ESI -) obliczone dla [C₃₇H₅₀N₁₈O₂₇P₅]⁻ 1333.1789 m/z; znalezione 1333.17989

V.4.7.12 Synteza m⁷Gppp-tr-C₂H₄p^{Bn6}AmpG (9b)

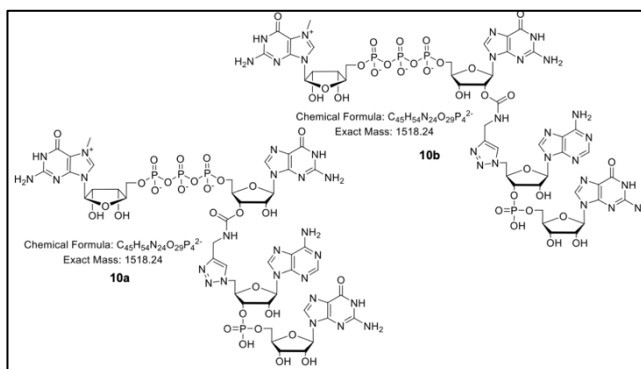
Związek m⁷Gppp-tr-C₂H₄p^{Bn6}AmpG (9b) zsyntezowano według ogólnej procedury G stosując 5'-N₃-C₂H₄p^{Bn6}AmpG (12f) (37 µmol, 1 ekw., 300 µl), m⁷Gppp-C₂H (13) (57 µmol, 1.55 ekw., 300 µl), CuSO₄ (12.8 µmol, 0.35 ekw., 50 µl),



AscNa (370 µmol, 10 ekw., 50 µl). Reakcję prowadzono przez 1 h 15 min w 37 °C. Po 1 h 15 min reakcję zakończono dodając do mieszaniny reakcyjnej wodny roztwór Na₂EDTA (45 µmol, 1.2 ekw., 1 ml). Otrzymany związek oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10) otrzymując związek m⁷Gppp-tr-C₂H₄p^{Bn6}AmpG (9b) z wydajnością 41% w postaci soli amonowej. ¹H NMR (500.24 MHz, D₂O, TSP) δ_H 9.10 (s, 1H, H8 m⁷G), 8.37 (s, 1H, H8), 8.24 (s, 1H, H8), 8.20 (s, 1H, H2), 8.02 (s, 1H, Htriazol), 7.31 – 7.17 (m, 5H, H aromatyczne), 6.05 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H1'), 5.92 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1'), 5.84 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H1'), 4.95 (dt, J = 8.3, 4.3 Hz, 1H), 4.57 (dd, J = 4.8, 3.6 Hz, 1H), 4.50 (dt, J = 9.6, 5.1 Hz, 4H), 4.46 – 4.38 (m, 2H), 4.32 (ddq, J = 15.0, 5.4, 2.3 Hz, 3H), 4.27 – 4.08 (m, 4H), 4.05 – 3.97 (m, 1H), 3.94 – 3.87 (m, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.47 (s, 3H, CH₃, 2'OMe); ³¹P NMR: δ_P (202.53 MHz; D₂O; H₃PO₄) δ_P -0.40 (1P, s), -0.90 (1P, s), -7.51 (1P, d, J = 21.9, Pα lub Pγ), -11.49 (1P, d, J = 19.0, Pα lub Pγ), -23.21 (1P, t, J = 20.56, Pβ); HRMS (ESI -) obliczone dla [C₄₃H₅₃N₁₈O₂₇P₅]⁻ 1409.2099 m/z; znalezione 1409.21090

V.4.7.13 Synteza m⁷GpppG-(2' i 3')O-karb-CH₂-tr-ApG (10a i 10b)

5'-N₃ApG (**12a**) (34 μmol, 1 ekw.) rozpuszczono w 200 μl H₂O MQ i wymieszano ze 100 μl wodnego roztworu m⁷GpppG_{Ly3} (mieszanina izomerów 2' i 3') (34 μmol, 1 ekw.). Po 10 min inkubacji w temperaturze pokojowej dodano wodnego roztworu CuSO₄ (10 μl, 17 μmol, 0.5 ekw.). Reakcję rozpoczęto poprzez



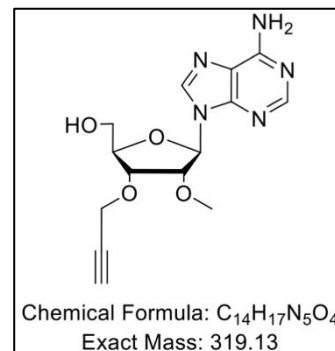
dodanie do mieszaniny reakcyjnej wodnego roztworu AscNa (340 μmol, 10 ekw., 100 μl). Reakcję prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej, po czym zakończono ją poprzez rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej wodnym roztworem Na₂EDTA (51 μmol, 1.5 ekw., 500 μl). W wyniku reakcji otrzymano dwa izomery (2' i 3'), które rozdzielono za pomocą RP HPLC (metoda D, Tabela 10). Struktury otrzymanych izomerów potwierdzono za pomocą NMR oraz HRMS. **10a**: ¹H NMR: δ_H (500.24 MHz; D₂O; TSP) 9.02 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 5.88–5.86 (m, 3H), 5.83 (1H, d, J = 4.2), 5.72 (1H, d, J = 4.1), 5.44 (1H, t, J = 5.5), 4.76–4.68 (5H, m), 4.65 (1H, t, J = 5.1), 4.62–4.54 (6H, m), 4.52 (1H, d, J = 5.6), 4.49 (1H, d, J = 4.9), 4.45 (2H, t, J = 5.0), 4.41–4.21 (15H, m), 4.20–4.11 (3H, m), 4.03 (s, 3H). ³¹P NMR: δ_P (202.53 MHz; D₂O; H₃PO₄) 0.16 (1P, d, J = 9.5, Pα), -10.58 (2P, dd, J = 19.4, 12.0, 3' P oraz Pγ), -22.11 (1P, t, J = 19.3, Pβ).

10b: ¹H NMR: δ_H (500.24 MHz; D₂O; TSP) 9.05 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.01 (1H, s), 7.96 (2H, s), 7.92 (1H, s), 7.72 (1H, s), 5.93 (1H, d, J = 3.0), 5.88 (1H, d, J = 3.5), 5.80 (1H, d, J = 4.7), 5.73 (1H, d, J = 7.2), 5.25 (1H, t, J = 10.8), 4.74 (1H, d, J = 3.0), 4.72–4.65 (4H, m), 4.57 (3H, dd, J = 8.1, 5.0), 4.49 (1H, t, J = 5.3), 4.45 (2H, t, J = 5.2), 4.43–4.15 (12H, m), 4.02 (3H, s). ³¹P NMR: δ_P (202.53 MHz; D₂O; H₃PO₄) δ_P 0.23 (1P, d, J = 10.6, Pα), -10.54 (2H, dd, J = 19.3, 11.3, 3'P oraz Pγ), -21.99 (1P, t, J = 19.2). HRMS (ESI⁻) obliczone dla [C₃₅H₄₅N₁₈O₂₄P₄²⁻] 759.1225; m/z zalezione 759.1229 (**10a**), 759.1225 (**10b**).

V.4.7.14 Synteza m⁷GpppA_m-3'-O-CH₂-tr-G

V.4.7.14.1 Synteza 2'-OMe-3'-OC₃H₃ adenozyiny (18)

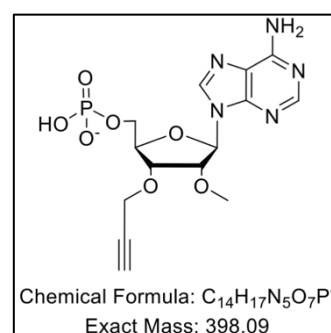
2'-OMe-adenozyinę zakupioną w TCI Chemicals (7 mmol, 1 ekw.) zawieszono w bezwodnym DMF (78 ml). Zawiesinę podgrzano do 50 °C w celu rozpuszczania substratu, a następnie całość schłodzono w łaźni lodowej. Po schłodzeniu mieszaniny reakcyjnej, do kolby dodano NaH (14 mmol, 2 ekw.) oraz TBAI (1.4 mmol, 0.2 ekw.). Po czym wkroplono bromek propargilu (roztwór w toluenie) (8.4 mmol, 1.2 ekw., 1.32 ml). Mieszaninę reakcyjną stopniowo podgrzewano do 55 °C. Po podgrzaniu mieszaninę reakcyjną mieszano przez 8 h. Po 8 h konwersja substratu w produkt zatrzymała się i wyniosła 40%. Reakcję zakończono poprzez odparowanie rozpuszczalników do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, za pomocą wyparki wolnoobrotowej. Otrzymany związek oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej ze złożem krzemionkowym. Elucję prowadzono w gradiencie liniowym (0-7% metanolu w DCM). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowano do sucha otrzymując 2'-OMe-3'-OC₃H₃ adenozyinę w postaci żółtego proszku z wydajnością 9%.



¹H NMR (399.90 MHz; DMSO; TSP) δ_H H: 8.39 (s, 1H, ade), 8.14 (s, 1H, ade), 7.39 (s, 2H, Ade NH₂), 6.01 (d, 1H, J= 6.4, H1'), 5.56 (dd, 1H, J1= 7.0, J2= 4.7, H4'), 4.56 (dd, 1H, J1= 6.4, J2= 4.9, H2'), 4.36 (dd, 1H, J1= 4.9, J2= 2.8, H3'), 4.33 (t, 2H, J=2.2), 4.16 (q, 1H, J= 3.3, H4'), 3.70 (ddd, 1H, J=12.1, J= 4.7, J= 3.7, H5'), 3.58 (ddd, 1H, J1= 12.1, J2= 7.0, J3= 3.4, H5''), 3.51 (t, 1H, J= 2.4), 3.31 (s, 3H, 2'-O- Me)

V.4.7.14.2 Synteza 5'-monofosforanu 2'-OMe-3'-OC₃H₃ adenozyiny (19)

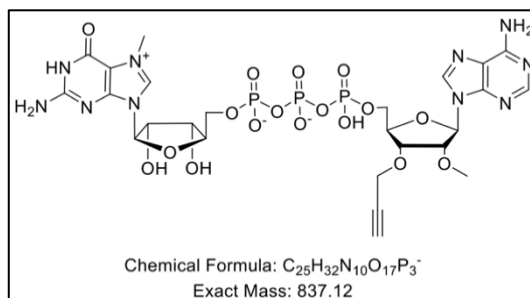
2'-OMe-3'-OC₃H₃ adenozyinę (0.28 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w bezwodnym fosforanie trimetylu (1.4 ml). Otrzymany roztwór schłodzono do 0 °C w łaźni lodowej, po czym wkroplono POCl₃ (1.1 mmol, 3 ekw., 0.1 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w 0 °C przez 2 h. Po 2 h reakcji produkt przejściowy jakim był 5'-dichlorofosforan 2'-OMe-3'-OC₃H₃ adenozyiny wytrącono z mieszaniny reakcyjnej za pomocą zimnego DCM. Otrzymany osad przemyto 3-krotnie zimnym DCM, a następnie ponownie rozpuszczono go w wodzie. Otrzymany wodny roztwór 5'-monofosforanu 2'-OMe-3'-OC₃H₃ adenozyiny doprowadzono do pH 7 za pomocą 1M NaHCO₃. Końcowy produkt oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii cieczowej z złożem DEAE Sephadex A-25 w formie HCO₃⁻. 5'-monofosforan 2'-OMe-3'-OC₃H₃ adenozyiny otrzymano w postaci soli TEAH⁺ z wydajnością 36%.



