

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



Agnieszka Młynarska-Cieślak

Nr albumu: 393363

**Nowe analogi kofaktorów adeninowych jako narzędzia do
badania procesów biologicznych – synteza, badanie
właściwości i zastosowania**

Rozprawa doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem

dr hab. Joanny Kowalskiej

w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej

Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa 2024

*Badania zrealizowano w ramach projektu Sonata Bis (UMO-2015/18/E/ST5/00555) finansowanego ze
środków Narodowego Centrum Nauki.*

*Praca była realizowana w Laboratorium Chemii Biofizycznej Zakładu Biofizyki IFD, Wydział Fizyki
Uniwersytetu Warszawskiego oraz w Laboratorium Chemii Biologicznej Centrum Nowych Technologii
Uniwersytetu Warszawskiego*

Spis publikacji:

1. *Nicotinamide-containing di-and trinucleotides as chemical tools for studies of NAD-capped RNAs*, A. Młynarska-Cieślak, A. Depaix, E. Grudzień-Nogalska, P. J. Sikorski, M. Warmiński, M. Kiledjian, J. Jemielity, J. Kowalska, Org. Lett., **2018**, 20 (23), 7650-7655
2. *Purine and pyrimidine dinucleoside polyphosphates differentially affect the phenylpropanoid pathway in Vitis vinifera L. cv. Monastrell suspension cultured cells*, M. Pietrowska-Borek, A. Wojdyła-Mamoń, J. Dobrogojski, A. Młynarska-Cieślak, M. R. Baranowski, J. M. Dąbrowski, J. Kowalska, J. Jemielity, S. Borek, M. Angeles Pedreño, A. Guranowski, Plant Physiol. Biochem., **2020**, 147, 125-132
3. *DXO/Rai1 enzymes remove 5'-end FAD and dephospho-CoA caps on RNAs*, S. K. Doamekpor, E. Grudzień-Nogalska, A. Młynarska-Cieślak, J. Kowalska, M. Kiledjian, L. Tong., Nucleic Acids Research, **2020**; 48(11), 6136–6148
4. *RNA Ligation for Mono and Dually Labeled RNAs*, A. Depaix, A. Młynarska-Cieślak, M. Warmiński, P. J. Sikorski, J. Jemielity, J. Kowalska., Chemistry—A European Journal, **2021**
5. *Fluorinated PAPS analogs for continuous sulfotransferase activity monitoring and inhibitor screening by ^{19}F NMR spectroscopy*, A. Młynarska-Cieślak, M. Chromiński, T. Śpiewła, M. R. Baranowski, M. Bednarczyk, J. Jemielity, J. Kowalska, ACS CHEM. BIOL., **2022**, 17, 3, 661–669

Spis wystąpień konferencyjnych:

1. VI International Conference of Biophysics Students, Kraków, **2017**. Prezentacja plakatu pt. Synthesis of PAPS analogs as novel evaluation as substrates and inhibitors for sulfotransferases.
2. XIV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików „ChemSession’17”, Warszawa, **2017**. Prezentacja plakatu pt. Synteza nowych analogów pochodnych adenozyiny jako substratów dla sulfotransferaz.
3. XXIII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, San Diego, **2018**. Prezentacja plakatu pt. Phosphate-modified PAPS analogs as tools to study sulfotransferases.

4. 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, **2018**. Prezentacja plakatu pt. Synteza nowych analogów PAPS jako inhibitorów dla sulfotransferaz.
5. 12th European Biophysics Congress-EBSA, Madrid, **2019**. Prezentacja plakatu pt. Evaluation of PAPS analogs as inhibitors of sulfotransferases using an MST-based assay.
6. 62 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Warszawa, **2019**. Wystąpienie ustne pt. Synteza analogów PAPS jako inhibitorów sulfotransferaz i ich ewaluacja przy użyciu metody MST.
7. I Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota, konferencja online, **2020**. Prezentacja plakatu pt. Selective molecular tools based on PAPS structure to study sulfotransferases.
8. Sympozjum Młodych Naukowców, konferencja online, **2021**. Wystąpienie ustne pt. Fluorowane analogi PAPS jako narzędzia do monitorowania aktywności sulfotransferaz metodą ^{19}F NMR.
9. Druga Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota, konferencja online, **2021**. Prezentacja plakatu pt. Synthesis and evaluation of PAPS analogs as molecular tools to study sulfotransferases by ^{19}F NMR.

PODZIĘKOWANIA

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Promotor – dr hab. Joannie Kowalskiej za ogromną wiedzę i wsparcie w realizacji projektu doktorskiego, opiekę naukową, gaszenie wszelkich pożarów i rozmowy merytoryczne, szczególnie te prowadzone w środku nocy. Za serce i bycie moją inspiracją – nie tylko naukową. Dziękuję

Profesorowi Jackowi Jemielitemu za możliwość realizacji badań w laboratorium, przekazaną wiedzę, doświadczenie oraz za zrozumienie i wsparcie

Oraz współpracownikom

dr Anaïs Depaix za owocną współpracę, poszerzenie horyzontów oraz godziny spędzone na rozmowach

dr Mikołajowi Chromińskiemu za przekazaną wiedzę w dziedzinie chemii, cierpliwość oraz konstruktywną krytykę

dr. Markowi Baranowskiemu za przekazane tajniki techniki NMR, doświadczenie dotyczące chemii nukleotydów oraz wspólnie wykonane eksperymenty.

dr Dorocie Kubackiej oraz **mgr. Tomaszowi Śpiewli** za przygotowanie białek użytych w niniejszej rozprawie oraz wprowadzenie w skomplikowany świat biofizyki.

mgr. inż. Sebastianowi Chmielińskiemu bez którego świat, szczególnie ten laboratoryjny, z pewnością wyróciłby się na drugą stronę.

mgr Marcelinie Bednarczyk za to, że zrobiliśmy to razem. Za śmiech do łez i otarte łzy. Za milion rzeczy, które składają się w przyjaźń.

Koleżankom i kolegom z Laboratorium za ten spędzony razem czas obfity w rozmowy, dyskusje naukowe, za śmiech i małe rozpacz. To były dla mnie wyjątkowe lata.

Rodzicom za waszą miłość i wsparcie na każdym etapie mojego życia

Mojej rodzinie, Piotrkowi i Zuzi. Nie da się powiedzieć jednym zdaniem za co Wam dziękuję. Jesteście całym moim światem.

Mojej Zuzi

SPIS TREŚCI

1.	WYKAZ SKRÓTÓW	13
2.	WPROWADZENIE.....	15
3.	PRZEGLĄD LITERATUROWY	17
3.1.	ROLA NUKLEOTYDÓW W KOMÓRCE	17
3.2.	KOFAKTORY ADENINOWE - WPROWADZENIE	17
3.3.	NAD	20
3.3.1.	STRUKTURA I FUNKCJA BIOLOGICZNA W KOMÓRCE	20
3.3.2.	ENZYMY ROZPOZNAJĄCE NAD JAKO SUBSTRAT	21
3.4.	PAPS.....	23
3.4.1.	STRUKTURA I ROLA BIOLOGICZNA W KOMÓRCE	23
3.4.2.	SYNTEZA PAPS W KOMÓRCE	24
3.5.	ENZYMY ROZPOZNAJĄCE PAPS JAKO SUBSTRAT – SULFOTRANSFERAZY.....	25
3.5.1.	FUNKCJE I KONSEKWENCJE ZABURZEŃ AKTYWNOŚCI.....	25
3.5.2.	METODY BADANIA SULFOTRANSFERAZ.....	30
3.5.3.	ANALOGI PAPS DO BADANIA SULFOTRANSFERAZ	32
3.5.4.	SULFOTRANSFERAZY MODELOWE BADANE W NINIEJSZEJ ROZPRAWIE (ATSOT18, SULT1A3).....	34
4.	METODYKA BADAŃ	36
4.1.	SYNTEZA CHEMICZNA	36
4.1.1.	FOSFORYLACJA NUKLEOZYDÓW METODĄ YOSHIKAWY ORAZ JEJ MODYFIKACJE	36
4.1.2.	AKTYWACJA NUKLEOTYDÓW ORAZ SPRZĘGANIE W OBECNOŚCI DWUWARTOŚCIOWYCH JONÓW METALI	37
4.1.3.	METODY OTRZYMYWANIA PAPS	38
4.2.	METODY BIOFIZYCZNE WYKORZYSTANE PODCZAS REALIZACJI PROJEKTU	39
4.2.1.	JĄDROWY REZONANS MAGNETYCZNY (NMR)	39
4.2.2.	TERMOFOREZA MIKROSKALOWA	41
5.	BADANIA WŁASNE	46
5.1.	CEL PROJEKTU	46
5.2.	OTRZYMYWANIE ORAZ EWALUACJA ANALOGÓW NAD.....	47
5.2.1.	SYNTEZA ANALOGÓW NAD.....	47
5.2.2.	BADANIA BIOLOGICZNE OTRZYMANYCH ANALOGÓW NAD	51
5.3.	OTRZYMYWANIE ANALOGÓW PAPS ORAZ ICH EWALUACJA	55
5.3.1.	SYNTEZA ANALOGÓW PAPS	57
5.3.2.	SYNTEZA ANALOGÓW PAPS – ANALOGI UGRUPOWANIA FOSFOSIARCZANOWEGO	62
5.3.3.	SYNTEZA ANALOGÓW PAP I PAPS – MODYFIKACJE ZASADY AZOTOWEJ	64
5.3.4.	SYNTEZA ANALOGÓW PAP	65
5.4.	BADANIE WŁAŚCIWOŚCI ANALOGÓW PAP I PAPS	69

5.4.1. BADANIE WŁAŚCIWOŚCI SUBSTRATOWYCH I INHIBITOROWYCH ZA POMOCĄ HPLC.	70
5.4.2. OPRACOWANIE METODY ^{19}F NMR.....	72
5.4.3. BADANIA BIOFIZYCZNE Z WYKORZYSTANIEM METODY TERMOFOREZY MIKROSKALOWEJ.....	84
5.5. PODSUMOWANIE BADAŃ WŁASNYCH.....	99
6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	103
6.1. SYNTEZA CHEMICZNA	103
6.1.1. INFORMACJE OGÓLNE DOTYCZĄCE SYNTEZY CHEMICZNEJ:.....	103
6.1.2 SYNTEZA ANALOGÓW NAD	106
6.1.2.1. Hydroliza chemiczna NAD (NMP)	106
6.1.2.2. Imidazolowa pochodna monofosforanu nikotynamidu (NMN-IM).....	106
6.1.2.3. Synteza S_P i R_P 5'-[(P1-tio)difosfo-(nikotynamid β -D-rybofur-1'-an)] adenozyne (NppsA).....	107
6.1.2.4. Synteza 5'-tio- 5'-[difosfo-(nikotynamid β -D-ribofuranos-1'-yl)] 5'-deoksyadenozyne (Npp-5'S-A).....	108
6.1.3. OTRZYMYWANIE ANALOGÓW PAPS	109
6.1.3.1. Synteza 5'-fosfosiarczan-3'-fosfo-2-(fluoro) adenozyne (2-F-PAPS).	110
6.1.3.2. Synteza 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfo-2-(trifluorometylo)adenozyne (2-CF ₃ -PAPS).	111
6.1.3.3. Synteza 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfo-8-(trifluorometylo) adenozyne (8-CF ₃ -PAPS).	112
6.1.3.4. Synteza imidazolidu 5'-fosforanu-2', 3'-cyklofosfo adenozyne (cPAP-Im)	113
6.1.3.5. Synteza 5'-difosforanu-3'-fosfoadenozyne (PAPP)	113
6.1.3.6. Synteza 5'-trifosforanu-3'-fosfoadenozyne (PAPPP)	114
6.1.3.7. Synteza 5'-fluoro difosforanu-3'-fosfoadenozyne (PAPPF).....	115
6.1.3.8. Synteza 5'-difosforanu propargilu, 3'-fosfoadenozyne (PAPP-prop)	115
6.1.3.9. Synteza 5'-fosforanu-C-fosfonianu etynyli, 3'-fosfoadenozyne (PAPPCCH)	116
6.1.3.10. Synteza 5'-metyleno bis-fosfonian 3'-fosfoadenozyne (PAPCH ₂ P).....	117
6.1.3.11. Synteza 5'-difosforanu-3'-fosfo-6-(propargilamino) adenozyne (N6-prop-PAPP)	118
6.1.3.12. Synteza 5'-difosforanu-3'-fosfo-6-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (N6-AE-PAPP)	119
6.1.3.13. Synteza 5'-difosforanu-3'-fosfo-6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyne (N6-PEG-PAPP)	120
6.1.3.14. Synteza 5'-difosforanu-2',3'-cyklofosfo-2-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyne (N2-PEG-cPAPP)	121
6.1.3.15. Synteza 5'-fosforanu-3'-fosfo-8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (C8-AE-PAPP)	121
6.1.3.16. Synteza 5'-fosfosiarczanu-3'-fosfo-C8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (C8-AE-PAPS).....	122