^1H NMR (500.24 MHz; D_2O ; TSP) δ_{H} (s, 1H, ade), 8.26 (s, 1H, ade), 6.20 (d, 1H, $J = 5.7$, $\text{H1}'$), 4.67- 4.61 (m, 2H, $\text{H2}'$ i $\text{H3}'$), 4.56-4.53 (m, 1H, $\text{H4}'$), 4.45 (dd, 1H, $J = 16.0$, $J = 2.4$, CH_2), 4.41 (dd, 1H, $J = 16.0$, $J = 2.4$, CH_2), 3.51 (q, 1H, $J = 7.27$, rozpuszczalnik), 3.47 (s, 3H, $2'\text{-O-Me}$), 3.20 (q, 7H, $J = 7.3$, TEA), 2.96 (t, 1H, $J = 2.4$, C_3H_3); ^{31}P NMR δ_{P} (161.89 MHz, D_2O , kwas fosforowy) δ_{P} 2.0 (s, 1P); HRMS (ESI-) obliczone dla $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}]$ 398.0871; m/z zmierzone: 398.08723

V.4.7.14.3 Synteza $\text{m}^7\text{GpppA}_m\text{-3'-OC}_3\text{H}_3$ (20)

5'-monofosforan 2'-O-metylo-3'-O-propargiloadenozyny (19) (46 μmol , 1 ekw.) oraz $\text{m}^7\text{GDP-lm}$ (92 μmol , 2 ekw.) rozpuszczono w bezwodnym DMSO (350 μl). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano bezwodny ZnCl_2 (460 μmol , 10 ekw.). Reakcję prowadzono przez 2

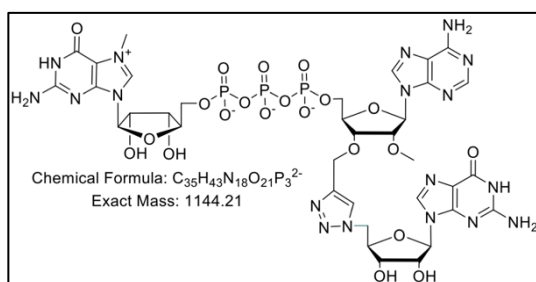


h w temperaturze pokojowej. Po 2 h reakcję zakończono rozcieńczając 4-krotnie mieszaninę reakcyjną wodnym roztworem $\text{Na}_2\text{EDTA}/\text{NaHCO}_3$ (20/10 mg/ml). Związek końcowy oczyszczono za pomocą jonowymiennej chromatografii cieczerwowej z złożem *DEAE Sephadex A-25* w formie HCO_3^- oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10).

^1H NMR (500.24 MHz; D_2O ; TSP) δ_{H} 9.05 (s, 1H, C8 m^7G), 8.46 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.09 (d, 1H, $J = 6.2$, $\text{H1}'$) 5.90 (d, 1H, $J = 3.8$, $\text{H1}'$), 4.62 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$, $J_2 = 3.3$), 4.57-4.52 (m, 3H, $\text{H2}'$ i $\text{H3}'$), 4.49- 4.41 (m, 3H), 4.41-4.35 (m, 2H), 4.33- 4.22 (m, 3H), 4.05 (s, 3H, CH_3 , m^7G), 3.42 (s, 3H, $2'\text{-O-Me}$), 2.96 (t, 1H, $J = 2.4$, CH); ^{31}P NMR (161.89 MHz, D_2O , kwas fosforowy) δ_{P} -10.89 (dd, 2P, $J = 19.3$, $J = 13.3$, $\text{P}\alpha$ and $\text{P}\gamma$), -22.44 (t, 1P, $J = 19.3$, $\text{P}\beta$); HRMS (ESI-) obliczone dla $[\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_3^-]$ 837.1165; m/z zmierzone: 837.11659

V.4.7.15 Synteza $\text{m}^7\text{GpppA}_m\text{-3'-OCH}_2\text{-tr-G}$ (11)

$\text{m}^7\text{GpppA}_m\text{-3'-OC}_3\text{H}_3$ (20) (11 μmol , 1 ekw.) rozpuszczono w 150 μl H_2O MQ. Następnie dodano 5'- N_3G (11 μmol , 1 ekw.) rozpuszczone w 50 μl DMSO. Tak otrzymaną mieszaninę mieszano przez 10 min w temperaturze pokojowej,



po czym dodano wodny roztwór CuSO_4 (3.3 μmol , 0.3 ekw., 10 μl) oraz AscNa (110 μmol , 10 ekw.) rozpuszczony w 50 μl H_2O MQ. Reakcję prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po 1 h, reakcję zakończono rozcieńczając mieszaninę reakcyjną wodnym roztworem Na_2EDTA (11 μmol , 1 ekw., 500 μl). Produkt końcowy wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą jonowymiennej chromatografii

cieczowej z złożem DEAE Sephadex A-25 w formie HCO_3^- oraz RP HPLC (metoda D, Tabela 10), otrzymując związek (**11**) w postaci soli amonowej z wydajnością 62%.

^1H NMR δ_{H} (500.24 MHz; D_2O ; TSP) δ 9.11 (s, 1H, H8 $m^7\text{G}$), 8.42 (s, 1H, H8), 8.26 (s, 1H, H8), 7.93 (s, 1H, H2), 7.55 (s, 1H, Htriazol), 6.06 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H1'), 5.89 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H1'), 5.76 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H1'), 4.85 (dd, $J = 6.2$ and $J = 2.8$ Hz, 2H), 4.76, 4.72-4.69 (m, 1H, H2'), 4.62- 4.57 (m, 2H, H2' and), 4.52 (t, $J = 5.3$ and $J = 5.1$ Hz, 1H, H4'), 4.46- 4.43 (m, 4 H), 4.41 (dd, $J = 4.1$ and $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.38- 4.33 (m, 2H), 4.30- 4.23 (m, 3H), 4.02 (s, 3H, $\text{CH}_3 m^7\text{G}$), 3.25 (s, 3H, $\text{CH}_3 2'\text{O}-\text{Me}$); ^{31}P NMR δ_{P} (161.89 MHz, D_2O , kwas fosforowy): - 0.74 (s, 1P, ApG), -7.94 (d, $J = 22.2$ Hz), -11.49 (d, $J = 19.1$ Hz), -23.32 (t, $J = 20.6$ Hz, 1P, P β); HRMS (ESI-) obliczone dla $[\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{N}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_4]^-$ 1145.2147; m/z zmierzone: 1145.21536

V.4.8 Badania biochemiczne i biologiczne

V.4.8.1 Badanie aktywności enzymu cN-IIIA i cN-IIIB przy użyciu kolorymetrii

Do badania aktywności enzymu cN-IIIB wykorzystano analizę kolorymetryczną przy użyciu analizy zielną malachitową, za pomocą, której wykrywano i oznaczano ilość uwolnionego nieorganicznego fosforanu podczas reakcji enzymatycznej. Analizę zielenią malachitową przeprowadzono przy użyciu Malachite Green Phosphate (MGP) Assay Kit zakupionego w firmie Sigma-Aldrich. Ilość uwolnionego fosforanu oznaczano mierząc wartość absorpcji przy długości fali 620 nm. Pomiary absorpcji wykonywano na 96-dołkowych płytkach (96-well, clear, non-binding assay plates (Greiner)) przy użyciu czytnika mikropłytek Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek.

V.4.8.2 Podatność na hydrolizę enzymatyczną benzylowych analogów $m^7\text{GMP}$

Reakcje hydrolizy enzymatycznej przeprowadzono w 96-dołkowej płytce w obecności 100 μM $m^7\text{GMP}$ (substratu), 100 μM badanego związku (inhibitora) oraz 40 nM enzymu cN-IIIA lub 80 nM enzymu cN-IIIB. Reakcje prowadzono w roztworze buforowym 20 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 w 30 °C przy mieszaniu 300 RPM. Końcowa objętość reakcji wynosiła 80 μl . Badane związki wraz z enzymem inkubowano przez 45 min w przypadku enzymu cN-IIIB oraz 25 min w przypadku enzymu cN-IIIA, po czym reakcje zakończono dodając do każdej z nich 20 μl odczynnika zawierającego zieleń malachitową oraz molibden (Malachite Green Phosphate Reagent). Po zatrzymaniu reakcji, próbki inkubowano przez 25 min, a następnie zmierzono wartość absorpcji przy 620 nm za pomocą czytnika mikropłytek, w celu skwantyfikowania ilości uwolnionego nieorganicznego fosforanu w czasie reakcji.

V.4.8.2.1 Inhibicja enzymu cN-IIIA i cN-IIIB

Reakcje inhibicji prowadzono w 96-dołkowej płytce w obecności 100 μM potencjalnego inhibitora, 100 μM $m^7\text{GMP}$ (substratu enzymu) oraz enzymu cN-IIIA (40 nM) lub cN-IIIB (80 nM). Reakcje inhibicji prowadzono w roztworze buforowym 20 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM

KCl oraz 5 mM MgCl₂ w 30 °C przy mieszaniu 300 RPM. Reakcje zakończono po 25 min (cN-IIIA) lub 45 min (cN-IIIB) poprzez rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej 20 µl odczynnika zawierającego zieleń malachitową oraz molibden (Malachite Green Phosphate Reagent). Po zakończeniu reakcji, próbki inkubowane przez dodatkowe 25 min, a następnie zmierzono wartość absorpcji przy długości fali 620 nm w celu skwantyfikowania ilości uwolnionego nieorganicznego fosforanu w czasie reakcji.