6.1.3.17. Synteza 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfo-N6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny (N6-PEG-PAPS).....	123
6.1.4. SYNTEZA ANALOGÓW PAP	124
6.1.4.1. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfoadenozyny (PAP).....	124
6.1.4.2. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfocytydyny (PCP).....	125
6.1.4.3. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfoguanozyny (PGP)	126
6.1.4.4. Synteza 5'3'-difosforanu 2'- fluoro adenozyiny (2'F-PAP)	126
6.1.4.5. Synteza 5'3'-ditiofosfonianu adenozyiny (P_sAP_s)	127
6.1.4.6. Synteza 5'3'-ditiofosfonianu-2-O-pentynylo adenozyiny (2-O-pent- P_sAP_s)	127
6.1.4.7. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfo-2-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny (N2-PEG-PAP).....	128
6.1.5. OCZYSZCZANIE SULFATAZY	129
6.1.6. SYNTEZA DESULFOSINIGRINY.....	129
6.2. BADANIA BIOLOGICZNE NAD-KAPOWANYCH RNA.....	129
6.3. METODA RP-HPLC DO OCENY WŁAŚCIWOŚCI SUBSTRATOWYCH ORAZ INHIBITOROWYCH ANALOGÓW PAPS DO SULFOTRANSFERAZ.....	131
6.4. BADANIE FLUOROWANYCH ANALOGÓW PAPS METODĄ ¹⁹ F NMR.....	131
6.5. METODA TERMOFOREZY MIKROSKALOWEJ DO WYZNACZENIA K _D ANALOGÓW PAP I PAPS	133
7. LITERATURA	134

1. WYKAZ SKRÓTÓW

AMP	5'-monofosforan adenozyiny (ang. <i>adenosine monophosphate</i>)
APS	5'-fosfosiarczan adenozyiny (ang. <i>adenosine phosphosulfate</i>)
ATP	5'-trifosforan adenozyiny (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
cAMP	cykliczny adenozynomonofosforan (ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CoA	koenzym A (ang. <i>coenzyme A</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DXO	egzonukleaza dekapująca (ang. <i>Decapping and exoribonuclease protein</i>)
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. <i>flavin adenine dinucleotide</i>)
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
mRNA	matrycowe RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
MST	termoforeza mikroskalowa (ang. <i>Microscale Thermophoresis</i>)
NAD	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. <i>nicotineamide adenine dinucleotide</i>)
NMN	mononukleotyd nikotynoamidowy (ang. <i>nicotinamide mononucleotide</i>)
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny (ang. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
Nud	białka z rodziny Nudix (ang. <i>Nucleoside diphosphate linked moiety X</i>)
PAP	5'-fosforan 3'-fosfoadenozyny (ang. <i>3'-phosphoadenosine-5'-phosphate</i>)
PAPS	5'-fosfosiarczan 3'-fosfoadenozyny (ang. <i>3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate</i>)
PDB	baza danych struktur dużych cząsteczek biologicznych (ang. <i>Protein Data Bank</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RppH	pirofosfohydrolaza RNA (ang. <i>pirofosfohydrolaza RNA</i>)
SAM	S-adenozyl-L-metionina (ang. <i>S-adenosyl methionine</i>)
ST	Sulfotransferazy (ang. <i>sulfotransferases</i>)
SOT	Sulfotransferazy roślinne
SULT	Sulfotransferazy zwierzęce

2. WPROWADZENIE

Nukleotydy adeninowe to cząsteczki występujące w organizmach żywych i pełniące wiele kluczowych funkcji w komórkach. Związki te są m.in. są materiałem budulcowym kwasów nukleinowych (DNA i RNA), regulują procesy metaboliczne zachodzące w komórkach, są nośnikami energii, biorą udział w sygnalizacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej, biorą czynny udział w reakcji utleniania-redukcji jako kofaktory stanowiące nośniki elektronów czy też, również w formie kofaktorów, umożliwiają przebieg wielu innych reakcji enzymatycznych polegających na transferze biologicznie ważnych grup funkcyjnych. Niedawne odkrycia wskazują, że dinukleotydy (oligofosforany dinukleozydów) oraz kofaktory zawierające adeninę stanowią również cząsteczki modyfikujące końce 5' RNA różnych organizmów, jednak funkcja tego typu modyfikacji nie została jeszcze wyjaśniona. Ze względu na mnogość funkcji, nukleotydy adeninowe stały się obiektem badań naukowych, które pozwoliły systematycznie odkrywać i zrozumieć procesy przebiegające w komórkach. Aby to umożliwić, nieustannie tworzone są odpowiednie narzędzia biologiczne, będące pod względem strukturalnym analogami nukleotydów adeninowych. Przykładowo, analogi ATP (5' trifosforan adenozyiny) wykorzystywane są jako narzędzia do badania enzymów z grupy kinaz, a analogi SAM (S-adenozyno-L-metionina) umożliwiają badania metylotransferaz. Mimo ogromnych sukcesów jakie zostały osiągnięte na tym polu, wiele klas nukleotydów adeninowych związanych z nimi modyfikacji kwasów nukleinowych pozostaje wciąż słabo (lub wcale) i wyeksplorowana pod kątem projektowania i syntezy funkcjonalnych analogów. W konsekwencji utrudnione jest badanie enzymów i procesów biologicznych zależnych od tych nukleotydów. Przykładami tego typu molekuł, które zwróciły moją uwagę, są wspomniane nukleotydy modyfikujące końce 5' RNA oraz analogi 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfoadenozyny (PAPS), który jest uniwersalnym kofaktorem sulfotransferaz.

Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie było zaprojektowanie i otrzymanie nowych analogów NAD (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego) oraz PAPS, jako narzędzi do badań strukturalnych i funkcjonalnych enzymów rozpoznających wymienione związki lub ich pochodne. Analogi te zostały zaprojektowane jako:

- narzędzia do modyfikacji RNA służące do badania funkcji biologicznych NAD-RNA
- uniwersalne narzędzia do badania enzymów z grupy sulfotransferaz

Ze względu na zastosowane metody eksperymentalne badania opisane w rozprawie można podzielić na dwie zasadnicze części: (i) syntetyczną opisującą proces otrzymywania analogów nukleotydów oraz (ii) biofizyczno-biochemiczną, w której otrzymane związki poddałam ewaluacji z wybranymi enzymami modelowymi. W ramach pierwszej części otrzymałam analogi kofaktorów adeninowych, które w przyszłości mogą posłużyć m.in. do badania aktywności specyficznych enzymów *in vitro* i w warunkach komórkowych, identyfikacji nowych enzymów powiązanych z tymi kofaktorami i badania lokalizacji komórkowej, lub opracowania metod poszukiwania inhibitorów o znaczeniu terapeutycznym. Drugą część stanowi opracowanie metod biofizycznych służących do ewaluacji opracowanych narzędzi oraz demonstracja przykładowych zastosowań. Dodatkowo, zdobyte na polu syntezy chemicznej doświadczenie pozwoliło mi na rozszerzenie badań o projekty poboczne takie jak otrzymanie analogów trifosforanu dinukleotydu diadeninowego, które posłużyły do badania szlaków metabolicznych roślin czy synteza analogów dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), które zostały użyte do badań strukturalnych nad egzonukleazą DXO (*ang. Decapping and exoribonuclease protein*).

W części literaturowej niniejszej rozprawy zostały omówione zagadnienia związane z funkcjami biologicznymi, syntezą i zastosowaniami kofaktorów nukleotydów adeninowych i ich analogów oraz metodami ich badania, ze szczególnym uwzględnieniem aspektów niezbędnych do zrozumienia wyników badań opisanych w części doświadczalnej niniejszej rozprawy. Część doświadczalna składa się z badań własnych, przedstawiających hipotezy badawcze, najważniejsze uzyskane wyniki i wpływające z nich wnioski oraz części eksperymentalnej, w której szczegółowo opisano procedury syntetyczne, charakterystykę otrzymanych produktów syntetycznych i eksperymenty biofizyczno-biochemiczne.

3. PRZEGLĄD LITERATUROWY

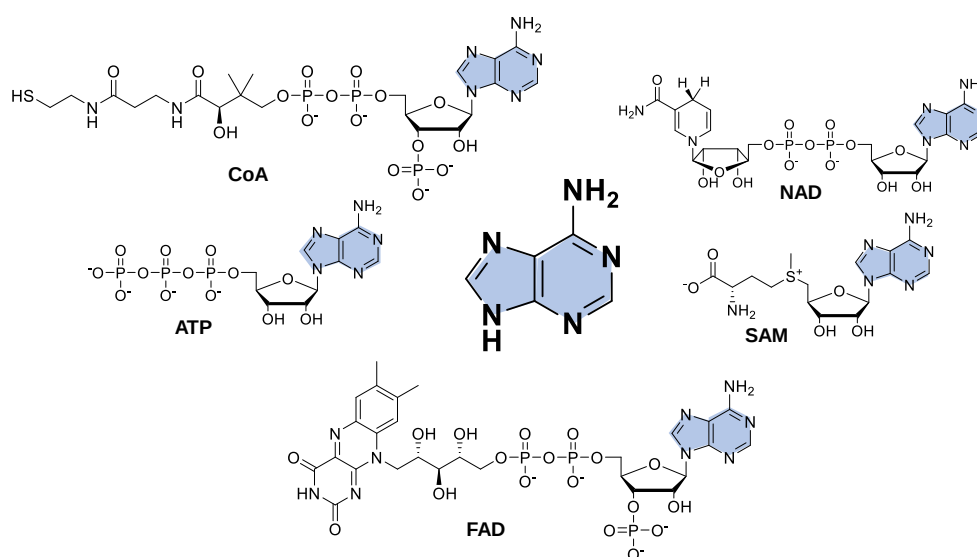
3.1. ROLA NUKLEOTYDÓW W KOMÓRCIE

Nazwa nukleotydy po raz pierwszy została wprowadzona w 1908 roku przez Levene'a¹ i wskazuje na miejsce z którego cząsteczki te zostały po raz pierwszy wyizolowane tj. *nuklei*, czyli jądro komórkowe. Są to związki organiczne zbudowane z reszty fosforanowej oraz pentozy (rybozy lub deoksyrybozy) połączonej wiązaniem N-glikozydowym z zasadą azotową, najczęściej adeniną, guaniną, cytozyną, tyminą lub uracylem. Te „kanoniczne” zasady azotowe mają zdolność do łączenia się w tzw. pary zasad poprzez wiązania wodorowe. Jest to niezwykle istotna cecha, z której wynika najbardziej znana funkcja nukleotydów – stanowią jednostkę budulcową kwasów nukleinowych - DNA i RNA. Jednakże nukleotydy pełnią również szereg innych, kluczowych funkcji w komórkach. Należą do nich: regulacja procesów metabolicznych, magazynowanie energii (ATP), sygnalizacja wewnątrz- i zewnątrzkomórkowa (cAMP, Ap_nA^2 , Ap_nN) oraz udział (w formie kofaktorów) w reakcjach enzymatycznych przebiegających w komórkach (np. NAD, FAD, CoA). W swojej rozprawie doktorskiej skupiłam się na grupie kofaktorów adeninowych, które stanowią szczególną podklasę nukleotydów.

3.2. KOFAKTORY ADENINOWE - WPROWADZENIE

Enzymy, czyli białka będące katalizatorami reakcji przebiegających w komórkach, są jednym z kluczowych elementów komórkowych szlaków biochemicznych. W swojej strukturze posiadają tzw. miejsce aktywne, w którym zachodzi wiązanie ściśle określone pod względem budowy substratu lub grupy substratów. Aktywność wielu enzymów jest dodatkowo zależna od obecności małych, niebiałkowych cząsteczek tzw. kofaktorów. Kofaktory charakteryzuje złożoność strukturalna – mogą to być zarówno jony metali np. Mg^{2+} , jak i kompleksy metaloorganiczne, takie jak kobalamina lub hem. Ze względu na poziom powinowactwa do enzymu, kofaktory dzielą się na dwie grupy: koenzymy oraz grupy prostetyczne. Grupy prostetyczne stanowią kofaktory silnie związane z enzymem, co oznacza, że pozostają w miejscu aktywnym przez wiele cykli katalitycznych. Koenzymy, czyli cząsteczki niekowalencyjnie związane z enzymem, są uwalniane z kieszeni wiążącej enzymu po jednym cyklu katalitycznym. Przykładami koenzymów są np. NAD, cząsteczka ATP (nośnik grupy fosforanowej, czyli uniwersalny

nośnik energii), SAM, CoA (koenzym A; donor grup acylowych, bierze udział w metabolizmie kwasów karboksylowych)³ (**Rys. 1**). Istnieją również związki, które w zależności od enzymu z którym oddziałują mogą pełnić rolę grupy prostetycznej lub koenzymu. Takim związkiem jest np. FAD, który jako koenzym bierze udział w reakcjach utleniania-redukcji (nośnik elektronów)^{4, 5} lub jako grupa prostetyczna, kowalencyjnie wiąże się z wieloma enzymami z grupy m.in. oksyreduktaz⁶. Jak można zauważyć wymienione przeze mnie przykłady to przede wszystkim nukleotydy adeninowe będące tematem mojej rozprawy doktorskiej. Niniejsza rozprawa poświęcona jest w szczególności dwóm niezwykle ważnym związkom należącym do grupy kofaktorów adeninowych: NAD oraz PAPS.



Rys. 1. Przykładowe kofaktory adeninowe.

Najbardziej znaną funkcją pierwszej z wymienionych cząsteczek, NAD, jest udział w procesach utleniania – redukcji zachodzących w komórkach np. katabolizmie aminokwasów, utlenianiu kwasów tłuszczowych czy w cyklu mocznikowym. Enzymami zaangażowanymi w te procesy są m.in. oksyreduktazy, które poprzez przeniesienie wodoru na NAD (w wyniku czego powstaje zredukowana forma NAD; **Rys. 3**.) katalizują utlenienie substratu⁷. Związek ten jest również kofaktorem lub substratem wielu innych enzymów komórkowych, takich jak deacetylazy białkowe, sirtuiny czy ADP-rybozylotransferazy, a kolejne jego nowe funkcje są wciąż odkrywane⁸. Jedno z najnowszych odkryć związanych z NAD, powiązało tę strukturę ze światem RNA. W roku 2009 zespół Davida Liu opublikował pracę wykazującą obecność struktury NAD jako zabezpieczającego „kapu” na końcu 5’ bakteryjnych RNA⁹. W kolejnych latach

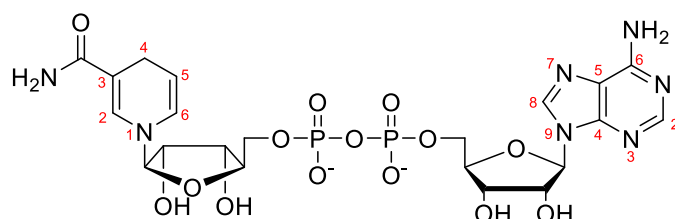
struktura ta została znaleziona również na końcu 5' RNA również u innych organizmów, w tym eukariontów i ssaków. Dotychczas wykazano, że u bakterii obecność cząsteczki 5'-NAD kapu zwiększa stabilność RNA poprzez zmniejszenie jego podatności na działanie specyficznych pirofosfataz. Odwrotna sytuacja ma miejsce u eukariontów, gdzie obecność NAD kapu na 5'-końcu RNA ułatwiać jego degradację¹⁰. Badania te pokazują, że rola NAD-kapu jest inna dla każdego typu organizmów i pomimo rosnącej liczby nowych narzędzi analitycznych i chemicznych pozostaje w ogromnej mierze nieznana.

Badania nad drugą ze wspomnianych wyżej cząsteczek, PAPS, stanowiły główną część mojej rozprawy doktorskiej. Cząsteczka PAPS jest uniwersalnym donorem aktywnego siarczanu w komórkach co oznacza, że jego obecność jest niezbędna do przebiegu reakcji sulfurylacji (siarczanowania). Tym samym PAPS ma wpływ na tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej, modyfikację białek i metabolizm biomolekuł m.in. steroidów czy ksenobiotyków. Grupa enzymów zaangażowana w metabolizm siarczanów w komórce, katalizująca procesy sulfurylacji z udziałem PAPS to sulfotransferazy. Funkcje katalityczne sulfotransferaz ingerują w szereg istotnych zjawisk takich jak detoksykacja organizmu, metabolizm leków, regulacja gospodarki hormonalnej, rozpoznanie molekularne w procesach immunologicznych, czy kontrola poziomu neuroprzekaźników. Niedawne odkrycia wskazują również, że enzymatyczna sulfurylacja odgrywa ważną rolę w infekcjach wirusowych, np. wirusem HIV¹¹ (*ang. Human Immunodeficiency Virus*). Istotę prowadzonych przeze mnie badań stanowi fakt, że pomimo ważnej roli jaką pełnią sulfotransferazy w różnych organizmach dotychczas nie opracowano narzędzi na bazie uniwersalnego kofaktora, PAPS, które umożliwiłyby zastosowanie nowoczesnych metod chemii biologicznej i medycznej do badania tych enzymów. Jedną z prawdopodobnych przyczyn pomijania cząsteczki PAPS w tworzeniu narzędzi molekularnych jest wysoka niestabilność wiązania fosfosiarczanowego oraz wynikające z tego trudności w syntezie. Niezwykle ważna rola PAPS oraz brak narzędzi opartych na jego strukturze zainspirowały mnie do zgłębienia tego tematu w niniejszej rozprawie doktorskiej.

3.3. NAD

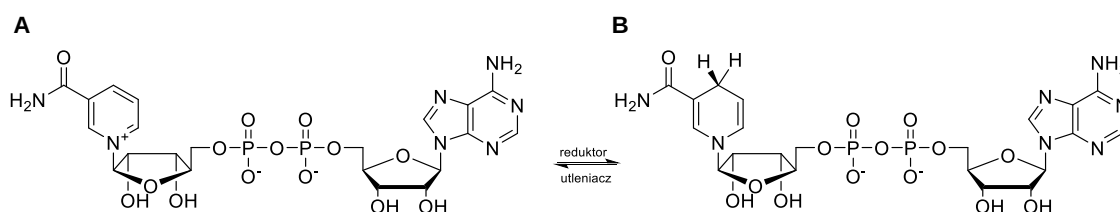
3.3.1. STRUKTURA I FUNKCJA BIOLOGICZNA W KOMÓRCIE

Dinukleotyd nikotynamido-adeninowy, odkryty ponad 100 lat temu został od tego czasu gruntownie przebadany. Udowodniono, że jest bardzo ważną biomolekułą o wielu funkcjach biologicznych. Pojedyncza cząsteczka NAD składa się z dwóch podjednostek nukleotydowych – nukleotydu nikotynoamidowego oraz 5'-monofosforanu adenozyiny (**Rys. 2**).



Rys. 2. Struktura NAD z zaznaczoną numeracją atomów zasad azotowych.

Właściwości oraz funkcje, które pełni w komórce NAD są związane z najbardziej reaktywną częścią całej cząsteczki, czyli pierścieniem nikotynoamidowym. NAD występuje w komórkach w dwóch formach, zredukowanej (NADH) oraz utlenionej (NAD⁺) (**Rys. 3**). Forma zredukowana posiada w obrębie pierścienia nikotynoamidowego dodatkowy atom wodoru przy atomie węgla C4 oraz wolną parę elektronową. Łatwość przejścia z jednej formy do drugiej czyni z cząsteczki NAD jeden z kluczowych kofaktorów reakcji utleniania redukcji przebiegających w komórkach.



Rys. 3. Dwie formy cząsteczki NAD. **A)** utleniona **B)** zredukowana.

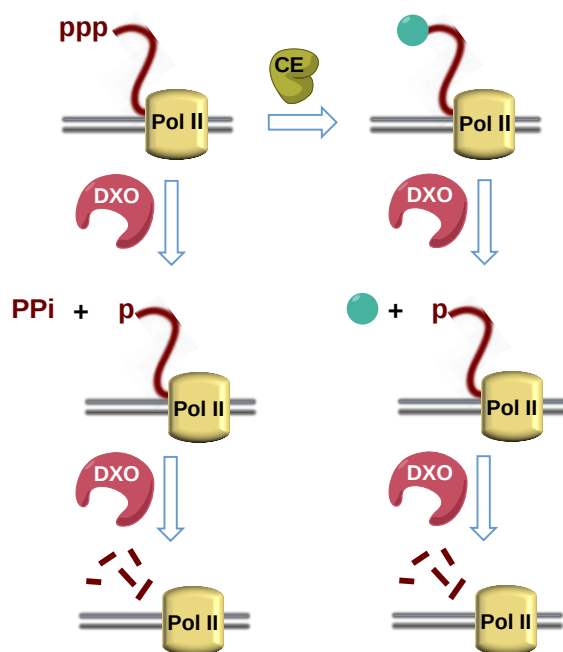
Rola nośnika elektronów w biotransformacjach redox nie jest jedyną jaką NAD pełni w komórkach. Cząsteczka ta służy również jako substrat do potranslacyjnej modyfikacji białek (poli (ADP-rybozylacja, deacetylacja), transdukcji sygnału (jako prekursor cyklicznej rybozy ADP)¹² oraz, jak wykazano ostatnio, jako modyfikacja 5' - końca w niektórych RNA⁹. Po raz pierwszy NAD RNA zostały zidentyfikowane u bakterii⁹ i zostały nazwane "czapczkami bakteryjnymi" co wynika ze strukturalnej analogii do czapczki 7-metyloguanozyny obecnej na 5' -końcu eukariotycznego mRNA. Co

zaskakujące w ostatnich latach potwierdzona została obecność NAD-RNA również u innych organizmów¹⁰ m.in. ssaków. Najnowsze badania wskazują, że NAD-kapowane RNA stanowią ~1 pmol/50 µg całkowitego RNA obecnego w ludzkich transkryptach cytoplazmatycznych¹³ i nawet 10% transkryptów mitochondrialnych¹⁴. Biologiczne role tej nowej, fascynującej modyfikacji RNA pozostają nieuchwytnie i prawdopodobnie różnią się między organizmami, niemniej jednak ustalono, że zarówno u bakterii, jak i u eukariontów, 5'-terminalna cząsteczka NAD wpływa na stabilność RNA.

3.3.2. ENZYMY ROZPOZNAJĄCE NAD JAKO SUBSTRAT

Jak już wspomniałam cząsteczka NAD jest niezwykle ważnym kofaktorem obecnym zarówno w organizmach eukariotycznych jak i prokariotycznych. Jego najbardziej znaną funkcją jest udział w komórkowych procesach redoks jest jednak rozpoznawany przez szereg innych białek, nienależących do grupy oksyreduktaz. Należą do nich m.in. polimerazy poli (ADP-rybozy), występujące w jądrze, które wykorzystują NAD do naprawy uszkodzeń obecnych w nici DNA¹⁵. Rodzina enzymów rozpoznających NAD jest ogromna, co sprawia, że cząsteczka ta jest zaangażowana w takie procesy jak apoptoza, reakcja na stres, odpowiedź immunologiczna i wiele innych. Jak dotąd najmniej poznane są funkcje biologiczne NAD występującego na końcach RNA. W *E.coli* obecność cząsteczki 5'-NAD prawdopodobnie zwiększa stabilność RNA poprzez zmniejszenie jego podatności na działanie bakteryjnej pirofosfatazy¹⁶, RppH (*ang. RNA pyrophosphohydrolase*), która bierze udział w defosforylacji 5'-trifosforanu RNA do 5'-monofosforanu, uruchamiając tym samym proces degradacji od końca 5'. Jednak NAD-RNA są również rozpoznawane przez NudC (*ang. Nudix hydrolase homolog C*), enzym bakteryjny zdolny do specyficznego 5'-deNADingu RNA *in vitro* i *in vivo* poprzez rozszczepienie wiązania pirofosforanowego¹⁷.

W przeciwieństwie do bakterii, u Eukariontów obecność NAD na końcu 5' wydaje się destabilizować RNA i być czynnikiem kierującym RNA do degradacji. Rozpad inicjowany jest przez usunięcie całej 5'-terminalnej cząsteczki NAD przez nukleazę DXO, która hydrolizuje pierwsze wiązanie fosfodiesterowe w RNA¹⁰. W kolejnym etapie degradacji DXO wykazuje aktywność katalityczną egzonukleazy, rozkładając mRNA od końca 5' do 3'. Co istotne, funkcją wspomnianego enzymu jest nie tylko degradacja dojrzałego RNA, ale również kontrola poziomu niekompletnych (nie posiadających właściwej struktury kapu na końcu 5') lub wadliwych transkryptów RNA (**Rys. 4**)¹⁸.

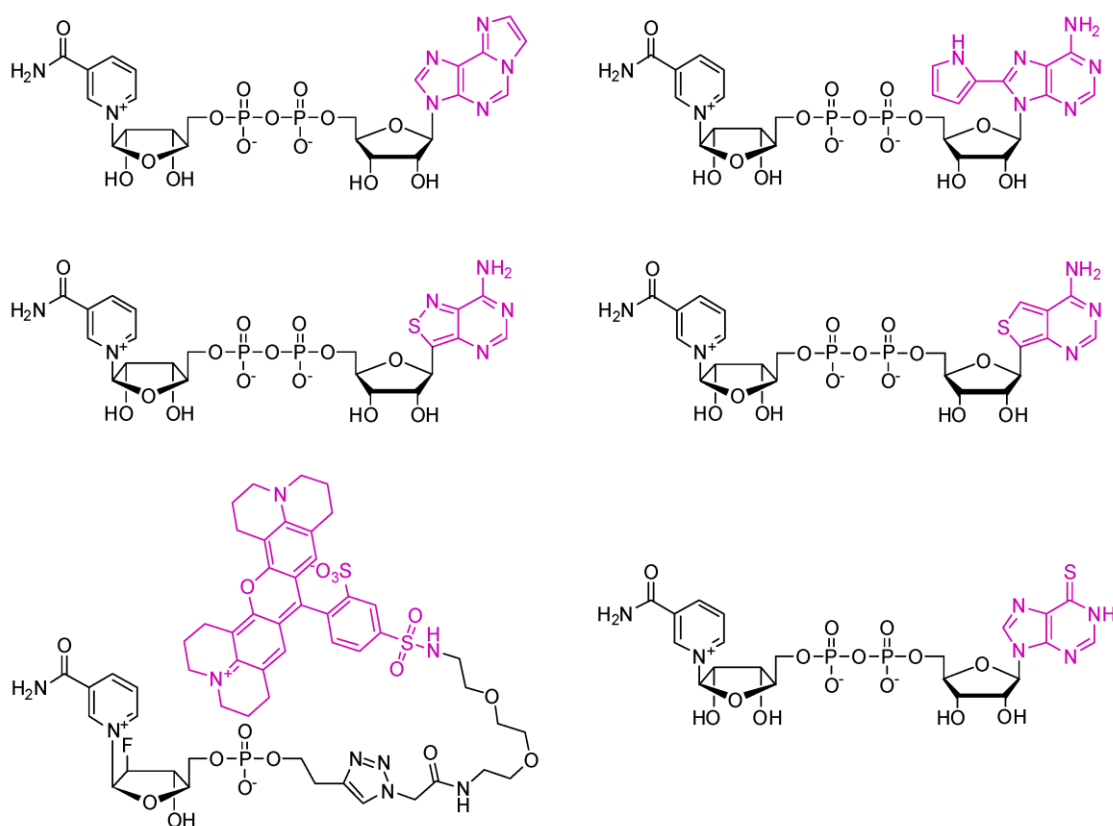


Rys. 4. DXO jako enzym degradujący nie w pełni dojrzałe, wadliwe mRNA oraz posiadający funkcję 5'-3- egzonukleazy RNA.