V.4.8.3 Wyznaczanie wartości parametru IC₅₀ względem enzymu cN-IIIBz

Wartość parametru IC₅₀ wyznaczono w 96-dołkowej płytce w obecności 40 nM enzymu cN-IIIA lub 80 nM enzymu cN-IIIB, 100 µM m⁷GMP oraz 12 różnych stężeń inhibitora, przygotowanych metodą połowicznych rozcieńczeń. Początkowe stężenie inhibitora wynosiły 1000, 500 lub 250 µM w zależności od potencjału inhibitorowego danego związku (oszacowanego na podstawie eksperymentu ze stałym stężeniem inhibitora w reakcji). Reakcje inhibicji prowadzono w roztworze buforowym 20 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM KCl oraz 5 mM MgCl₂ w 30 °C przy mieszaniu 300 RPM. Reakcje rozpoczęto dodając do każdego dołka, wcześniej preinkubowany enzym – 15 min, 30 °C. W przypadku związków typu SuFEX, inhibitor preinkubowano przez 45 min z enzymem cN-IIIB, po czym reakcje rozpoczynano dodając do każdego dołka substrat – m⁷GMP. Reakcje zakończono po 25 min (cN-IIIA) lub 45 min (cN-IIIB) poprzez rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej 20 µl odczynnika zawierającego zieleń malachitową oraz molibden (Malachite Green Phosphate Reagent). Po zakończeniu reakcji, próbki inkubowane przez dodatkowe 25 min, a następnie zmierzono wartość absorpcji przy długości fali 620 nm w celu skwantyfikowania ilości uwolnionego nieorganicznego fosforanu w czasie reakcji. Otrzymane wyniki przedstawiono na wykresie zależności ilości uwolnionego nieorganicznego fosforanu (oś OY) od stężenie inhibitora (oś OX). Wartość parametru IC₅₀ wyznaczono poprzez dopasowanie do otrzymanych punktów krzywej opisanej równaniem:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \frac{x}{IC_{50}}}$$

Gdzie A₁ to dolna asymptota, A₂ górna asymptota, x to stężenie inhibitora, y to odpowiedź układu (stężenie uwolnionego fosforanu, Abs₆₂₀).

Badanie selektywności inhibitorów enzymu cN-IIIB względem białka eIF4E

Do wyznaczenia selektywności inhibitorów enzymu cN-IIIB względem białka eIF4E wykorzystano metodę fluorescencyjną opracowaną przez Kasprzyk i wsp.¹¹⁷. W tym celu wykorzystano mysie białko eIF4E zsyntezowane według wcześniejszego protokołu¹¹⁷, oraz piernową sondę fluorescencyjną¹¹⁷. Reakcje prowadzono w 96-dołkowej, czarnej płytce (Grainer). W celu przeprowadzenia reakcji, białko eIF4E (400 nM) inkubowano wraz z sondą

fluorescencyjną (75 nM) oraz inhibitorem (10 rozcieńczeń – rozcieńczenia przygotowano metodą połowicznych rozcieńczeń rozpoczynając od 100 µM) przez 30 min w 30 °C, 300 RPM, w odgazowanym roztworze buforowym 50 mM HEPES, pH 7.2, zawierającym 100 mM KCl oraz 0.5 mM EDTA. Po wstępnej inkubacji, 96-dołkową płytkę umieszczono w czynniku mikropłetek (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek) i mierzono fluorescencje (ex. 345 nm, em. 378 nm) przez 1 h w temperaturze 30 °C. Otrzymane wartości fluorescencji uśredniono i przedstawiono na wykresach zależności intensywności fluorescencji (oś OY) od stężenia inhibitora (oś OX), na których podstawie obliczono wartości parametru EC₅₀. Wartość parametru EC₅₀ wyznaczono poprzez dopasowanie do otrzymanych punktów krzywej opisanej równaniem:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \frac{x}{EC_{50}}}$$

, gdzie A₁ to dolna asymptota, A₂ górna asymptota, x to stężenie inhibitora, y to odpowiedź układu (uśredniona wartość fluorescencji). Wartości EC₅₀ wyznaczono przy użyciu programu GraphPad Prism 9.0. Na podstawie otrzymanych wartości parametru EC₅₀ obliczono stałą inhibicji K_i, wykorzystując w tym celu równanie:

$$K_i = \frac{EC_{50} - [P_t] + [P_L]_{50} \left(\frac{K_D}{[L]_{50}} + 1 \right)}{\frac{[L]_{50}}{K_D} + \frac{[P]_0}{K_D} + 1}$$

, gdzie EC₅₀ to stężenie inhibitora potrzebne do wyparcia 50% sondy z kompleksu z białkiem [P_t] to całkowite stężenie białka, [P_L]₅₀ to stężenie kompleksu białko ligand przy 50% inhibicji, [L]₅₀ to stężenie niezwiązanej sondy przy 50% inhibicji, [P]₀ to stężenie wolnego białka (białka nie będącego w kompleksie).

V.4.9 Przygotowanie matrycy dsDNA – trawienie plazmidu przy użyciu enzymu restrykcyjnego AarI

Plazmid pJET_T7_Gluc kodujący białko lucyferazę *Gaussia* strawiono przy użyciu enzymu restrykcyjnego AarI. W tym celu, do plazmidu (10 µg, 700 ng/µl, 14.2 µl) dodano 50-krotnie stężony bufor (0.8 µl) (Thermo Fisher Scientific, Buffer O, kat. ER1581), 10-krotnie stężony bufor dla enzymu AarI (4 µl) (Thermo Fisher Scientific, kat. ER1581), enzym AarI (8U, 4 µl) (Thermo Fisher Scientific, kat. ER1581) oraz H₂O MQ (17 µl). Reakcję prowadzono przez 18 h w temperaturze 37 °C. Otrzymaną matrycę oczyszczono za pomocą QIAQuick PCR Purification Kit. Jakość otrzymanej matrycy sprawdzono za pomocą 1.2% żelu agarozowego (TBE).

Reakcja transkrypcji *in vitro* (lucyferaza *Gaussia*)

Kapowane mRNA kodujące białko lucyferazę *Gaussia* zsyntezowano za pomocą reakcji transkrypcji *in vitro* (IVT) w obecności polimerazy T7 oraz matrycy dsDNA (uliniowiony plazmid pJET_T7_Gluc). Reakcje IVT prowadzono w objętości 40 μ l. Typowa reakcji IVT zawierała NTP (ATP, UTP, CTP) (2 mM), GTP (0.5 mM), badany analog kapu (3 mM), matrycę dsDNA (40 ng/ μ l), 5-krotnie stężony bufor dla polimerazy T7 (ThermoFisher Scientific) (4 μ l), Ribolock RNase Inhibitor (1 μ l) (ThermoFisher Scientific) oraz polimerazę T7 (0.12 μ g/ μ l). Reakcje IVT prowadzono przez 4 h w temperaturze 37 °C, po czym do reakcji dodano DNase I (Thermo Fisher Scientific) (4 μ l) w celu usunięcia matrycy dsDNA. Po dodaniu do reakcji DNase I, mieszaniny reakcyjne inkubowano przez 30 min w temperaturze 37 °C. Po 4.5 h (IVT + Dnase I) reakcje zakończono poprzez szybkie zamrożenie w ciekłym azocie. Otrzymane kapowane mRNA oczyszczono za pomocą NucleoSpin RNA Clean-up XS kit (Macherey-Nagel). Jakość otrzymanych mRNA sprawdzono za pomocą 1.2% żelu agarozowego (TBE).

V.4.10 Wyznaczanie wydajności translacji kapowanych mRNA w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych

V.4.10.1 Reakcja translacji *in vitro* w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych

Reakcje translacji *in vitro* przeprowadzono przy użyciu zsyntezowanych kapowanych mRNA, w lizatach komórkowych z retikulocytów króliczych (Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL) System Promega). Typowa reakcja translacji *in vitro* (10 μ l) zawierała: lizat komórkowy RRL (4 μ l), mieszaninę aminokwasów (dostarczoną przez producenta 2x 0.05 μ l), 1M octan potasu (1.9 μ l), 25 mM MgCl₂ (0.4 μ l), Ribolock Rnase Inhibitor (Thermo Fisher) (0.2 μ l), H₂O MQ (2.4 μ l) oraz kapowane mRNA w czterech różnych stężeniach – w zależności od mRNA (1 μ l). Reakcje translacji *in vitro* przeprowadzono w następujących warunkach: roztwór RRL zawierający wszystkie niezbędne komponenty reakcji, z wyjątkiem mRNA, inkubowano przez 1 h w 30 °C w łaźni wodnej. Po 1 h inkubacji, RRL umieszczono na lodzie i dodano mRNA (1 μ l). Po dodaniu mRNA, próbki inkubowano przez 1 h w 30 °C w łaźni lodowej. Reakcje zakończono poprzez szybkie zamrożenie próbek w ciekłym azocie.

V.4.10.2 Wyznaczenie wydajności translacji mRNA

Wydajność translacji dla kapowanych mRNA wyznaczono poprzez pomiar chemiluminescencji pochodzącej od zsyntezowanej lucyferazy *Gaussia* podczas reakcji translacji *in vitro* w RRL. W celu zmierzenia wartości chemiluminescencji, próbki z RRL po translacji *in vitro*, zamrożone w ciekłym azocie, rozmrożono i przeniesiono na 96-dołkową, białą płytkę. Płytkę z próbkami umieszczono w czynniku płytek (Synergy H1 (BioTek) Microplate Reader) i zmierzono poziom chemiluminescencji, po uprzednim dodaniu substratu dla białka lucyferaz *Gaussia* – kolentrazyny (Promega) (10 ng/ml, 50 μ l, w PBS). Otrzymane wartości chemiluminescencji przedstawiono jako liniową zależność intensywności chemiluminescencji od stężenia mRNA.

Na podstawie otrzymanych wykresów liniowych obliczono współczynniki kierunkowe, które odpowiadały wydajności translacji mRNA. Wszystkie otrzymane wartości ujednolicono poprzez znormalizowanie wydajności translacji do wydajności translacji uzyskanej dla mRNA kapowanego kapem ARCA.

V.4.11 Wyznaczenie stałej dysocjacji dla triazolowych trinukleotydowych analogów kapu względem białka eIF4E

Stałą dysocjacji dla triazolowych trinukleotydowych analogów kapu względem białka eIF4E wyznaczono przy użyciu metody wygaszania fluorescencji (*ang. Fluorescent Quenching Titration, FQT*). 0.1 μ M roztwór białka eIF4E w roztworze buforowym 50 mM HEPES/KOH, pH 7.2, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT inkubowano przez 45 min w 20 °C w kwarcowej kuwecie. Po inkubacji roztwór białka miareczkowano badanym analogiem kapu, dodając do kuwety 1 μ l analogu kapu o stężeniu (2, 1, 0.5 mM oraz 200, 100, 50, 20, 10 5 μ M) mierząc fluorescencję przez 1 min, po każdym dodaniu porcji mRNA. Pomiary fluorescencji wykonano przy długości fali wzbudzenia 280 nm (szerokość szczeliny 5 nm) obserwując emisję przy długości fali 337 nm (szerokość szczeliny 10 nm). Stałą dysocjacji obliczono poprzez dopasowanie do otrzymanych punktów krzywej o równaniu opisanym wcześniej w literaturze (Niedźwiedzka i wsp.)¹⁹³. Stałe dysocjacji K_D (K_{AS}^{-1}) przedstawiono jako średnią ważoną z trzech powtórzeń technicznych.

VI Wykaz skrótów

Kap (czapeczka) – *ang. cap*, 7-metyloguanozyna połączona mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem. Zakończenie końca 5' eukariotycznego mRNA

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

RNA – kwas rybonukleinowy

mRNA – *ang. Messenger RNA*, matrycowe RNA

UTR – *ang. untranslated region*, część sekwencji mRNA nie ulegająca translacji

AscNa – askorbinian sodu

EDTA – kwas wersenowy

TBDMS – tertbutyl dimetylsilil

DMTr – grupa dimetoksy trytylowa

TBAB – bromek tertbutyloaminy

POCl₃ – trichlorek fosforu

TEA – trietyloamina

Im – imidazol

DTDP – ditiodipirydyna

eIF4E – eukariotyczny czynnik inicjujący translację

cN – cytozolowa nukleotydaza

ARCA – *ang. Anti-reverse cap analog*

HEPES - kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy

NMR – *ang. Nuclear Magnetic Resonance*, MRJ – magnetyczny rezonans jądrowy

HRMS – *ang. High resolution mass spectrometry*, wysokorodzielcza spektrometria mas

CPG – *ang. Controlled Pore Glass*

ATP, GTP, UTP, CTP – 5'-trifosforan adenozy, guanozy, urydyny, cytozyny

m⁷G – 7-metyloguanozyna

A_m – 2'-O-metyloadenozy

m⁶A_m – N6-metylo-2'-O-metyloadenozy

Bn⁶A_m – N6-benzylo-2'-O-metyloadenozy

VII Literatura

- (1) *Disorders of Nucleotide Metabolism* , bookTitle= *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*; Springer International Publishing, 2022. DOI: 10.1007/978-3-030-67727-5_14.
- (2) Jeremy M. Berg , J. L. T., Gregory J. Gatto jr. , Lubert Stryer. Stryer Biochemie. In *Stryer Biochemie*, 4 ed.; PWN, 2003; pp 896-926.
- (3) Lykke-Andersen, S.; Jensen, T. H. Overlapping pathways dictate termination of RNA polymerase II transcription. *Biochimie* **2007**, *89* (10), 1177-1182, Article. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.05.007.
- (4) Mars, J. C.; Ghram, M.; Culjkovic-Kraljacic, B.; Borden, K. L. B. The Cap-Binding Complex CBC and the Eukaryotic Translation Factor eIF4E: Co-Conspirators in Cap-Dependent RNA Maturation and Translation. *Cancers* **2021**, *13* (24), 23, Review. DOI: 10.3390/cancers13246185.
- (5) Ghosh, A.; Lima, C. D. Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* **2010**, *1* (1), 152-172, Review. DOI: 10.1002/wrna.19.
- (6) Toyama, R.; Mizumoto, K.; Nakahara, Y.; Tatsuno, T.; Kaziro, Y. MECHANISM OF THE MESSENGER-RNA GUANYLYLTRANSFERASE REACTION - ISOLATION OF N-EPSILON-PHOSPHOLYSINE AND GMP (5'- N-EPSILON) LYSINE FROM THE GUANYLYL-ENZYME INTERMEDIATE. *Embo Journal* **1983**, *2* (12), 2195-2201, Article. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1983.tb01723.x.
- (7) Wang, J.; Chew, B. L. A.; Lai, Y.; Dong, H. P.; Xu, L.; Balamkundu, S.; Cai, W. M.; Cui, L.; Liu, C. F.; Fu, X. Y.; et al. Quantifying the RNA cap epitranscriptome reveals novel caps in cellular and viral RNA. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47* (20), 16, Article. DOI: 10.1093/nar/gkz751.
- (8) Sikorski, P. J.; Warminski, M.; Kubacka, D.; Ratajczak, T.; Nowis, D.; Kowalska, J.; Jemielity, J. The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48* (4), 1607-1626, Article. DOI: 10.1093/nar/gkaa032.
- (9) 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, Article. DOI: 10.1093/nar/gkr038.
- (10) Pan, T. N6-methyl-adenosine modification in messenger and long non-coding RNA. *Trends in Biochemical Sciences* **2013**, *38* (4), 204-209, Review. DOI: 10.1016/j.tibs.2012.12.006.
- (11) Lee, Y.; Choe, J.; Park, O. H.; Kim, Y. K. Molecular Mechanisms Driving mRNA Degradation by m(6)A Modification. *Trends in Genetics* **2020**, *36* (3), 177-188, Review. DOI: 10.1016/j.tig.2019.12.007.
- (12) Akichika, S.; Hirano, S.; Shichino, Y.; Suzuki, T.; Nishimasu, H.; Ishitani, R.; Sugita, A.; Hirose, Y.; Iwasaki, S.; Nureki, O. Cap-specific terminal N-6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science* **2019**, *363* (6423), 141-141, Article. DOI: 10.1126/science.aav0080.
- (13) Mauer, J.; Luo, X. B.; Blanjoie, A.; Jiao, X. F.; Grozhik, A. V.; Patil, D. P.; Linder, B.; Pickering, B. F.; Vasseur, J. J.; Chen, Q. Y.; et al. Reversible methylation of m(6)A(m) in the 5

' cap controls mRNA stability. *Nature* **2017**, 541 (7637), 371-+, Article. DOI: 10.1038/nature21022.

(14) Drazkowska, K.; Tomecki, R.; Warminski, M.; Baran, N.; Cysewski, D.; Depaix, A.; Kasprzyk, R.; Kowalska, J.; Jemielity, J.; Sikorski, P. J. 2'-O-Methylation of the second transcribed nucleotide within the mRNA 5' cap impacts the protein production level in a cell-specific manner and contributes to RNA immune evasion. *Nucleic Acids Research* **2022**, 50 (16), 9051-9071. DOI: 10.1093/nar/gkac722.

(15) Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition; 2002.

(16) Revel, M.; Groner, Y. POST-TRANSCRIPTIONAL AND TRANSLATIONAL CONTROLS OF GENE-EXPRESSION IN EUKARYOTES. *Annual Review of Biochemistry* **1978**, 47, 1079-1126, Review. DOI: 10.1146/annurev.bi.47.070178.005243.

(17) Proudfoot, N. J.; Furger, A.; Dye, M. J. Integrating rRNA processing with transcription. *Cell* **2002**, 108 (4), 501-512, Review. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00617-7.

(18) Shi, Y. S.; Manley, J. L. The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes & Development* **2015**, 29 (9), 889-897, Review. DOI: 10.1101/gad.261974.115.

(19) Nicholson, A. L.; Pasquinelli, A. E. Tales of Detailed Poly(A) Tails. *Trends in Cell Biology* **2019**, 29 (3), 191-200, Review. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.11.002.

(20) Gandin, V.; English, B. P.; Freeman, M.; Leroux, L. P.; Preibisch, S.; Walpita, D.; Jaramillo, M.; Singer, R. H. Cap-dependent translation initiation monitored in living cells. *Nature Communications* **2022**, 13 (1), 15, Article. DOI: 10.1038/s41467-022-34052-8.

(21) Merrick, W. C. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene* **2004**, 332, 1-11, Review. DOI: 10.1016/j.gene.2004.02.051.

(22) Anand Selvaraj and George, T. Chapter 275 - Translation Control and Insulin Signaling. In *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*, Second Edition ed.; Ralph, A. B. a. E. A. D. Ed.; Academic Press, 2010; pp 2295-2300.

(23) Hellen, T. V. P. a. C. U. T. Translation Initiation in Eukaryotes: Factors and Mechanisms. In *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, Second Edition ed.; William, J. L. a. M. D. L. Ed.; Academic Press, 2013; pp 432-435.

(24) Kim, H. J. Cell Fate Control by Translation: mRNA Translation Initiation as a Therapeutic Target for Cancer Development and Stem Cell Fate Control. *Biomolecules* **2019**, 9 (11), 17, Review. DOI: 10.3390/biom9110665.

(25) Tourriere, H.; Chebli, K.; Tazi, J. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie* **2002**, 84 (8), 821-837, Review. DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01445-1.

(26) Sachs, A. B. MESSENGER-RNA DEGRADATION IN EUKARYOTES. *Cell* **1993**, 74 (3), 413-421, Review. DOI: 10.1016/0092-8674(93)80043-e.

(27) Grudzien, E.; Kalek, M.; Jemielity, J.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R. E. Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (4), 1857-1867, Article. DOI: 10.1074/jbc.M509121200.

(28) Balagopal, V.; Fluch, L.; Nissan, T. Ways and means of eukaryotic mRNA decay. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Regulatory Mechanisms* **2012**, 1819 (6), 593-603, Review. DOI: 10.1016/j.bbagr.2012.01.001.

(29) Chen, Y.; Khazina, E.; Izaurralde, E.; Weichenrieder, O. Crystal structure and functional properties of the human CCR4-CAF1 deadenylase complex. *Nucleic Acids Research* **2021**, 49 (11), 6489-6510, Article. DOI: 10.1093/nar/gkab414.

- (30) Funakoshi, Y.; Doi, Y.; Hosoda, N.; Uchida, N.; Osawa, M.; Shimada, I.; Tsujimoto, M.; Suzuki, T.; Katada, T.; Hoshino, S. I. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes & Development* **2007**, *21* (23), 3135-3148, Article. DOI: 10.1101/gad.1597707.
- (31) Wolf, J.; Passmore, L. A. mRNA deadenylation by Pan2-Pan3. *Biochemical Society Transactions* **2014**, *42*, 184-187, Article. DOI: 10.1042/bst20130211.
- (32) Wahle, E.; Winkler, G. S. RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4-Not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829* (6-7), 561-570, Review. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.01.003.
- (33) Wang, Z. R.; Jiao, X. F.; Carr-Schmid, A.; Kiledjian, M. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (20), 12663-12668, Article. DOI: 10.1073/pnas.192445599.
- (34) 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* **2004**, *10* (10), 1609-1624, Article. DOI: 10.1261/rna.7690504.
- (35) 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). DOI: 10.1371/journal.pone.0090915.
- (36) 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.; Topics in Current Chemistry Collections, Springer International Publishing Ag, 2017; pp 211-239.
- (37) Garneau, N. L.; Wilusz, J.; Wilusz, C. J. The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8* (2), 113-126, Review. DOI: 10.1038/nrm2104.
- (38) Saxild, P. N. a. H. H. Nucleotide Metabolism. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Third Edition ed.; Moselio, S. Ed.; Academic Press, 2009; pp 296-307.
- (39) Zimmermann, H. 5'-NUCLEOTIDASE - MOLECULAR-STRUCTURE AND FUNCTIONAL-ASPECTS. *Biochemical Journal* **1992**, *285*, 345-365, Review. DOI: 10.1042/bj2850345.
- (40) Bogan, K. L.; Brenner, C. 5'-Nucleotidases and their new roles in NAD(+) and phosphate metabolism. *New Journal of Chemistry* **2010**, *34* (5), 845-853, Review. DOI: 10.1039/b9nj00758j.
- (41) Jordheim, L. P.; Chaloin, L. Therapeutic Perspectives for cN-II in Cancer. *Current Medicinal Chemistry* **2013**, *20* (34), 4292-4303, Article. DOI: 10.2174/0929867311320340008.
- (42) Jedrzejewska, A.; Kutryb-Zajac, B.; Krol, O.; Harasim, G.; Franczak, M.; Jablonska, P.; Slominska, E.; Smolenski, R. T. The decreased serum activity of cytosolic 5'-nucleotidase IA as a potential marker of breast cancer-associated muscle inflammation. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2022**, *41* (3), 273-284, Article. DOI: 10.1080/15257770.2021.2007396.
- (43) Galmarini, C. M.; Thomas, X.; Graham, K.; El Jafaari, A.; Cros, E.; Jordheim, L.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. *British Journal of Haematology* **2003**, *122* (1), 53-60, Article. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04386.x.
- (44) Cividini, F.; Filoni, D. N.; Pesi, R.; Allegrini, S.; Camici, M.; Tozzi, M. G. IMP-GMP specific cytosolic 5'-nucleotidase regulates nucleotide pool and prodrug metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2015**, *1850* (7), 1354-1361, Article. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.03.017.