Pirofosfataza Nudt12 (*ang. Nudix-type motif 12*), eukariotyczny homolog NudC, również degraduje NAD-RNA *in vitro* i przyczynia się do rozpadu NAD-RNA w komórkach ludzkich¹⁹. Znajdujący się m.in. w cytoplazmie Nudt12 powoduje hydrolizę wiązania difosforanowego w wyniku czego powstaje mononukleotyd nikotynamidowy (NMN) i 5' monofosforan RNA. Zarówno DXO jak i Nudt12 są enzymami degradującymi NAD-RNA jednak sposób, w jaki enzymy te rozróżniają i preferencyjnie wiążą NAD-RNA jest pytaniem na które nie ma jeszcze odpowiedzi¹⁹. Dodatkowo, pomimo rosnącej liczby nowych narzędzi chemicznych i biologicznych do badania cząsteczek NAD-RNA²⁰, ich znaczenie biologiczne oraz rola NAD-RNA w różnych organizmach pozostaje niejasne. Jednym z najważniejszych pytań jest to, czy modyfikacja ta pełni specyficzne funkcje biologiczne w komórkach, np. działa jako odpowiedź sygnalizacyjna na warunki stresowe, czy też jest jedynie wynikiem nieprawidłowej inicjacji transkrypcji, która jest szybko eliminowana przez mechanizmy obronne komórki.

Aby ułatwić badania nad procesami, w które zaangażowane jest NAD naukowcy od wielu lat tworzą analogi NAD jako narzędzia do badań funkcjonalnych i strukturalnych, sondy fluorescencyjne do monitorowania działania enzymów rozpoznających NAD, narzędzia do lokalizacji i wizualizacji aktywności polimeraz poli-ADP-rybozy, czy jako potencjalne środki terapeutyczne. W kontekście poszukiwania takich narzędzi, istotną cechą NAD są jego właściwości optyczne. Forma zredukowana i utleniona wykazują inne

właściwości absorpcyjne i emisyjne (NADH: ab. 340 nm, em. 460 nm; NAD⁺: ab. 260 nm, em.-) co wykorzystuje się do monitorowania aktywności wybranych enzymów rozpoznających strukturę NAD²¹. Ograniczeniem w szerszym zastosowaniu jest jednak stosunkowo niska wydajność kwantowa NADH i brak emisji dla NAD⁺. Fakt ten wymusił dalsze poszukiwania fluorescencyjnych analogów NAD, które będą wykazywały lepsze właściwości emisyjne od niemodyfikowanego NAD. W literaturze można znaleźć wiele analogów NAD, modyfikowanych w obrębie adenozyiny (pozycje C6, C8)^{22, 23} lub obejmujących zastąpienie 5'-monofosforanu adenozyiny (AMP) fluoroforem²⁴ (**Rys. 5**).



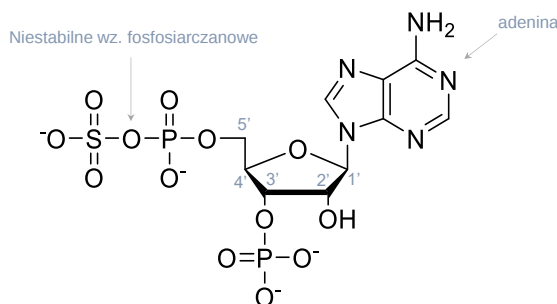
Rys. 5. Struktury fluorescencyjnych analogów NAD, będących sondami fluorescencyjnymi służącymi do badania enzymów zależnych od NAD. Zaczepnięto z pracy Depaix i wsp.²¹

3.4. PAPS

3.4.1. STRUKTURA I ROLA BIOLOGICZNA W KOMÓRCIE

W roku 1956 Robbins i wsp. po raz pierwszy wyizolowali i opisali nową cząsteczkę, PAPS, czyli biologicznie aktywną formę nieorganicznego siarczanu.²⁵ Struktura PAPS składa się z adenozyiny połączonej wiązaniem fosfodiesterowym z resztą kwasu fosforowego w pozycji 3' oraz resztą fosfosiarczanową w pozycji 5' (**Rys. 6**). Bezwodnik fosfosiarczanowy jest nietypowym wiązaniem wysokoenergetycznym pomiędzy grupą

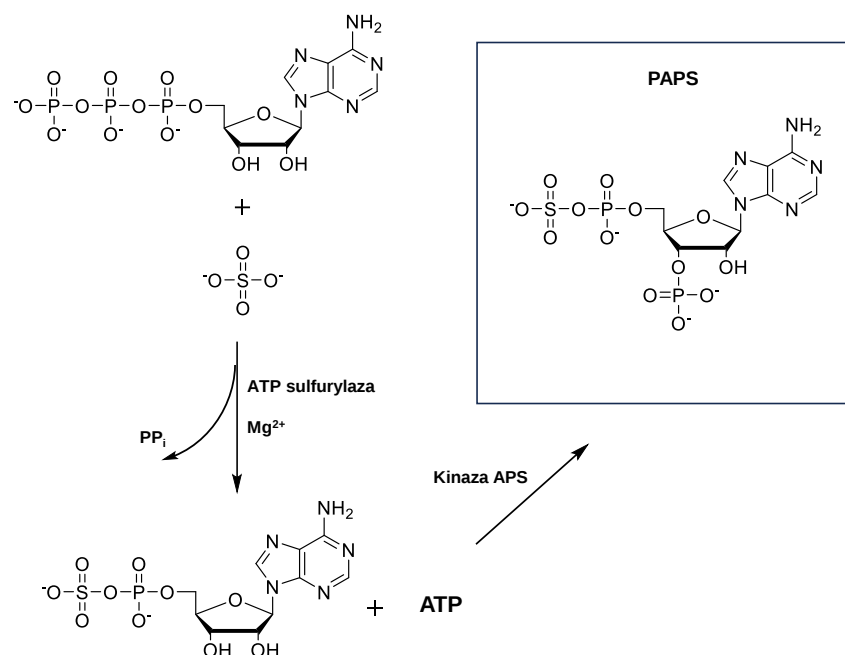
fosforanową a grupą siarczanową. Jest to wysoce niestabilne wiązanie o czym świadczy fakt, że podczas jego hydrolizy uwalniana jest energia o tym samym rzędzie wielkości co w przypadku ATP, cząsteczki będącej nośnikiem energii w komórce (hydroliza jednego wiązania bezwodnika fosforanowego w ATP uwalnia około -36 kJ/mol energii²⁶).



Rys. 6. Struktura PAPS.

3.4.2. SYNTEZA PAPS W KOMÓRCIE

Biosynteza cząsteczki PAPS u eukariontów przebiega w cytozolu i wymaga obecności nieorganicznego siarczanu. Homeostaza tego składnika jest zapewniona m.in. w wyniku sulfoksydacji aminokwasów zawierających siarkę, tj. cysteiny i metioniny, wchłaniania jelitowego nieorganicznego siarczanu, degradacji makrocząsteczek zawierających siarczany oraz aktywności sulfataz.²⁷ Synteza PAPS jest procesem dwuetapowym. Pierwszym etapem jest przyłączenie nieorganicznego siarczanu do cząsteczki ATP w obecności jonów Mg^{2+} . Reakcja ta jest katalizowana przez sulfurylazę ATP i prowadzi do powstania produktów: 5'-fosfosiarczanu adenozyiny (APS) oraz pirofosforanu. Jest to etap wysoce endoenergetyczny dlatego też równowaga kinetyczna reakcji znajduje się po stronie substratów²⁸. W kolejnym etapie syntezy bierze udział powstały w pierwszym etapie APS oraz cząsteczka ATP, a cały proces katalizowany jest przez kinazę APS (**Rys. 7**)^{27, 29}. Stężenie nieorganicznego siarczanu jest różne w zależności od miejsca występowania komórek, ich wieku, pory dnia czy chorób i może stanowić czynnik limitujący syntezę PAPS (to stwierdzenie jest prawdziwe w przypadku zwiększonego zapotrzebowania na PAPS; gdy komórka znajduje się w stanie równowagi większe stężenie nieorganicznego siarczanu nie prowadzi do zwiększenia poziomu PAPS w komórce). Cząsteczki PAPS są degradowane w samym cytozolu lub transportowane do wnętrza aparatu Golgiego.

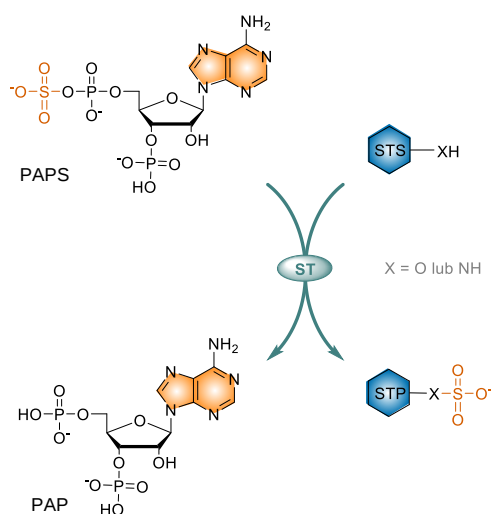


Rys. 7. Schemat biosyntezy cząsteczki PAPS w komórce.

3.5. ENZYMY ROZPOZNAJĄCE PAPS JAKO SUBSTRAT – SULFOTRANSFERAZY

3.5.1. FUNKCJE I KONSEKWENCJE ZABURZEŃ AKTYWNOŚCI

Sulfotransferazy (ST) jest to grupa enzymów, które katalizują przenoszenie grup sulfurylowych (SO_3^{2-}) z uniwersalnego donora, PAPS, na nukleofilowe akceptory posiadające w swojej strukturze ugrupowanie hydroksylowe lub aminowe. Produktem tej reakcji jest cząsteczka 5'-fosforan-3'-fosfoadenozyny (PAP), będąca jednocześnie naturalnym inhibitorem sulfotransferaz (**Rys. 8**)³⁰.



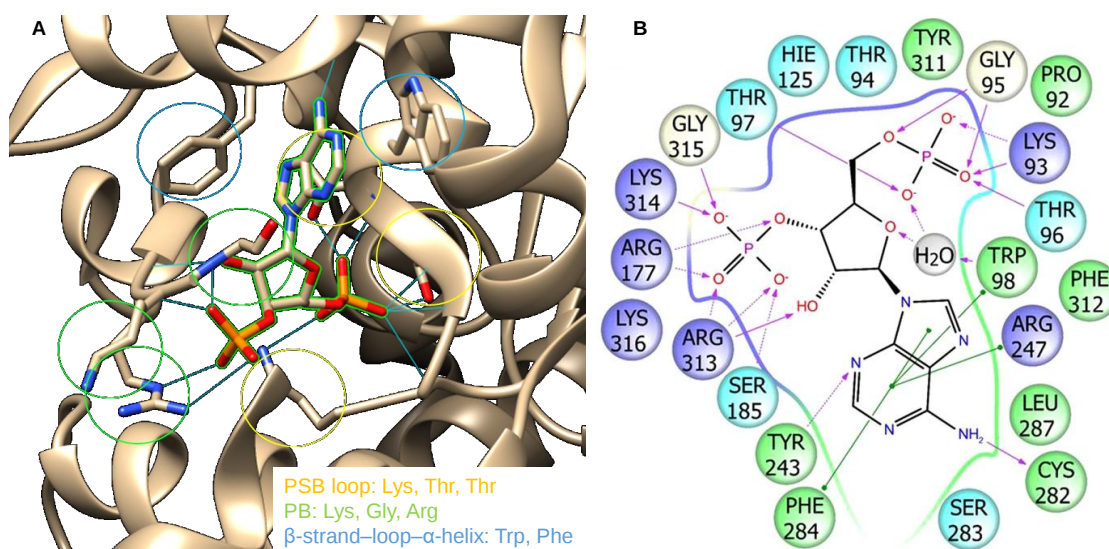
Rys. 8. Schemat reakcji katalizowanej przez ST.