- (45) Cekic, C.; Linden, J. Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* **2016**, *16* (3), 177-192, Review. DOI: 10.1038/nri.2016.4.
- (46) Junker, A.; Renn, C.; Dobelmann, C.; Namasivayam, V.; Jain, S.; Losenkova, K.; Irjala, H.; Duca, S.; Balasubramanian, R.; Chakraborty, S.; et al. Structure-Activity Relationship of Purine and Pyrimidine Nucleotides as Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62* (7), 3677-3695, Article. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00164.
- (47) Bianchi, V.; Spychala, J. Mammalian 5'-nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (47), 46195-46198. DOI: 10.1074/jbc.R300032200.
- (48) Rampazzo, C.; Gallinaro, L.; Milanese, E.; Frigimelica, E.; Reichard, P.; Bianchi, V. A deoxyribonucleotidase in mitochondria: Involvement in regulation of dNTP pools and possible link to genetic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (15), 8239-8244, Article. DOI: 10.1073/pnas.97.15.8239.
- (49) Wallden, K.; Ruzzenente, B.; Rinaldo-Matthis, A.; Bianchi, V.; Nordlund, P. Structural basis for substrate specificity of the human mitochondrial deoxyribonucleotidase. *Structure* **2005**, *13* (7), 1081-1088, Article. DOI: 10.1016/j.str.2005.04.023.
- (50) Pesi, R.; Allegrini, S.; Careddu, M. G.; Filoni, D. N.; Camici, M.; Tozzi, M. G. Active and regulatory sites of cytosolic 5'-nucleotidase. *Febs Journal* **2010**, *277* (23), 4863-4872, Article. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07891.x.
- (51) 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, Article. DOI: 10.1074/jbc.M112.426700.
- (52) Hokari, S.; Miyazaki, T.; Hasegawa, M.; Komoda, T. Enhanced activity of pyrimidine 5'-nucleotidase in rat red blood cells during erythropoiesis. *Biological Chemistry* **1998**, *379* (3), 329-333, Article. DOI: 10.1515/bchm.1998.379.3.329.
- (53) Kozarski, M.; Kubacka, D.; Wojtczak, B. A.; Kasprzyk, R.; Baranowski, M. R.; Kowalska, J. 7-Methylguanosine monophosphate analogues with 5'-(1,2,3-triazoyl) moiety: Synthesis and evaluation as the inhibitors of cNIIIB nucleotidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26* (1), 191-199. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.11.032.
- (54) Shukla, S.; Parker, R. Quality control of assembly-defective U1 snRNAs by decapping and 5'-to-3' exonucleolytic digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111* (32), E3277-E3286, Article. DOI: 10.1073/pnas.1412614111.
- (55) Gopalsamy, A.; Narayanan, A.; Liu, S. P.; Parikh, M. D.; Kyne, R. E.; Fadeyi, O.; Tones, M. A.; Cherry, J. J.; Nabhan, J. F.; LaRosa, G.; et al. Design of Potent mRNA Decapping Scavenger Enzyme (DcpS) Inhibitors with Improved Physicochemical Properties To Investigate the Mechanism of Therapeutic Benefit in Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (7), 3094-3108, Article. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00124.
- (56) De Benedetti, A.; Harris, A. L. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1999**, *31* (1), 59-72, Review. DOI: 10.1016/s1357-2725(98)00132-0.
- (57) Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. A NOVEL METHOD FOR PHOSPHORYLATION OF NUCLEOSIDES TO 5'-NUCLEOTIDES. *Tetrahedron Letters* **1967**, (50), 5065-+, Letter.
- (58) Mukaiyama, T.; Hashimoto, M. PHOSPHORYLATION BY OXIDATION-REDUCTION CONDENSATION - PREPARATION OF ACTIVE PHOSPHORYLATING REAGENTS. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1971**, *44* (8), 2284-+, Note. DOI: 10.1246/bcsj.44.2284.
- (59) Moffatt, J. G. GENERAL SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE-5 TRIPHOSPHATES. *Canadian Journal of Chemistry* **1964**, *42* (3), 599-+, Article. DOI: 10.1139/v64-087.

- (60) Simoncsits, A.; Tomasz, J. NUCLEOSIDE 5'-PHOSPHORDIAMIDATES, SYNTHESIS AND SOME PROPERTIES. *Nucleic Acids Research* **1975**, 2 (7), 1223-1233, Article. DOI: 10.1093/nar/2.7.1223.
- (61) Hoard, D. E.; Ott, D. G. CONVERSION OF MONO- AND OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES TO 5'-TRIPHOSPHATES. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, 87 (8), 1785-&, Article. DOI: 10.1021/ja01086a031.
- (62) Ludwig, J.; Eckstein, F. RAPID AND EFFICIENT SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE 5'-O-(1-THIOTRIPHOSPHATES), 5'-TRIPHOSPHATES AND 2',3'-CYCLOPHOSPHOROTHIOATES USING 2-CHLORO-4H-1,3,2-BENZODIOXAPHOSPHORIN-4-ONE. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, 54 (3), 631-635, Article. DOI: 10.1021/jo00264a024.
- (63) Kadokura, M.; Wada, T.; Urashima, C.; Sekine, M. Efficient synthesis of gamma-methyl-capped guanosine 5'-triphosphate as a 5'-terminal unique structure of U6 RNA via a new triphosphate bond formation involving activation of methyl phosphorimidazolidate using ZnCl₂ as a catalyst in DMF under anhydrous conditions. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38 (48), 8359-8362, Article. DOI: 10.1016/s0040-4039(97)10263-5.
- (64) Michelson, A. M.; Todd, A. R. NUCLEOTIDES .32. SYNTHESIS OF A DITHYMIDINE DINUCLEOTIDE CONTAINING A 3'-5'-INTERNUCLEOTIDIC LINKAGE. *Journal of the Chemical Society* **1955**, 2632-2638, Article. DOI: 10.1039/jr9550002632.
- (65) Glazier, D. A.; Liao, J. Z.; Roberts, B. L.; Li, X. L.; Yang, K.; Stevens, C. M.; Tang, W. P. Chemical Synthesis and Biological Application of Modified Oligonucleotides. *Bioconjugate Chemistry* **2020**, 31 (5), 1213-1233, Review. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00060.
- (66) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. ADVANCES IN THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHORAMIDITE APPROACH. *Tetrahedron* **1992**, 48 (12), 2223-2311, Review. DOI: 10.1016/s0040-4020(01)88752-4.
- (67) Krieg, P. A.; Melton, D. A. FUNCTIONAL MESSENGER-RNAS ARE PRODUCED BY SP6 INVITRO TRANSCRIPTION OF CLONED CDNAS. *Nucleic Acids Research* **1984**, 12 (18), 7057-7070, Article. DOI: 10.1093/nar/12.18.7057.
- (68) Gurevich, V. V.; Pokrovskaya, I. D.; Obukhova, T. A.; Zozulya, S. A. PREPARATIVE INVITRO MESSENGER-RNA SYNTHESIS USING SP6 AND T7 RNA-POLYMERASES. *Analytical Biochemistry* **1991**, 195 (2), 207-213, Article. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90318-n.
- (69) Dousis, A.; Ravichandran, K.; Hobert, E. M.; Moore, M. J.; Rabideau, A. E. An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts. *Nature Biotechnology* **2023**, 41 (4), 560-+, Article. DOI: 10.1038/s41587-022-01525-6.
- (70) Nance, K. D.; Meier, J. L. Modifications in an Emergency: The Role of N1-Methylpseudouridine in COVID-19 Vaccines. *Acs Central Science* **2021**, 7 (5), 748-756, Article. DOI: 10.1021/acscentsci.1c00197.
- (71) Henderson, J. M.; Ujita, A.; Hill, E.; Yousif-Rosales, S.; Smith, C.; Ko, N.; McReynolds, T.; Cabral, C. R.; Escamilla-Powers, J. R.; Houston, M. E. Cap 1 Messenger RNA Synthesis with Co-transcriptional CleanCap® Analog by In Vitro Transcription. *Current Protocols* **2021**, 1 (2), e39. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpz1.39>.
- (72) Liu, A. L.; Wang, X. The Pivotal Role of Chemical Modifications in mRNA Therapeutics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2022**, 10, 11, Review. DOI: 10.3389/fcell.2022.901510.
- (73) Ramanathan, A.; Robb, G. B.; Chan, S. H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research* **2016**, 44 (16), 7511-7526, Article. DOI: 10.1093/nar/gkw551.
- (74) Muttach, F.; Muthmann, N.; Rentmeister, A. Synthetic mRNA capping. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2017**, 13, 2819-2832, Review. DOI: 10.3762/bjoc.13.274.