Reakcje katalizowane przez ST zachodzą we wszystkich żywych organizmach, w tym u bakterii, roślin i zwierząt. Klasyfikacja sulfotransferaz wynika z ich pochodzenia (roślinne - SOT lub zwierzęce - SULT), miejsca przebiegu reakcji sulfurylacji tj. w cytozolu lub w błonach aparatu Golgiego³¹ lub powinowactwa do substratów. Sulfotransferazy międzybłonowe, zlokalizowane w aparacie Golgiego, odpowiadają za sulfurylację białek, proteoglikanów oraz glikolipidów. Mimo, że wiedza na ich temat jest bardzo ograniczona wiadomo, że mają kluczowe znaczenia w procesie wnikania wirusów do komórek, adhezji leukocytów i antykoagulacji^{32, 33}. Niniejsza rozprawa związana jest w głównej mierze z ST cytozolowymi dlatego też im poświęcę uwagę w opracowaniu literaturowym. Ze względu na podobieństwo w sekwencji aminokwasów oraz funkcję katalityczną, ST można podzielić na dwie grupy: fenolowe (SULT1) i steroidowe (SULT2). W literaturze pojawiły się doniesienia o nowej grupie ST, SULT4A1, której ekspresja zachodzi w mózgu jednakże jej funkcja pozostaje nieznana. Klasyfikacja ST jest trudna (i pozostaje kwestią sporną wśród naukowców) ze względu na szeroką specyficzność substratową jaką charakteryzują się ST. W 1998 roku Her zaproponował wprowadzenie systemu klasyfikacji, którym będę posługiwała się w poniższej rozprawie³⁴(**Tabela 1**).

Tabela 1. Klasyfikacja, specyficzność substratowa i dystrybucja ST. Dane w tabeli zaczerpnięte z pracy Her i wsp. oraz Glatt i wsp.^{34, 35}

Ludzkie sulfotransferazy cytozolowe							
Oryginalna nomenklatura enzymu	Proponowana przez Her i współp.		Substraty		Dystrybucja tkankowa		
TS PST1	SULT1A1		p-nitrofenol, dopamina, 2-naftol jodotyroniny		Bardzo wysoka w wątrobie, płytki krwi, endometrium, mózg		
TS PST2	SULT1A2		p-nitrofenol,		wątroba		
TL PST	SULT1A3		dopamina, tyramina, serotonina		Jelita, płytki krwi, łożysko, mózg		
ST1B2	SULT1B1		1-Naftol, p-nitrofenol jodotyroniny		Jelito grube		
EST	SULT1E1		17β-Estradiol, Androstenediol, DHEA		Wątroba, endometrium,jelita, piersi		
SULT1C1	SULT1C1		p-nitrofenol		Nerki, żołądek		
DHEA ST	SULT2A1		DHEA, 17β-Estradiol, Androstenediol,		Wątroba, nadnercza, jelita		
SULT2B1a	-		Pregnenolon,		Łożysko, prostata		
SULT2B1b	SULT2B1		17β-hydroksypregnenolon				
% podobieństwa sekwencji aminokwasów ludzkich SULT							
1A1							
1A2	95						
1A3	93	90					
1B1	54	54	53				
1C1	52	53	52	53			
1E1	51	51	50	56	48		
2A1	37	38	38	39	36	37	
2B1a	41	38	42	38	37	35	48
2B1b	39	37	40	38	37	35	48
	1A1	1A2	1A3	1B1	1C1	1E1	2A1

Dotychczas scharakteryzowano 11 ludzkich sulfotransferaz cytozolowych. Strukturalnie są to pojedyncze białka globularne, których formę katalityczną stanowi homodimer. Składają się z równoległej, pięcioniciowej β – kartki otoczonej przez α helisy³⁶. Pierwszą rozwiązana strukturą była mysia SULT1E1³⁷ zaś do dnia dzisiejszego w bazie PDB (*ang. Protein Data Bank*) można znaleźć aż 138 rozwiązanych struktur krystalograficznych sulfotransferaz. Kieszeń wiążąca PAPS wykazuje wysokie podobieństwo na poziomie aminokwasów dla każdego z enzymów. Za wiązanie cząsteczki kofaktora odpowiadają trzy regiony: pętla wiążąca 5'-fosfosiarcezan (*ang. PSB loop*), pętla wiążąca 3'-fosforan (*ang. PB loop*) i motyw β -strand-loop- α -helix (**Rys. 9A**; pętle zaznaczone są na rysunku kolorami, odpowiednio: żółtym, zielonym i niebieskim). Reszty aminokwasowe, tj. grupa aminowa lizyny oraz atom tlenu grupy hydroksylowej w treoninie, tworzą wiązania wodorowe z 5'-fosforanem. Adenina tworzy oddziaływania typu π - stacking z resztą tryptofanu oraz fenyloalaniny. Za stabilizację reszty fosforanowej w pozycji 3' odpowiadają wiązania wodorowe z lizyną, glicyną oraz arginina (**Rys. 9.B**).

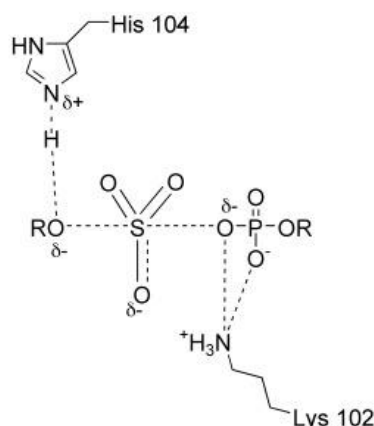


Rys. 9. A: Kieszeń wiążąca cząsteczkę PAP białka AtSOT18 z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi stabilizującymi PAP oraz aminokwasami biorącymi udział w wiązaniu. **B:** Miejsce wiązania PAP z zaznaczonymi oddziaływaniami typu π - π stacking (zielone linie) i wiązaniami wodorowymi (fioletowe strzałki). Zaczepnięto z Hirschmann i wsp.³⁸.

Co ciekawe zamiana fosforanu z pozycji 3' na 2' skutkuje znacznym zwiększeniem stałej Michaelisa-Menten, K_M (tj. słabszym powinowactwem ligandu do białka) np. dla SULT1A1 zmiana wartości K_M z 0,4 na 2,3 μM ³⁹.

Najbardziej prawdopodobny mechanizm siarczanowania substratu przebiega na drodze dysocjacji, którą wspomagają aminokwasy obecne w kieszeni wiążącej m.in.

lizyny, stabilizująca ładunki ujemne grupy fosforanowej czy histydyna wspomagająca deprotonację grupy hydroksylowej (lub aminowej) substratu (**Rys. 10**).



Rys. 10. Mechanizm przeniesienia grupy siarczanowej z cząsteczki PAPS na produkt. Zacerpnięto z pracy Chapman i wsp.³²

W literaturze pojawiły się doniesienia, że PAPS pełni funkcję regulatora allosterycznego⁴⁰ dla ST. Wang i wsp. zaproponowali, że w enzymie SULT1A1 w formie niezwiązanej (apo) miejsca aktywne są otwarte. Po przyłączeniu jednej cząsteczki PAPS, miejsce akceptorowe wiążące substrat ulega zmianie sterycznej, co uniemożliwia wiązanie się dużych cząsteczek substratu i dostęp do miejsca aktywnego mają jedynie małe biomolekuły. Przyłączenie cząsteczki PAPS do pierwszej podjednostki homodimeru SULT1A1 powoduje 81-krotne zmniejszenie powinowactwa kolejnej cząsteczki PAPS do drugiej podjednostki enzymu. Przyłączenie kolejnej cząsteczki PAPS powoduje „otwarcie” miejsc wiążących substrat w obu podjednostkach i oznacza zwiększenie wydajności katalitycznej enzymu. W tkankach w których występuje wysokie stężenie PAPS sulfotransferaza osiąga najwyższą specyficzność substratową (zarówno duże jak i małe biomolekuły mają dostęp do miejsca aktywnego) oraz wydajność katalityczną. Opisany mechanizm oraz podobieństwa w strukturze powodują, że analogi PAPS mogą stanowić uniwersalne narzędzie do badania i przyczynić się do lepszego poznania ST.

Występowanie ST stwierdzono w tkankach aktywnych metabolicznie m.in. płucach, mózgu, płytkach krwi, nerkach czy wątrobie⁴¹. Wysoka ekspresja w płucach, wątrobie, nerkach i jelicie cienkim sugeruje ważną rolę sulfurylacji w detoksykacji i aktywacji metabolicznej małych biomolekuł takich jak ksenobiotyki, neurotransmitery czy hormony, tym samym świadcząc o bezpośrednim zaangażowaniu sulfotransferaz w takie procesy jak regulacja równowagi hormonalnej (aktywacja lub inaktywacja hormonów), rozpoznawanie molekularne i sygnalizacja komórkowa. Wynika to z faktu, że w pH fizjologicznym grupa siarczanowa jest zjonizowana ($pK_a \sim 1,5$) powodując, że

sulfurylacja zwiększa rozpuszczalność związków organicznych w wodzie i zmniejsza ich zdolność do penetracji błon komórkowych.

Co ciekawe, ekspresja niektórych ST u ludzi zmienia się wraz z wiekiem. Przeprowadzono badania poziomu SULT1A1, SULT1A2 i SULT1A3 w wątrobie, płucach i mózgu. Wykazały one, że SULT1A3 (odpowiadający za metabolizm katecholamin) ulega wysokiej ekspresji w wątrobie płodu, w przeciwieństwie do wątroby dorosłego człowieka, gdzie poziom tego enzymu jest znikomy. Ekspresja SULT1A3 i SULT1A1 była wysoka również w płucach płodu, natomiast ich aktywność była znacznie zmniejszona w próbkach pobranych po urodzeniu. Dane te potwierdzają, że aktywność enzymów SULT1A1, jak i SULT1A3, pełni ważną rolę w procesach detoksykacji podczas kluczowych etapów rozwoju. Ich obecność jest szczególnie ważna w przypadku braku innego głównego układu enzymów detoksykujących⁴².

Zazwyczaj forma sulfurylowana substratu stanowi formę nieaktywną (choć występują też wyjątki). Zaburzenia aktywności sulfotransferaz oraz niezdolność do utrzymania równowagi między formą aktywną oraz nieaktywną jest ściśle związana wieloma poważnymi chorobami takimi jak:

- Nowotwory np. piersi; w większości komórek linii komórkowych raka piersi stwierdzono brak ekspresji SULT1E1 odpowiedzialnej za siarczanowanie estrogenu (forma nieaktywna) z nanomolarnym powinowactwem⁴³⁻⁴⁵.
- chorobami neurodegeneracyjnymi^{46, 47} np. choroba Parkinsona, czy Alzheimer; SULT1A3 odpowiada za metabolizm toksycznej dla komórki dopaminy obecnej w cytozolu⁴⁸
- Chorobami ginekologicznymi np. endometrioza, adenomioza i mięśniaki macicy (SULT1E, SULT2A1, SULT2B1 odpowiadają za metabolizm estrogenów)⁴⁹
- Hemofilia (sulfurylacja tyrozyny przez TPST (*ang. Tyrosylprotein sulfotransferase*) umożliwia wiązanie się czynnika VII odpowiedzialnego za krzepliwość krwi)⁵⁰.

3.5.2. METODY BADANIA SULFOTRANSFERAZ

W poprzednich rozdziałach opisałam rolę i znaczenie ST w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Mimo iż w ostatnich latach pojawia się coraz więcej metod opracowanych w celu lepszego poznania tej grupy, pole do eksploracji wciąż pozostaje ogromne. Jednymi z najbardziej popularnych i najstarszych metod badania aktywności ST są metody oparte na znakowaniu radioizotopowym. Metody te opierają się na

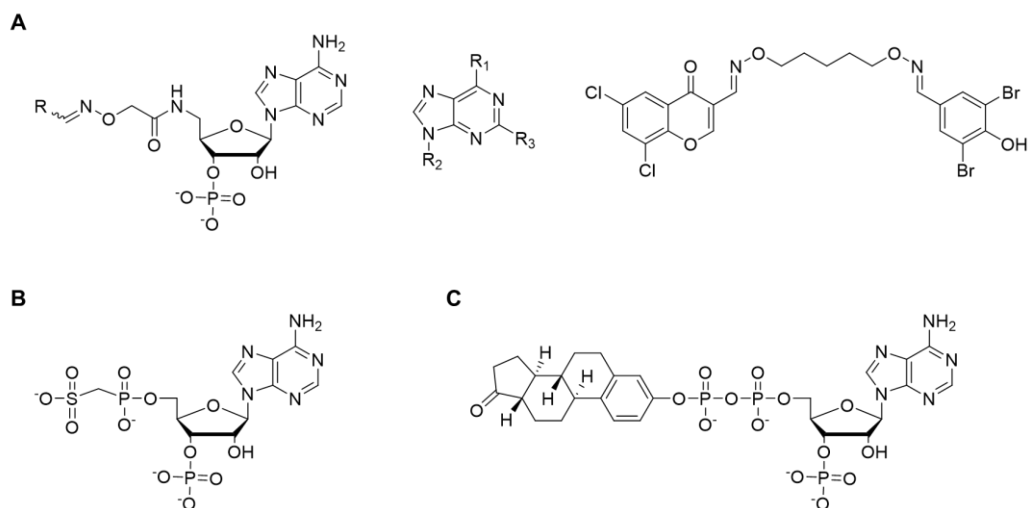
zastosowaniu w reakcjach katalizowanych przez ST analogu PAPS, w którym atom siarki został podstawiony izotopem ^{35}S . W połączeniu z odpowiednio dobranymi technikami chromatograficznymi, umożliwia to detekcję produktów sulfurylacji metodami radiograficznymi. Zaletą tego podejścia jest jego uniwersalność wynikająca z tego, że bazuje ona na naturalnym kofaktorze wszystkich sulfotransferaz. Dodatkowo metody radioizotopowe zapewniają wysoką czułość i szybkość. Wadą jest natomiast konieczność opracowania odpowiedniego sposobu oddzielenia nieprzereagowanego znakowanego PAPS od substratów i produktów reakcji enzymatycznej. W przypadku sulfotransferaz cytozolowych, dla których substratami są najczęściej cząsteczki hydrofobowe, używane są metody filtracji żelowej, chromatografia powinowactwa, czy wysokosprawna chromatografia cieczowa. Większy problem stanowią sulfotransferazy międzybłonowe, które przekształcają hydrofilowe substraty w jeszcze bardziej hydrofilowe produkty. Kolejną wadą jest koszt $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$, który wynosi około 500€/5 mg związku oraz stosunkowo krótki czas półtrwania izotopu ^{35}S . Alternatywą dla znakowania radioizotopowego są metody oparte na zjawisku fluorescencji, które jednocześnie stanowią najliczniejszą grupę z opracowany dotąd metod służących do badania sulfotransferaz. Ich zaletą jest wysoka czułość, szybkość, mają zastosowanie w badaniach przesiewowych wysokiej przepustowości (ang. *HTS – High Throughput Screening*) oraz mogą być stosowane do monitorowania reakcji enzymatycznych w czasie rzeczywistym. Znakowany fluorescencyjnie może być zarówno substrat (lub jego analog)^{51, 52}, sulfotransferaza jak i uwolnione w trakcie reakcji koprodukty⁵³. Wart uwagi jest jednak fakt, że znakowane fluorescencyjnie związki często są wyzwaniem syntetycznym a ich synteza wymaga wiele czasu, jest kosztowna lub w niektórych przypadkach wręcz niemożliwa do przeprowadzenia. Dodatkowo istnieje ryzyko, że modyfikowane fluorescencyjnie cząsteczki, będące nienaturalnymi substratami, mogą wpływać na otrzymane wyniki.

Kolejną z metod, coraz częściej używaną w ostatnich latach do analizy ilościowej jak i jakościowej, jest spektrometria mas. Metoda ta pozwala na analizę interakcji białko-ligand bez konieczności znakowania, a pomiary prowadzone są w łagodnych warunkach. Analiza jest szybka, nie wymaga wcześniejszego przygotowania próbek, jest łatwo skalowalna⁵⁴ oraz bardzo precyzyjna. Spektrometria mas jest skutecznym narzędziem do oznaczania poziomu ST w poszczególnych tkankach jako zamiennik tradycyjnych metod stosowanych w biologii molekularnej takich jak Western blot, czy reakcja łańcuchowa

polimerazy (z ang. *Polymerase Chain Reaction*)⁵⁵. Spektrometria mas jest jednak metodą bardzo kosztochłonna, zarówno w przypadku zakupu aparatury jak i jej serwisowania. W ostatnich latach pojawiają się również niebezpośrednie metody badania aktywności ST, takie jak oznaczanie ilości PAP. Produktem każdej reakcji katalizowanej przez ST jest jedna cząsteczka PAP. Autorzy wspomnianej metody proponują po zakończeniu reakcji dodatek enzymu gPAPP (ang. *Golgi-resident PAP-specific 3'-phosphatase*), który specyficznie rozpoznaje PAP, hydrolizuje 3'- fosforan, ten zaś powoduje wzrost fluorescencji układu w obecności kompleksu kalceina/Ce³⁺⁵³. Co więcej, zestawy zawierające odczynniki i enzymy niezbędne do przeprowadzenia badań aktywności analogicznymi metodami są dostępne handlowo np. *Universal Sulfotransferase Activity Kit* firmy Bio-Techne (nr kat. EA003). Tego typu metody są jednak wrażliwe na zanieczyszczenia syntetycznego PAPS.

3.5.3. ANALOGI PAPS DO BADANIA SULFOTRANSFERAZ

Fakt, że niski poziom ekspresji sulfotransferaz koreluje z nowotworami oraz chorobami neurologicznymi doprowadził do poszukiwania inhibitorów tych enzymów w celu lepszego poznania tych zależności. W literaturze znaleźć można różne strategie hamowania sulfotransferaz: za pomocą inhibitorów będących strukturalnym odpowiednikiem substratu, kofaktora (PAPS)⁵⁶ lub zawierające w sobie obie te struktury jednocześnie⁵⁷. Analogi substratów sulfotransferaz są związkami małowcząsteczkowymi, działającymi w sposób selektywny dla wybranej sulfotransferazy jednak ich stosowanie niesie ze sobą szereg ograniczeń np. trudności w przypadku sulfotransferaz międzybłonowych, brak możliwości badania interakcji kilku sulfotransferaz na raz. Dotychczas zbadano wiele związków z grupy toksyn środowiskowych czy ksenobiotyków w celu określenia ich właściwości inhibitorowych lub substratowych względem ST (**Rys. 11A**)⁵⁸.



Rys. 11. A: Przykładowe struktury znanych inhibitorów ST wyselekcjonowane z bibliotek związków; B. Struktura niehydrolizowalnego analogu PAPS; C. inhibitor SULT1A1 składający się z mimetyka substratu oraz PAPS.

W 1987 roku J. Horwitz i wsp. otrzymali grupę pierwszych analogów PAP, naturalnego inhibitora sulfotransferaz. Związki te posiadały modyfikacje w obrębie zasady azotowej m.in. wprowadzono brom w pozycję 8 adenozyne, a azot w pozycji 6 podstawiono grupami metylowymi⁵⁹. Autorom pracy udało się otrzymać trzy potencjalne inhibitory SULT1E1. Co istotne, dopiero w roku 1991 otrzymano pierwszy inhibitor będący analogiem PAPS, w którym fosfosiarczan zastąpiono grupą metylenosulfofosfonianową dzięki czemu związek ten był odporny na hydrolizę (**Rys. 11;B**). Potencjalnym zastosowaniem tego analogu było badanie transporterów PAPS oraz chromatografia powinowactwa jednak z niewiadomych względów analog ten nie znalazł szerszego zastosowania w kontekście badań nad ST⁶⁰. Kolejnym opisanym w literaturze inhibitorem, jest związek składający się z estrogenu, czyli naturalnego substratu ludzkiej sulfotransferazy SULT1E1, z 5'-fosforanem 3'-fosfoadenozyny (**Rys. 11;C**). Jednakże, jak się okazało, w przypadku tego związku jedynie estrogen oddziałuje z kieszenią wiążącą białka, natomiast wkład cząsteczki PAP w oddziaływanie był niewielki⁶¹. W trakcie realizacji badań opisanych w niniejszej rozprawie, ukazała się praca Kershaw i wsp. w której przedstawiono szczegółową analizę struktury krystalograficznej oraz dokowanie molekularne, co pozwoliło zaprojektować kolejną grupę analogów PAPS (i PAP) jako potencjalnych inhibitorów. Są to pochodne 2'-deoksyadenozyny z modyfikacjami w obrębie 3'- i 5'- fosforanu⁶². Związki te nie wykazywały silnych właściwości inhibujących względem sulfotransferazy HS2ST (*Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase*) oraz TPST1 (*Tyrosylprotein sulfotransferase-1*)

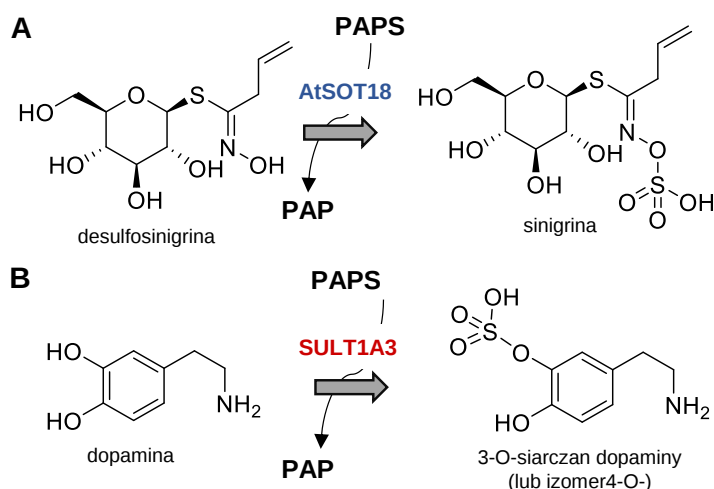
jednakże potwierdziły, że grupa hydroksylowa w pozycji 2' rybozy nie bierze udziału w wiązaniu kosubstratu z białkiem i może być miejscem wprowadzenia modyfikacji⁴¹.

3.5.4. SULFOTRANSFERAZY MODELOWE BADANE W NINIEJSZEJ ROZPRAWIE (AtSOT18, SULT1A3)

W poprzednich rozdziałach przedstawiłam istotną rolę jaką pełnią ST we wszystkich organizmach żywych oraz konsekwencje jakie niesie za sobą zaburzenie aktywności niektórych z nich. Dlatego też sulfotransferazy stały się obiektem moich badań. Pierwszym krokiem do zgłębienia wiedzy na ich temat był wybór odpowiednich białek modelowych. Mój pierwszy wybór padł na roślinną sulfotransferazę AtSOT18. U roślin związki siarczanowe pełnią funkcje regulatorowe, jak w przypadku hormonów u ssaków, odpowiadają za regulację wzrostu oraz budowy^{63, 64}. Dodatkowo, służą jako metabolity wtórne w ochronie przed stresem oraz są źródłem siarki w komórkach. Jedną z ról sulfotransferaz roślinnych jest sulfurylacja desulfo-glukozynolanów. Związki te są jednymi z najlepiej zbadanych wtórnych metabolitów roślinnych, a ich najczęściej wspominaną funkcją, oprócz udział w magazynowaniu siarki, transporcie wody, apoptozie czy hamowanie wzrostu i sygnalizacji, jest obrona przed stresem biotycznym wynikającym z kontaktu z roślinożercami i patogenami⁶⁵. U ludzi produkty degradacji glukozynolanów pełnią przede wszystkim rolę związków smakowych, jednakże produkty ich rozkładu np. tiocyjanian czy jod, mogą mieć działanie toksyczne dla człowieka³⁸. W ostatnich latach pojawiły się również badania, które wskazują na działanie przeciwnowotworowe wybranych glukozynolanów co czyni te związki potencjalnym terapeutycznym^{66, 67}. W 2017 roku ukazała się praca w której po raz pierwszy rozwiązano strukturę AtSOT18 w kompleksie z PAP oraz sinigriną, glukozynolanem będącym naturalnym substratem roślinnej sulfotransferazy (**Rys. 12; A**). Zaskakującym jest fakty, że struktura trzeciorzędowa AtSOT18 jest wysoce zbliżona do ludzkich sulfotransferaz cytozolowych uwzględniając centrum aktywne, miejsce wiązania PAPS oraz substratu³⁸. Dodatkowo, roślinną sulfotransferazę AtSOT18⁶⁸ cechuje wysoka stabilność i wydajność ekspresji w komórkach bakteryjnych. Cechy te spowodowały, że uznałam AtSOT18 za odpowiednie białko modelowe do rozpoczęcia badań nad ST.

Jedną z najlepiej scharakteryzowanych ludzkich ST cytozolowych jest SULT1A3, która siarczanuje i inaktywuje neurotransmitery monoaminowe tj. dopaminę, serotoninę czy epinefrynę⁶⁹(**Rys. 12; B**). W przypadku dopaminy przyłączenie grupy siarczanowej jest możliwe w dwóch pozycjach, 3'-O oraz 4'-O, co skutkuje powstaniem dwóch

regioizomerów. Zarówno serotonina jak i dopamina są neuroprzekaznikami zaangażowanymi w takie procesy jak transdukcja sygnału między specyficznymi receptorami, co wpływa na stan psychiczny, nastrój, pamięć, a także ruch fizyczny. Oprócz tego związki te, w formie siarczanowanej, odgrywają ważną rolę w biotransformacji wymienionych neuroprzekazników. Aż 90% dopaminy oraz 80% pozostałych monoamin obecnych we krwi znajduje się w formie usiarczanowanej^{70, 71}. Nieprawidłowy poziom tych neurotransmiterów prowadzi nie tylko do zaburzeń takich jak migreny (nagłe, lokalne zwiększenie 5- hydroksytryptaminy w mózgu)⁷², ale również poważnych chorób np. choroby Parkinsona czy Alzheimer⁷³. Ekspresję SULT1A3 zaobserwowano m.in. w jelitach, mózgu i płytkach krwi co koreluje z pełnionymi przez nią funkcjami. Biorąc pod uwagę istotną rolę jaką pełni SULT1A3 oraz podobieństwo strukturalne do SULT1A1 i SULT1A2 postanowiłam wykorzystać ją jako białko modelowe pochodzenia ludzkiego w badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.



Rys. 12. Schemat działania modelowych sulfotransferaz. **A:** AtSOT18 z desulfosinigriną; **B:** SULT1A3 z dopaminą.