- (75) Issur, M.; Bougie, I.; Despins, S.; Bisaillon, M. Enzymatic Synthesis of RNAs Capped with Nucleotide Analogues Reveals the Molecular Basis for Substrate Selectivity of RNA Capping Enzyme: Impacts on RNA Metabolism. *Plos One* **2013**, *8* (9), 12, Article. DOI: 10.1371/journal.pone.0075310.
- (76) Wang, S. P.; Deng, L.; Ho, C. K.; Shuman, S. Phylogeny of mRNA capping enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94* (18), 9573-9578, Article. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9573.
- (77) Shuman, S. CAPPING ENZYME IN EUKARYOTIC MESSENGER-RNA SYNTHESIS. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 50 **1995**, *50*, 101-129, Review. DOI: 10.1016/s0079-6603(08)60812-0.
- (78) Bollu, A.; Peters, A.; Rentmeister, A. Chemo-Enzymatic Modification of the 5' Cap To Study mRNAs. *Accounts of Chemical Research* **2022**, *55* (9), 1249-1261, Review. DOI: 10.1021/acs.accounts.2c00059.
- (79) Shanmugasundaram, M.; Senthilvelan, A.; Kore, A. R. Recent Advances in Modified Cap Analogs: Synthesis, Biochemical Properties, and mRNA Based Vaccines. *Chemical Record* **2022**, *22* (8), 26, Review. DOI: 10.1002/tcr.202200005.
- (80) 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, Article. DOI: 10.1038/gt.2010.52.
- (81) Walczak, S.; Nowicka, A.; Kubacka, D.; Fac, K.; Wanat, P.; Mroczek, S.; Kowalska, J.; Jemielity, J. A novel route for preparing 5' cap mimics and capped RNAs: phosphate-modified cap analogues obtained via click chemistry. *Chemical Science* **2017**, *8* (1), 260-267, Article. DOI: 10.1039/c6sc02437h.
- (82) Ichikawa, E.; Kato, K. Sugar-modified nucleosides in past 10 years, a review. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8* (4), 385-423, Review. DOI: 10.2174/0929867013373471.
- (83) Kukwikila, M.; Gale, N.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Tavassoli, A. Assembly of a biocompatible triazole-linked gene by one-pot click-DNA ligation. *Nature Chemistry* **2017**, *9* (11), 1089-1098, Article. DOI: 10.1038/nchem.2850.
- (84) Brown, C. J.; McNae, I.; Fischer, P. M.; Walkinshaw, M. D. Crystallographic and mass spectrometric characterisation of eIF4E with N-7-alkylated cap derivatives. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *372* (1), 7-15, Article. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.06.033.
- (85) 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, Article. DOI: 10.1021/jacs.8b02597.
- (86) Chatterjee, S.; Shioi, R.; Kool, E. T. Sulfonylation of RNA 2' -OH groups. *ACS Central Science* **2023**. DOI: 10.1021/acscentsci.2c01237.
- (87) El-Sagheer, A. H.; Sanzone, A. P.; Gao, R.; Tavassoli, A.; Brown, T. Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (28), 11338-11343, Article. DOI: 10.1073/pnas.1101519108.
- (88) Slusarczyk, M.; Serpi, M.; Pertusati, F. Phosphoramidates and phosphonamidates (ProTides) with antiviral activity. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2018**, *26*, 2040206618775243. DOI: 10.1177/2040206618775243.

- (89) De Clercq, E.; Neyts, J. Antiviral agents acting as DNA or RNA chain terminators. *Antiviral strategies* **2009**, 53-84.
- (90) Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (18), 9154-9218, Review. DOI: 10.1021/cr5002035.
- (91) 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, Review. DOI: 10.1038/nrd4010.
- (92) Van Rompay, A. R.; Johansson, M.; Karlsson, A. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacology & Therapeutics* **2000**, *87* (2-3), 189-198, Article; Proceedings Paper. DOI: 10.1016/s0163-7258(00)00048-6.
- (93) Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. J. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nature Reviews Drug Discovery* **2018**, *17* (8), 559-587, Review. DOI: 10.1038/nrd.2018.46.
- (94) Curley, D.; McGuigan, C.; Devine, K. G.; Oconnor, T. J.; Jeffries, D. J.; Kinchington, D. SYNTHESIS AND ANTI-HIV EVALUATION OF SOME PHOSPHORAMIDATE DERIVATIVES OF AZT - STUDIES ON THE EFFECT OF CHAIN ELONGATION ON BIOLOGICAL-ACTIVITY. *Antiviral Research* **1990**, *14* (6), 345-356, Article. DOI: 10.1016/0166-3542(90)90053-a.
- (95) Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61* (6), 2211-2226, Article. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00734.
- (96) Mehellou, Y.; Balzarini, J.; McGuigan, C. Aryloxy Phosphoramidate Triesters: a Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells. *Chemmedchem* **2009**, *4* (11), 1779-1791, Review. DOI: 10.1002/cmdc.200900289.
- (97) Wainberg, M. A. AIDS Drugs that prevent HIV infection. *Nature* **2011**, *469* (7330), 306-307, Editorial Material. DOI: 10.1038/469306a.
- (98) Chapman, T. M.; McGavin, J. K.; Noble, S. Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs* **2003**, *63* (15), 1597-1608, Article. DOI: 10.2165/00003495-200363150-00006.
- (99) Xie, Z. Q.; Lu, L. Q.; Wang, Z. H.; Luo, Q. H.; Yang, Y. C.; Fang, T.; Chen, Z. Y.; Ma, D. J.; Quan, J. M.; Xi, Z. S-acylthioalkyl ester (SATE)-based prodrugs of deoxyribose cyclic dinucleotides (dCDNs) as the STING agonist for antitumor immunotherapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, *243*, 15, Article. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114796.
- (100) Meier, C.; Meerbach, A.; Balzarini, J. CycloSal-pronucleotides - Development of first and second generation chemical trojan horses for antiviral chemotherapy. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **2004**, *9*, 873-890, Article. DOI: 10.2741/1283.
- (101) Gollnest, T.; de Oliveira, T. D.; Rath, A.; Hauber, I.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues. *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, *55* (17), 5255-5258, Article. DOI: 10.1002/anie.201511808.
- (102) 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, Article. DOI: 10.1021/mp300699d.
- (103) You, Y.; Kim, H. S.; Park, J. W.; Keum, G.; Jang, S. K.; Kim, B. M. Sulfur(vi) fluoride exchange as a key reaction for synthesizing biaryl sulfate core derivatives as potent hepatitis

C virus NS5A inhibitors and their structure-activity relationship studies. *Rsc Advances* **2018**, 8 (55), 31803-31821, Article. DOI: 10.1039/c8ra05471a.

(104) 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, Article. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115523.

(105) 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, Article. DOI: 10.1021/mp060070y.

(106) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40 (11), 2004-+, Review. DOI: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.0.co;2-5.

(107) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3 - triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67 (9), 3057-3064, Article. DOI: 10.1021/jo011148j.

(108) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, 340 (6131), 457-460, Article. DOI: 10.1126/science.1229506.

(109) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A strain-promoted 3+2 azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (46), 15046-15047, Article. DOI: 10.1021/ja044996f.

(110) Dong, J. J.; Krasnova, L.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Sulfur(VI) Fluoride Exchange (SuFEx): Another Good Reaction for Click Chemistry. *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, 53 (36), 9430-9448, Review. DOI: 10.1002/anie.201309399.

(111) Barrow, A. S.; Smedley, C. J.; Zheng, Q.; Li, S.; Dong, J.; Moses, J. E. The growing applications of SuFEx click chemistry. *Chemical Society Reviews* **2019**, 48 (17), 4731-4758, Review. DOI: 10.1039/c8cs00960k.

(112) Lucas, S. W.; Qin, R. Z.; Rakesh, K. P.; Kumar, K. S. S.; Qin, H. L. Chemical and biology of sulfur fluoride exchange (SuFEx) click chemistry for drug discovery. *Bioorganic Chemistry* **2023**, 130, 20, Article. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106227.

(113) Andreeva, O. V.; Garifullin, B. F.; Zarubaev, V. V.; Slita, A. V.; Yesaulkova, I. L.; Saifina, L. F.; Shulaeva, M. M.; Belenok, M. G.; Semenov, V. E.; Kataev, V. E. Synthesis of 1,2,3-triazolyl nucleoside analogues and their antiviral activity. *Molecular Diversity* **2021**, 25 (1), 473-490, Article. DOI: 10.1007/s11030-020-10141-y.

(114) Walczak, S.; Sikorski, P. J.; Kasprzyk, R.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Exploring the potential of phosphotriazole 5' mRNA cap analogues as efficient translation initiators. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, 16 (36), 6741-6748, Article. DOI: 10.1039/c8ob01720d.

(115) Fantoni, N. Z.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chemical Reviews* **2021**, 121 (12), 7122-7154, Review. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00928.

(116) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Click Nucleic Acid Ligation: Applications in Biology and Nanotechnology. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45 (8), 1258-1267, Review. DOI: 10.1021/ar200321n.

(117) Kasprzyk, R.; Starek, B. J.; Ciechanowicz, S.; Kubacka, D.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Fluorescent Turn-On Probes for the Development of Binding and Hydrolytic Activity Assays for

mRNA Cap-Recognizing Proteins. *Chemistry-a European Journal* **2019**, 25 (27), 6728-6740. DOI: 10.1002/chem.201900051.

(118) Kasprzyk, R.; Fido, M.; Mamot, A.; Wanat, P.; Smietanski, M.; Kopcial, M.; Cowling, V. H.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Direct High-Throughput Screening Assay for mRNA Cap Guanine-N7 Methyltransferase Activity. *Chemistry-a European Journal* **2020**, 26 (49), 11266-11275, Article. DOI: 10.1002/chem.202001036.

(119) Nian, K.; Liu, Y.; Brigandi, L.; Rouhanifard, S. H. DNA-enhanced CuAAC ligand enables live-cell detection of intracellular biomolecules. *bioRxiv* **2022**, 2022.2011.2010.515969. DOI: 10.1101/2022.11.10.515969.

(120) Annamalai Senthilvelan and Tyson Vonderfecht and Muthian Shanmugasundaram and Jason Potter and Anilkumar, R. K. Click-iT trinucleotide cap analog: Synthesis, mRNA translation, and detection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2023**, 77, 117128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.117128>.

(121) Li, S. H.; Wang, L.; Yu, F.; Zhu, Z. L.; Shobaki, D.; Chen, H. Q.; Wang, M.; Wang, J.; Qin, G. T.; Erasquin, U. J.; et al. Copper-catalyzed click reaction on/in live cells. *Chemical Science* **2017**, 8 (3), 2107-2114, Article. DOI: 10.1039/c6sc02297a.

(122) Holstein, J. M.; Anhauser, L.; Rentmeister, A. Modifying the 5'-Cap for Click Reactions of Eukaryotic mRNA and To Tune Translation Efficiency in Living Cells. *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, 55 (36), 10899-10903, Article. DOI: 10.1002/anie.201604107.

(123) Mamot, A.; Sikorski, P. J.; Warminski, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Azido-Functionalized 5' Cap Analogues for the Preparation of Translationally Active mRNAs Suitable for Fluorescent Labeling in Living Cells. *Angewandte Chemie-International Edition* **2017**, 56 (49), 15628-15632, Article. DOI: 10.1002/anie.201709052.

(124) Zheng, Q. H.; Woehl, J. L.; Kitamura, S.; Santos-Martins, D.; Smedley, C. J.; Li, G. C.; Forli, S.; Moses, J. E.; Wolan, D. W.; Sharpless, K. B. SuFEx-enabled, agnostic discovery of covalent inhibitors of human neutrophil elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2019**, 116 (38), 18808-18814, Article. DOI: 10.1073/pnas.1909972116.

(125) Mortenson, D. E.; Brighty, G. J.; Plate, L.; Bare, G.; Chen, W. T.; Li, S. H.; Wang, H.; Cravatt, B. F.; Forli, S.; Powers, E. T.; et al. "Inverse Drug Discovery" Strategy To Identify Proteins That Are Targeted by Latent Electrophiles As Exemplified by Aryl Fluorosulfates. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, 140 (1), 200-210, Article. DOI: 10.1021/jacs.7b08366.

(126) Jemielity, J.; Chrominski, M.; Ziemkiewicz, K.; Kowalska, J. Introducing SuFNucs: Sulfamoyl-Fluoride-Functionalized Nucleosides That Undergo Sulfur Fluoride Exchange Reaction. *Organic Letters* **2022**, 24 (27), 4977-4981, Letter. DOI: 10.1021/acs.orglett.2c02034.

(127) 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, Article. DOI: 10.1038/nsmb.3301.

(128) Beelman, C. A.; Stevens, A.; Caponigro, G.; LaGrandeur, T. E.; Hatfield, L.; Fortner, D. M.; Parker, R. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* **1996**, 382 (6592), 642-646, Article. DOI: 10.1038/382642a0.

(129) Milac, A. L.; Bojarska, E.; Wypijewska del Nogal, A. Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes & Regulatory Mechanisms* **2014**, 1839 (6), 452-462, Review. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.04.007.

(130) Singh, J.; Salcius, M.; Liu, S. W.; Staker, B. L.; Mishra, R.; Thurmond, J.; Michaud, G.; Mattoon, D. R.; Printen, J.; Christensen, J.; et al. DcpS as a Therapeutic Target for Spinal

Muscular Atrophy. *Acs Chemical Biology* **2008**, 3 (11), 711-722, Article. DOI: 10.1021/cb800120t.

(131) Ziemniak, M.; Mugridge, J. S.; Kowalska, J.; Rhoads, R. E.; Gross, J. D.; Jemielity, J. Two-headed tetrphosphate cap analogs are inhibitors of the Dcp1/2 RNA decapping complex. *Rna* **2016**, 22 (4), 518-529, Article. DOI: 10.1261/rna.055152.115.

(132) 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, Article. DOI: 10.1021/acs.joc.5b00337.

(133) Baranowski, M. R.; Nowicka, A.; Jemielity, J.; Kowalska, J. A fluorescent HTS assay for phosphohydrolases based on nucleoside 5'-fluorophosphates: its application in screening for inhibitors of mRNA decapping scavenger and PDE-I. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, 14 (20), 4595-4604, Article. DOI: 10.1039/c6ob00492j.

(134) Chrominski, M.; Baranowski, M. R.; Chmielinski, S.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Synthesis of Trifluoromethylated Purine Ribonucleotides and Their Evaluation as F-19 NMR Probes. *Journal of Organic Chemistry* **2020**, 85 (5), 3440-3453, Article. DOI: 10.1021/acs.joc.9b03198.

(135) Galloway, A.; Cowling, V. H. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **2019**, 1862 (3), 270-279, Review. DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.09.011.

(136) Darzynkiewicz, E.; Antosiewicz, J.; Ekiel, I.; Morgan, M. A.; Tahara, S. M.; Shatkin, A. J. METHYL ESTERIFICATION OF M7G5'P REVERSIBLY BLOCKS ITS ACTIVITY AS AN ANALOG OF EUKARYOTIC MESSENGER-RNA 5'-CAPS. *Journal of Molecular Biology* **1981**, 153 (2), 451-458, Letter. DOI: 10.1016/0022-2836(81)90289-8.

(137) Shatkin, Y. F. a. M. A. M. a. A. J. Synthesis and translation of mRNA containing 5'-terminal 7-ethylguanosine cap. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, 254 (14), 6732-6738. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50430-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50430-0).

(138) Darzynkiewicz, E.; Ekiel, I.; Tahara, S. M.; Seliger, L. S.; Shatkin, A. J. CHEMICAL SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF 7-METHYLGUANOSINE CAP ANALOGS. *Biochemistry* **1985**, 24 (7), 1701-1707, Article. DOI: 10.1021/bi00328a020.

(139) Blagden, S. P.; Willis, A. E. The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2011**, 8 (5), 280-291, Review. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.16.

(140) Ziemniak, M.; Strenkowska, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Potential therapeutic applications of RNA cap analogs. *Future Medicinal Chemistry* **2013**, 5 (10), 1141-1172, Review. DOI: 10.4155/fmc.13.96.

(141) Fang, E. Y.; Liu, X. H.; Li, M.; Zhang, Z. L.; Song, L. F.; Zhu, B. Y.; Wu, X. H.; Liu, J. J.; Zhao, D. H.; Li, Y. H. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022**, 7 (1), 31, Review. DOI: 10.1038/s41392-022-00950-y.

(142) Grudzien-Nogalska, E.; Stepinski, J.; Jemielity, J.; Zuberek, J.; Stolarski, R.; Rhoads, R. E.; Darzynkiewicz, E. Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCAs) and their applications in mRNA translation and stability. In *Translation Initiation: Cell Biology, High-Throughput Methods, and Chemical-Based Approaches*, Lorsch, J. Ed.; Methods in Enzymology, Vol. 431; Elsevier Academic Press Inc, 2007; pp 203-227.

(143) Grudzien-Nogalska, E.; Jemielity, J.; Kowalska, J.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R. E. Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. *Rna* **2007**, 13 (10), 1745-1755, Article. DOI: 10.1261/rna.701307.

- (144) Ishikawa, M.; Murai, R.; Hagiwara, H.; Hoshino, T.; Suyama, K. Preparation of eukaryotic mRNA having differently methylated adenosine at the 5' -terminus and the effect of the methyl group in translation. *Nucleic Acids Symposium Series* **2009**, 53 (1), 129-130. DOI: 10.1093/nass/nrp065 (accessed 1/30/2023).
- (145) Senthilvelan, A.; Vonderfecht, T.; Shanmugasundaram, M.; Pal, I.; Potter, J.; Kore, A. R. Trinucleotide Cap Analogue Bearing a Locked Nucleic Acid Moiety: Synthesis, mRNA Modification, and Translation for Therapeutic Applications. *Organic Letters* **2021**, 23 (11), 4133-4136, Article. DOI: 10.1021/acs.orglett.1c01037.
- (146) Pascolo, S. Synthetic Messenger RNA-Based Vaccines: From Scorn to Hype. *Viruses-Basel* **2021**, 13 (2), 12, Review. DOI: 10.3390/v13020270.
- (147) Krause, W. mRNA—From COVID-19 Treatment to Cancer Immunotherapy. *Biomedicines* **2023**, 11 (2), 308.
- (148) Klöcker, N.; Weissenboeck, F. P.; van Dülmen, M.; Špaček, P.; Hüwel, S.; Rentmeister, A. Photocaged 5' cap analogues for optical control of mRNA translation in cells. *Nature Chemistry* **2022**. DOI: 10.1038/s41557-022-00972-7.
- (149) Garner, A. L. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids as Therapeutics: A Virtual Special Issue. *Acs Pharmacology & Translational Science* **2021**, 4 (6), 1714-1715, Editorial Material. DOI: 10.1021/acspsci.1c00231.
- (150) Qin, S. G.; Tang, X. S.; Chen, Y. T.; Chen, K. P.; Fan, N.; Xiao, W.; Zheng, Q.; Li, G. H.; Teng, Y. Q.; Wu, M.; et al. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022**, 7 (1), 35, Review. DOI: 10.1038/s41392-022-01007-w.
- (151) Sahin, U.; Kariko, K.; Tureci, O. mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, 13 (10), 759-780, Review. DOI: 10.1038/nrd4278.
- (152) Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* **2020**, 586 (7830), 516-527, Review. DOI: 10.1038/s41586-020-2798-3.
- (153) Valenta, R.; Ferreira, F.; Focke-Tejkl, M.; Linhart, B.; Niederberger, V.; Swoboda, I.; Vrtala, S. From Allergen Genes to Allergy Vaccines. In *Annual Review of Immunology, Vol 28*, Paul, W. E., Littman, D. R., Yokoyama, W. M. Eds.; Annual Review of Immunology, Vol. 28; Annual Reviews, 2010; pp 211-241.
- (154) Huang, L.; Zhang, L.; Li, W.; Li, S.; Wen, J.; Li, H.; Liu, Z. Advances in Development of mRNA-Based Therapeutics. In *mRNA Vaccines*, Yu, D., Petsch, B. Eds.; Springer International Publishing, 2022; pp 147-166.
- (155) Phua, K. K. L.; Leong, K. W.; Nair, S. K. Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *Journal of Controlled Release* **2013**, 166 (3), 227-233, Article. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.12.029.
- (156) Selmi, A.; Vascotto, F.; Kautz-Neu, K.; Tureci, O.; Sahin, U.; von Stebut, E.; Diken, M.; Kreiter, S. Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. *Cancer Immunology Immunotherapy* **2016**, 65 (9), 1075-1083, Article. DOI: 10.1007/s00262-016-1869-7.
- (157) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, 20 (2), 101-124, Review. DOI: 10.1038/s41573-020-0090-8.
- (158) Sun, H.; Zhang, Y.; Wang, G.; Yang, W.; Xu, Y. mRNA-Based Therapeutics in Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **2023**, 15 (2), 622.