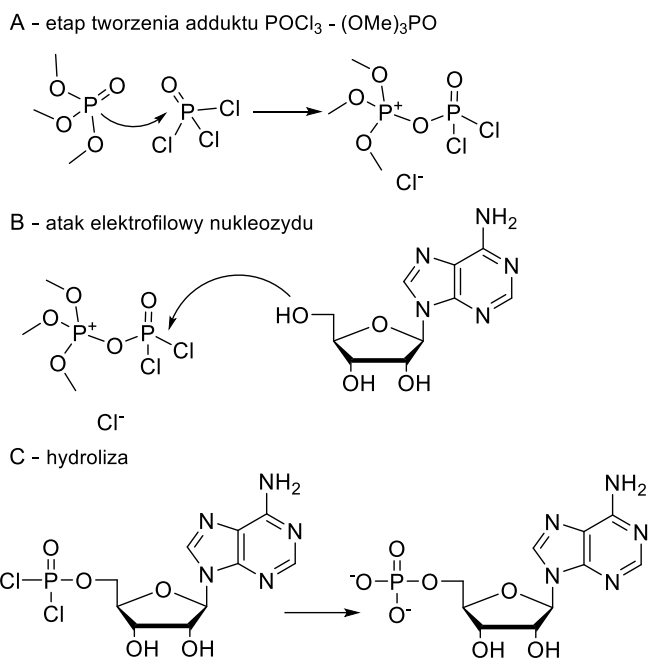
4. METODYKA BADAŃ

Badania zawarte w niniejszej pracy doktorskiej można podzielić na dwie części. Pierwszy stanowiła synteza chemiczna zaś drugi obejmował badania biofizyczne otrzymanych związków. W celu lepszego zrozumienia zagadnień przedstawionych w rozdziale „Badania własne” poniżej opiszę wykorzystywane przeze mnie ścieżki syntetyczne, mechanizmy oraz reakcje chemiczne prowadzone rutynowo w celu otrzymania analogów kofaktorów adeninowych, a także przedstawię podstawy teoretyczne metod eksperymentalnych, które zostały przeze mnie wykorzystane w celu określenia właściwości biofizycznych otrzymanych związków.

4.1. SYNTEZA CHEMICZNA

4.1.1. FOSFORYLACJA NUKLEOZYDÓW METODĄ YOSHIKAWY ORAZ JEJ MODYFIKACJE

Jedną z najpopularniejszych metod otrzymywania nukleotydów jest jednoetapowa reakcja fosforylacji opracowana przez Yoshikawę⁷⁴. Reakcja zachodzi selektywnie w pozycji 5'-O nukleozydu i jest prowadzona w jednym naczyniu (*ang. one – pot reaction*) z użyciem chlorku fosforylu jako czynnika fosforylującego. Kluczowe znaczenie ma rozpuszczalnik w którym przebiega reakcja, czyli fosforan trimetylu. W pierwszym etapie cząsteczka rozpuszczalnika reaguje z cząsteczką POCl_3 , tworząc duży objętościowo addukt, pełniący rolę elektrofila w kolejnym etapie reakcji. Powstały addukt, ze względu na zawadę steryczną, preferencyjnie reaguje tylko z jedną, najbardziej odsłoniętą grupą hydroksylową nukleozydu (w pozycji 5'). Końcowym etapem reakcji jest hydroliza, która prowadzi do otrzymania właściwego produktu reakcji, monofosforanu nukleozydu (**Rys. 13**). Selektowność tej metody wynika zarówno z odpowiednio dobranego czynnika fosforylującego jak i obniżonej temperatury (reakcje prowadzi się w 0°C).

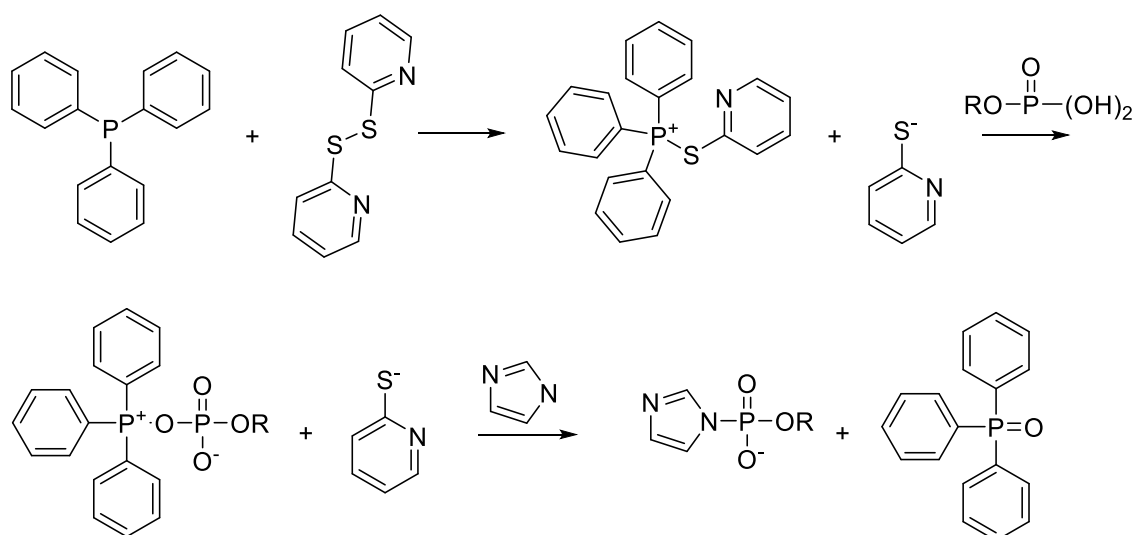


Rys. 13. Mechanizm fosforylacji metodą Yoshikawy, podzielony na poszczególne etapy.

Etapem końcowym fosforylacji Yoshikawy jest zazwyczaj wytrącanie otrzymanego produktu w eterze dietylowym, w celu wyodrębnienia produktu (o ile jego rozpuszczalność na to pozwala). Rezultatem jest otrzymanie 5'-monofosforanu nukleozydu. Metoda Yoshikawy jest do dziś wykorzystywana w wielu laboratoriach. W literaturze można również znaleźć jej modyfikacje np. użycie nadmiaru POCl_3 w celu otrzymania 2',3'-cyklofosfo 5'-fosforanu adenozy⁷⁵.

4.1.2. AKTYWACJA NUKLEOTYDÓW ORAZ SPRZĘGANIE W OBECNOŚCI DWUWARTOŚCIOWYCH JONÓW METALI

Aby wydłużyć łańcuch fosforanowy konieczne jest wprowadzenie grupy opuszczającej, która ma za zadanie zwiększenie elektrofilowości atomu fosforu. Jedną z najczęściej praktykowanych metod aktywacji nukleotydów jest sprzęganie soli trietyloamoniowych 5'-monofosforanów rybonukleotydów i imidazolu w obecności trifenylofosfiny i 2,2'-ditiodipirydyny jako czynników aktywujących^{76, 77}. Synteza ta zachodzi z wysoką wydajnością, jednakże w przypadku 3',5'-difosforanów nukleotydów reakcja może zachodzić również na drugim, konkurencyjnym fosforanie (**Rys. 14**).



Rys. 14. Schemat reakcji aktywacji nukleotydów zaproponowany przez Mukaiyma i Hashimoto⁷⁸. R=nukleozyd.

Aktywowany w ten sposób fosforan staje się centrum elektrofilowym co umożliwia przyłączenie nukleofila np. kolejnego fosforanu (powodując utworzenie wiązania fosfodiesterowego). Aby jednak umożliwić zbliżenie nukleofila i zajście reakcji konieczne jest zamaskowanie ładunków ujemnych zlokalizowanych na atomach tlenu. W tym celu niezbędny jest dodatek dwuwartościowych jonów metali np. Mg^{2+} lub Zn^{2+} .

4.1.3. METODY OTRZYMYWANIA PAPS

Opracowywanie ścieżki syntezy PAPS rozpoczęto już w latach 60' XX wieku⁷⁹. Początkowo prace te skupiały się wokół syntezy enzymatycznej. Rozwiązanie to było odpowiednie przede wszystkim w badaniach gdzie potrzebne były małe ilości kofaktora, ponieważ wydajność i koszt syntezy był wysoki⁸⁰. Alternatywą tej metody jest synteza chemiczna, która z założenia jest metodą wielkoskalową, tanią i szybką. Jej minusem jest brak możliwości selektywnego otrzymania izomeru 3'-fosforanu (jest on zanieczyszczony regioizomerem 2', który dodatkowo jest trudny do rozdzielania metodami chromatograficznymi). W konsekwencji najpowszechniej stosowana ścieżka syntezy PAPS stanowi połączenie metody chemicznej oraz enzymatycznej. Od strony chemicznej synteza prowadzona jest do momentu otrzymania 5'-fosforanu 2',3'-cyklofosfoadenozyny. Reakcję cyklizacji, która stanowi kluczowy etap otrzymywania wspomnianego produktu, można prowadzić na wiele sposobów wykorzystując jako substrat zarówno nukleozydy jak i nukleotydy. Zaproponowana przez Cherniaka i wsp. metoda polegała na przeprowadzeniu reakcji fosforylacji z udziałem chlorku dibenzylfosforylu a następnie cyklizacja oraz sulfurylacja z użyciem kwasu

trietyloamino-N-sulfonowego^{81, 82} (cyklizację można prowadzić również z użyciem dicykloheksylokarbodiimidami w podwyższonej temperaturze⁸³). Ta droga syntezy nie jest jednak doskonała ze względu na wieloetapowość oraz występowanie produktów ubocznych (izomerów) na każdym z etapów. W 1975 roku Simoncsits i wsp. opracowali dwuetapową fosforylację chlorkiem pirofosforu, prowadzoną w temperaturze 3°C w środowisku bezwodnym, zakończoną hydrolizą w środowisku obojętnym (pH 7)⁸⁴. Metoda ta została następnie zmodyfikowana początkowo przez Yoshikawę (etap fosforylacji) a następnie innych naukowców, którzy pracują nad jej modyfikacjami do dziś (warunki prowadzenia hydrolizy np. zakończenie reakcji fosforylacji przez podstawienie atomu tlenu silnie nukleofilową zasadą np. imidazolem, a następnie hydroliza w środowisku obojętnym co prowadzi do otrzymania zaktywowanego nukleotydu⁸⁵). Ostatni etap syntezy PAPS stanowi hydroliza enzymatyczna cyklicznego fosforanu, co prowadzi do selektywnego otrzymania 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfoadenozyny⁸⁶.

4.2. METODY BIOFIZYCZNE WYKORZYSTANE PODCZAS REALIZACJI PROJEKTU

4.2.1. JĄDROWY REZONANS MAGNETYCZNY (NMR)

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego opiera się na fizycznym zjawisku, rezonansie magnetycznym, opisanym w 1938 roku przez Isidora Rabiego. Zaledwie 14 lat później zostały wykonane pierwsze pomiary z wykorzystaniem metody NMR, za co Edward Mills Purcell oraz Felix Bloch otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki. Spektroskopia NMR znalazła zastosowanie w wielu dziedzinach nauki (np. do określania struktur związków chemicznych) oraz medycyny (np. metoda diagnostyki obrazowej), co czyni ją jednym z najpotężniejszych narzędzi fizykochemicznych.

Każda cząstka elementarna obdarzona ładunkiem posiada właściwość nazywaną spinem, czyli wewnętrzny moment pędu. Może on przyjmować wartość będącą wielokrotnością $\frac{1}{2}$. Spiny protonów oraz neutronów w obrębie jądra sumują się i są określane mianem spinu jądrowego. W magnetycznym rezonansie jądrowym ważne są niesparowane spiny jądrowe. W układzie, na który nie działa zewnętrzne pole magnetyczne (B_0) spiny ułożone są w sposób dowolny. Zewnętrzne pole magnetyczne wymusza ułożenie spinu w dwóch pozycjach, zgodnie (niższy poziom energetyczny; $m=1/2$; α) lub przeciwnie (wyższy poziom energetyczny; $m=-1/2$; β) do kierunku tego pola. Energia spinu w danym poziomie energetycznym wyrażana jest wzorem:

$$E = m\gamma B_0 \frac{h}{2\pi}$$

Gdzie m oznacza magnetyczną spinową liczbę kwantową, γ współczynnik proporcjonalności. Przejścia pomiędzy poziomami α i β są wywołane w skutek absorpcji promieniowania elektromagnetycznego działającego na układ co jest równoznaczne z tym, że energia potrzebna do wywołania przejścia z poziomu podstawowego w stan wzbudzony musi być równa różnicy energii pomiędzy poziomami. Ilość energii potrzebna do wywołania przejścia jest proporcjonalna do natężenia zewnętrznego pola magnetycznego. W spektroskopii NMR wzbudzenie jądra atomu następuje na skutek impulsu elektromagnetycznego, zaś powrót do stanu podstawowego jest rejestrowany i określany mianem sygnału rezonansowego. Identyczne protony absorbują zawsze taką samą ilość energii jednakże w cząsteczce znajdują się w innym otoczeniu elektronowym tj. gęstość elektronowa wokół protonu jest zależna od ilości i rodzaju wiązań jakie tworzy. Ruch tych elektronów wywołuje tzw. lokalne pole magnetyczne, które sumuje się wektorowo z zewnętrznym polem magnetycznym. Za sprawą tego zjawiska na każde jądro działa nieznacznie inne pole magnetyczne a tym samym potrzebna jest inna ilość energii potrzebna do przejścia w stan wzbudzony. Opisane różnice w absorpcji w wyniku transformacji Fouriera prezentowane są w postaci widma NMR i określane mianem przesunięcia chemicznego.