- (159) Swingle, K. L.; Hamilton, A. G.; Mitchell, M. J. Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of mRNA Therapeutics and Vaccines. *Trends in Molecular Medicine* **2021**, 27 (6), 616-617, Editorial Material. DOI: 10.1016/j.molmed.2021.03.003.
- (160) Kim, S. C.; Sekhon, S. S.; Shin, W. R.; Ahn, G.; Cho, B. K.; Ahn, J. Y.; Kim, Y. H. Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Molecular & Cellular Toxicology* **2022**, 18 (1), 1-8, Review. DOI: 10.1007/s13273-021-00171-4.
- (161) 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* **2020**, 26 (12), 1815-1837, Article. DOI: 10.1261/rna.077099.120.
- (162) Gao, M. S.; Zhang, Q. Y.; Feng, X. H.; Liu, J. Z. Synthetic modified messenger RNA for therapeutic applications. *Acta Biomaterialia* **2021**, 131, 1-15, Review. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.06.020.
- (163) Baden, L. R.; El Sahly, H. M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S. A.; Rouphael, N.; Creech, C. B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine* **2021**, 384 (5), 403-416, Article. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.
- (164) Lorentzen, C. L.; Haanen, J. B.; Met, O.; Svane, I. M. Clinical advances and ongoing trials of mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncology* **2022**, 23 (10), E450-E458, Review.
- (165) Verbeke, R.; Lentacker, I.; De Smedt, S. C.; Dewitte, H. Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today* **2019**, 28, 17, Review. DOI: 10.1016/j.nantod.2019.100766.
- (166) Kubacka, D.; Kozarski, M.; Baranowski, M. R.; Wojcik, R.; Panecka-Hofman, J.; Strzelecka, D.; Basquin, J.; Jemielity, J.; Kowalska, J. Substrate-Based Design of Cytosolic Nucleotidase IIIB Inhibitors and Structural Insights into Inhibition Mechanism. *Pharmaceuticals* **2022**, 15 (5), 27, Article. DOI: 10.3390/ph15050554.
- (167) Martinez, C. R.; Iverson, B. L. Rethinking the term "pi-stacking". *Chemical Science* **2012**, 3 (7), 2191-2201, Article. DOI: 10.1039/c2sc20045g.
- (168) Kalayanov, G.; Jaksa, S.; Scarcia, T.; Kobe, J. Regioselective functionalization of guanine: Simple and practical synthesis of 7-and 9-alkylated guanines starting from guanosine. *Synthesis-Stuttgart* **2004**, (12), 2026-2034, Article. DOI: 10.1055/s-2004-829174.
- (169) Gupta, S. C.; Kannappan, R.; Reuter, S.; Kim, J. H.; Aggarwal, B. B. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Resveratrol and Health* **2011**, 1215, 150-160, Article; Proceedings Paper. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05852.x.
- (170) Kanavarioti, A.; Rosenbach, M. T. CATALYSIS OF HYDROLYSIS AND NUCLEOPHILIC-SUBSTITUTION AT THE P-N BOND OF PHOSPHOIMIDAZOLIDE-ACTIVATED NUCLEOTIDES IN PHOSPHATE BUFFERS. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56 (4), 1513-1521, Article. DOI: 10.1021/jo00004a032.
- (171) Kozarski, M.; Dratzkowska, K.; Bednarczyk, M.; Warminski, M.; Jemielity, J.; Kowalska, J. Towards superior mRNA caps accessible by click chemistry: synthesis and translational properties of triazole-bearing oligonucleotide cap analogs. *Rsc Advances* **2023**, 13 (19), 12809-12824, Article. DOI: 10.1039/d3ra00026e.
- (172) Sinha, N. D.; Biernat, J.; McManus, J.; Koster, H. POLYMER SUPPORT OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS .18. USE OF BETA-CYANOETHYL-N,N-DIALKYLAMINO-/N-MORPHOLINO PHOSPHORAMIDITE OF DEOXYNUCLEOSIDES FOR THE SYNTHESIS OF DNA FRAGMENTS SIMPLIFYING DEPROTECTION AND ISOLATION

OF THE FINAL PRODUCT. *Nucleic Acids Research* **1984**, 12 (11), 4539-4557. DOI: 10.1093/nar/12.11.4539.

(173) Flamme, M.; McKenzie, L. K.; Sarac, I.; Hollenstein, M. Chemical methods for the modification of RNA. *Methods* **2019**, 161, 64-82, Article. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.03.018.

(174) Warminski, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Solid-Phase Synthesis of RNA 5'-Azides and Their Application for Labeling, Ligation, and Cyclization Via Click Chemistry. *Current protocols in nucleic acid chemistry* **2020**, 82 (1), e112, ; Research Support, Non-U.S. Gov't. DOI: 10.1002/cpnc.112.

(175) Hebert, N.; Beck, A.; Lennox, R. B.; Just, G. A NEW REAGENT FOR THE REMOVAL OF THE 4-METHOXYBENZYL ETHER - APPLICATION TO THE SYNTHESIS OF UNUSUAL MACROCYCLIC AND BOLAFORM PHOSPHATIDYLCHOLINES. *Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57 (6), 1777-1783, Article. DOI: 10.1021/jo00032a033.

(176) Wanat, P.; Walczak, S.; Wojtczak, B. A.; Nowakowska, M.; Jemielity, J.; Kowalska, J. Ethynyl, 2-Propynyl, and 3-Butynyl C-Phosphonate Analogues of Nucleoside Di- and Triphosphates: Synthesis and Reactivity in CuAAC. *Organic Letters* **2015**, 17 (12), 3062-3065, Article. DOI: 10.1021/acs.orglett.5b01346.

(177) Baraniak, D.; Boryski, J. Triazole-Modified Nucleic Acids for the Application in Bioorganic and Medicinal Chemistry. *Biomedicines* **2021**, 9 (6), 35, Review. DOI: 10.3390/biomedicines9060628.

(178) Sharma, V. K.; Singh, S. K.; Krishnamurthy, P. M.; Alterman, J. F.; Haraszti, R. A.; Khvorova, A.; Prasad, A. K.; Watts, J. K. Synthesis and biological properties of triazole-linked locked nucleic acid. *Chemical Communications* **2017**, 53 (63), 8906-8909, Article. DOI: 10.1039/c7cc04092j.

(179) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A triazole linkage that mimics the DNA phosphodiester group in living systems. *Quarterly Reviews of Biophysics* **2015**, 48 (4), 429-436, Review. DOI: 10.1017/s0033583515000141.

(180) Warminski, M.; Warminska, Z.; Kowalska, J.; Jemielity, J. mRNA Cap Modification through Carbamate Chemistry: Synthesis of Amino- and Carboxy-Functionalised Cap Analogues Suitable for Labelling and Bioconjugation. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 2015 (28), 6153-6169, Article. DOI: 10.1002/ejoc.201500672.

(181) Jawalekar, A. M.; Meeuwenoord, N.; Cremers, J. G. O.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Rutjes, F.; van Delft, F. L. Conjugation of nucleosides and oligonucleotides by 3+2 cycloaddition. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73 (1), 287-290, Article. DOI: 10.1021/jo702023s.

(182) Niewiadomski, S.; Beebejaun, Z.; Denton, H.; Smith, T. K.; Morris, R. J.; Wagner, G. K. Rationally designed squaryldiamides - a novel class of sugar-nucleotide mimics? *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, 8 (15), 3488-3499, Article. DOI: 10.1039/c004165c.

(183) Beckert, B.; Masquida, B. Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. In *Rna: Methods and Protocols*, Nielsen, H. Ed.; Methods in Molecular Biology, Vol. 703; Humana Press Inc, 2011; pp 29-41.

(184) Stump, W. T.; Hall, K. B. SP6 RNA-POLYMERASE EFFICIENTLY SYNTHESIZES RNA FROM SHORT DOUBLE-STRANDED DNA TEMPLATES. *Nucleic Acids Research* **1993**, 21 (23), 5480-5484, Article. DOI: 10.1093/nar/21.23.5480.

(185) Axelrod, V. D.; Kramer, F. R. TRANSCRIPTION FROM BACTERIOPHAGE-T7 AND SP6 RNA-POLYMERASE PROMOTERS IN THE PRESENCE OF 3'-DEOXYRIBONUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATE CHAIN TERMINATORS. *Biochemistry* **1985**, 24 (21), 5716-5723, Article. DOI: 10.1021/bi00342a005.

- (186) Ishikawa, M.; Murai, R.; Hagiwara, H.; Hoshino, T.; Suyama, K. Preparation of eukaryotic mRNA having differently methylated adenosine at the 5'-terminus and the effect of the methyl group in translation. *Nucleic acids symposium series (2004)* **2009**, (53), 129-130. DOI: 10.1093/nass/nrp065.
- (187) Hadas, Y.; Sultana, N.; Youssef, E.; Sharkar, M. T. K.; Kaur, K.; Chepurko, E.; Zangi, L. Optimizing Modified mRNA In Vitro Synthesis Protocol for Heart Gene Therapy. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development* **2019**, 14, 300-305, Article. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.07.006.
- (188) Cazenave, C.; Uhlenbeck, O. C. RNA TEMPLATE-DIRECTED RNA-SYNTHESIS BY T7 RNA-POLYMERASE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91 (15), 6972-6976, Article. DOI: 10.1073/pnas.91.15.6972.
- (189) 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, Article. DOI: 10.1093/nar/gnh007.
- (190) o. *HPLC Purification of In Vitro Transcribed Long RNA*, bookTitle= *Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation: Methods and Protocols*; Humana Press, 2013. DOI: 10.1007/978-1-62703-260-5_3.
- (191) Martin-Gayo, E.; Yu, X. G. Role of Dendritic Cells in Natural Immune Control of HIV-1 Infection. *Frontiers in Immunology* **2019**, 10, 9, Review. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01306.
- (192) Benteyn, D.; Heirman, C.; Bonehill, A.; Thielemans, K.; Breckpot, K. mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Review of Vaccines* **2015**, 14 (2), 161-176, Review. DOI: 10.1586/14760584.2014.957684.
- (193) Niedzwiecka, A.; Stepinski, J.; Antosiewicz, J. M.; Darzynkiewicz, E.; Stolarski, R. Biophysical approach to studies of cap-eIF4E interaction by synthetic cap analogs. In *Translation Initiation: Reconstituted Systems and Biophysical Methods*, Lorsch, J. Ed.; Methods in Enzymology, Vol. 430; Elsevier Academic Press Inc, 2007; pp 209-+.
- (194) Zuberek, J.; Wyslouch-Cieszyńska, A.; Niedzwiecka, A.; Dadlez, M.; Stepinski, J.; Augustyniak, W.; Gingras, A. C.; Zhang, Z. B.; Burley, S. K.; Sonenberg, N.; et al. Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *Rna* **2003**, 9 (1), 52-61, Article. DOI: 10.1261/rna.2133403.
- (195) Niedzwiecka, A.; Marcotrigiano, J.; Stepinski, J.; Jankowska-Anyszka, M.; Wyslouch-Cieszyńska, A.; Dadlez, M.; Gingras, A. C.; Mak, P.; Darzynkiewicz, E.; Sonenberg, N.; et al. 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, Article. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00328-5.
- (196) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Synthesis and Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA Strands Containing an Unnatural Triazole Linkage. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131 (11), 3958-3964, Article. DOI: 10.1021/ja8065896.
- (197) Linder, B.; Jaffrey, S. R. Discovering and Mapping the Modified Nucleotides That Comprise the Epitranscriptome of mRNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2019**, 11 (6), 16, Article. DOI: 10.1101/cshperspect.a032201.
- (198) Aritomo, K.; Wada, T.; Sekine, M. ALKYLATION OF 6-N-ACYLATED ADENOSINE DERIVATIVES BY THE USE OF PHASE-TRANSFER CATALYSIS. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1995**, (14), 1837-1844, Article. DOI: 10.1039/p19950001837.
- (199) Wojcik, R.; Baranowski, M. R.; Markiewicz, L.; Kubacka, D.; Bednarczyk, M.; Baran, N.; Wojtczak, A.; Sikorski, P. J.; Zuberek, J.; Kowalska, J.; et al. Novel N7-Arylmethyl Substituted Dinucleotide mRNA 5' cap Analogs: Synthesis and Evaluation as Modulators of Translation. *Pharmaceutics* **2021**, 13 (11). DOI: 10.3390/pharmaceutics13111941.