Ważnym czynnikiem w ułatwiającym pomiary metodą spektroskopii NMR jest wysoka abundancja analizowanego jądra. Przykładem może być jądro wodoru, który w 99,99% występuje w postaci izotopu ^1H . Oznacza to, że badania ^1H NMR mogą odbywać się bez konieczności modyfikowania cząsteczek w celu ich analizy. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku węgla, gdzie izotop o najwyższej abundancji posiada parzystą liczbę nukleonów zaś izotop ^{13}C występuje tylko w 1,09% co powoduje, że aby przeprowadzić badania techniką ^{13}C NMR konieczne jest znaczne wydłużenie czasu trwania pomiaru (w celu poprawy stosunku sygnału do szumu), użycie dużej ilości materiału lub dodatkowe znakowanie tym izotopem (**Tabela 2**).

Tabela 2. Abundancja wybranych izotopów.

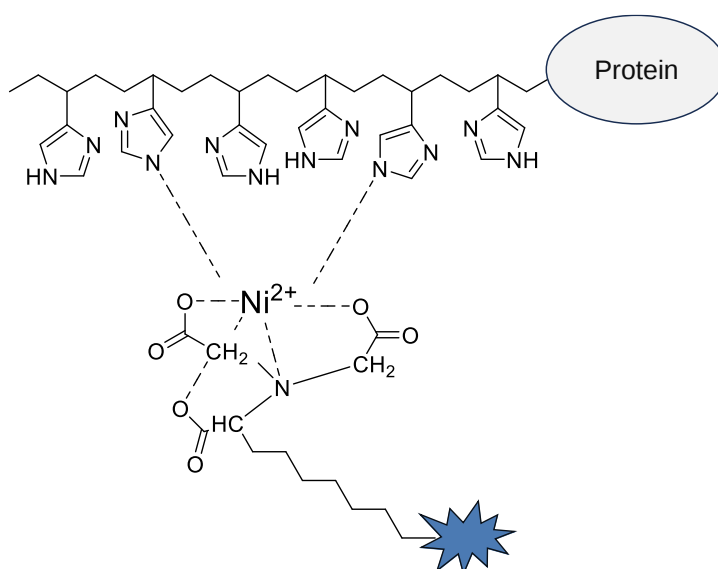
Pierwiastek	Izotop	Abundancja [%]	Pierwiastek	Izotop	Abundancja [%]
H	^1H	99,99	O	^{16}O	99,76
	^2H	0,01		^{17}O	0,037
C	^{12}C	98,91		^{18}O	0,2
	^{13}C	1,09	F	^{19}F	100
N	^{14}N	99,6	P	^{31}P	100
	^{15}N	0,37	S	^{32}S	95,02

W kontekście tych rozważań jednymi z najbardziej użytecznych jąder do pomiarów pochodnych nukleotydów i kwasów nukleinowych są fosfor (^{31}P) lub fluor (^{19}F), których abundancja wynosi 100%. W strukturze nukleotydów znajduje się wiele atomów fosforu, które dodatkowo biorą udział w oddziaływaniach z enzymami. Jest to z jednej strony korzystne, gdyż nie wymaga specjalnego znakowania cząsteczek, ale stanowi również wyzwanie, gdyż mała dyspersja przesunięć chemicznych fosforu powoduje, że obserwacja niewielkich zmian w przesunięć chemicznych konkretnych jąder bywa bardzo trudna. Inna sytuacja ma miejsce w przypadku atomu izotopu ^{19}F , który nie występuje naturalnie w nukleotydach i kwasach nukleinowych, ale możliwe jest wprowadzenie tego izotopu w strukturę nukleotydu i precyzyjne analizowanie przemian biochemicznych w czasie rzeczywistym lub interakcji białko-ligand techniką ^{19}F NMR^{87, 88}. Dodatkowymi zaletami jąder fluoru są wysoki współczynnik magnetogiryczny oraz duża dyspersja przesunięć chemicznych co ułatwia zarówno akwizycję jak i analizę danych. Dlatego też postanowiłam stworzyć narzędzia molekularne umożliwiające wykorzystanie tej metody do badania reakcji enzymatycznych katalizowanych przez sulfotransferazy.

4.2.2. TERMOFOREZA MIKROSKALOWA

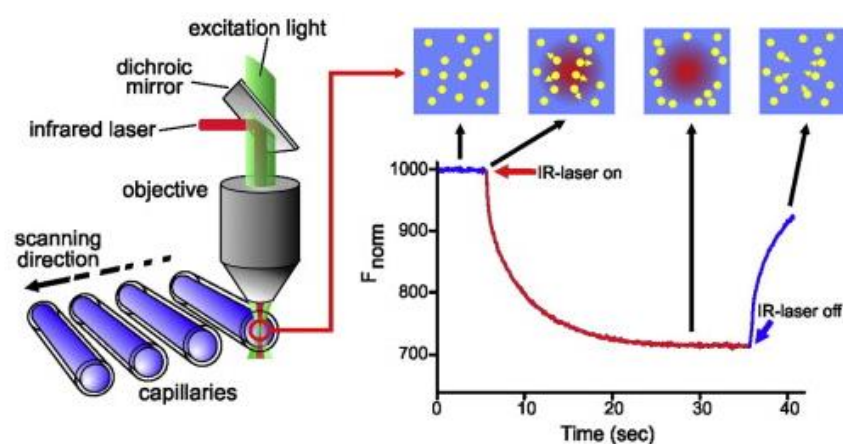
Zjawisko fluorescencji jest wykorzystywane w naukach biologicznych do obrazowania i analizowania interakcji molekularnych oraz procesów przebiegających w komórkach. Do dziś opracowanych zostało wiele technik, opartych na zjawisku fluorescencji, które stały się nieocenionym narzędziem do zrozumienia procesów biologicznych. Umożliwiają one nie tylko wizualizację i lokalizację białek lub cząsteczek

w komórkach, ale również, w przypadku badań prowadzonych *in vitro*, pozwalają wyznaczyć takie parametry jak równowagowa stała wiązania, stała dysocjacji białko-ligand, parametry kinetyczne enzymów i wiele innych. Zaletą technik fluorescencyjnych jest ich wszechstronność, specyficzność i czułość. W zależności od sposobu znakowania oraz specyfiki badanego układu, wykorzystuje się odmienne podejścia np. wygaszanie fluorescencji czy anizotropia fluorescencji. Metody te mają jednak swoje ograniczenia takie jak wielkość badanego układu, ułożenie fluoroforów w przestrzeni lub wymagają one dużych objętości próbek. Alternatywą dla wymienionych metod jest opracowana w ostatnim piętnastoleciu metoda termoforezy mikroskalowej (MST, *ang. microscale thermophoresis*). Metoda ta wykorzystuje zjawisko termoforezy, czyli ruchu cząsteczek w gradiencie temperaturowym, inaczej określany efektem Soreta lub termodyfuzją⁸⁹. Na kierunek oraz szybkość termoforezy mają wpływ takie czynniki jak rozmiar, ładunek oraz entropia solwatacyjna cząsteczek⁹⁰. Podczas wiązania się białka z ligandem zmienia się co najmniej jeden z wymienionych parametrów, co umożliwia analizę oddziaływań molekularnych. Metoda termoforezy mikroskalowej wymaga znakowania fluorescencyjnego jednej z badanych biomolekuł, ligandu lub białka. W przypadku białek możliwe jest wykorzystanie wewnętrznej fluorescencji tryptofanów obecnych w strukturze białka lub przyłączenie znacznika, np. poprzez modyfikację metki histydynowej tzw. His-tag, która może tworzyć niezwykle trwałe wiązania koordynacyjne z kompleksami jonów metali np. Ni^{2+} (Rys. 14).



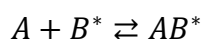
Rys. 14. Schemat oddziaływania między resztami His-Tag a jonami Ni^{2+} skoordynowanymi do pochodnej znacznika. Schemat na podstawie pracy Block i wsp.⁹¹

W eksperymencie cząsteczka wyznakowana fluorescencyjnie występuje w stałym stężeniu, stanowiąc jednocześnie wzorzec wewnętrzny jakości eksperymentu, zaś cząsteczka nieznakowana występuje w serii rozcieńczeń. Gradient temperaturowy jest indukowany poprzez włączenie lasera IR. Zmiany w termoforezie cząsteczek fluorescencyjnych, spowodowane wiązaniem z ligandem są przedstawione w formie krzywej przedstawiającej zmiany fluorescencji znormalizowanej (F_{norm}) (zależność fluorescencji przy włączonym laserze IR (F_{hot}) od fluorescencji przed włączeniem lasera IR (F_{cold})) w funkcji czasu. Zebrane dane można wykorzystać do obliczenia stałej dysocjacji kompleksu białko–ligand, dzięki dopasowaniu odpowiedniego modelu teoretycznego (Rys. 15).

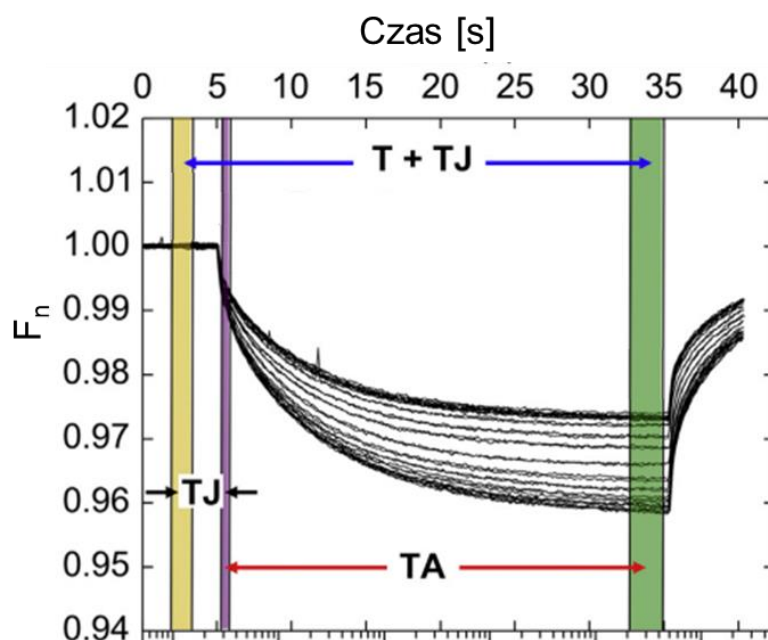


Rys. 15. Rysunek poglądowy przedstawiający zasadę działania termoforezy mikroskalowej oraz uzyskany podczas eksperymentu wynik, przedstawiony w formie krzywej. Zaczerpnięto z pracy Jerabek i wsp.⁸⁹

Aby przeprowadzić eksperyment mający na celu wyznaczenie stałej dysocjacji kompleksu białko–ligand przygotowuje się zazwyczaj 16 niezależnych roztworów będących seryjnymi rozcieńczeniami liganda (stężenie wzrasta logarytmicznie) oraz zawierających stałe stężenie cząsteczki znakowanej (zazwyczaj cząsteczką tą jest białko; jego stężenie utrzymane jest na niskim poziomie, około 50 nM). Tak przygotowane roztwory umieszcza się w kapilarach a następnie poddaje działaniu lasera emitującego promieniowanie w zakresie podczerwieni, który odpowiada za wytworzenie gradientu temperaturowego. Tworzenie kompleksu zachodzi w myśl równania:



gdzie A oznacza enzym, B^* ligand znakowany fluorescencyjnie zaś AB^* powstały kompleks białko–ligand. Ruch cząsteczek wyznakowanych fluorescencyjnie (tj. B^* oraz AB^*) jest monitorowany za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.



Rys. 16. Przykładowa krzywa wiązania będąca wynikiem pomiaru MST. Na żółto zaznaczono region przed włączeniem lasera IR, który definiuje wartość F_c , na fioletowo zaznaczony jest tzw. region TJ (*temperature jump*), który oznacza zmiany zachodzące w czasie 0,5 s od momentu włączenia lasera IR. Strefa oznaczona na zielono oznacza region właściwej termoforezy. Rysunek zapożyczony z pracy Scheuermanna i wsp.⁹²

Wynikiem takiego pomiaru jest krzywa zależności zmiany fluorescencji znormalizowanej (F_n) w funkcji czasu (**Rys. 16**). Fluorescencję znormalizowaną można wyrazić wzorem:

$$F_n = \frac{F_h}{F_c}$$

gdzie F_h oznacza fluorescencję w tzw. „regionie gorącym” (*ang. hot fluorescence*; obejmujący zakres krzywej od momentu włączenia lasera IR), zaś F_c fluorescencję w regionie zimnym (*ang. cold fluorescence*; zakres krzywej przed włączeniem lasera IR). Wartość F_c jest wyznaczana w tym samym punkcie czasu dla każdej analizy, natomiast region określający F_h musi zostać zdefiniowany przez analityka. Przyjęte są dwa przedziały czasu w których możliwe jest wyznaczenie F_h :

- Region zaczynający się 0,5 s po włączeniu lasera IR (trwa 0,5 s) określany jest jako TJ (*ang. Temperature Jump*). W tym regionie nie zachodzi jeszcze zjawisko termoforezy jednak jest obserwowana zmiana fluorescencji chromoforu pod wpływem zmiany temperatury.
- Region zaczynający się 2,1 s przed wyłączeniem lasera IR (trwa 2 s), w którym termoforeza jest już ustabilizowana.

Dla kompleksów, w których stabilność w dużej mierze wynika z oddziaływań elektrostatycznych, zalecane jest analizowanie danych w oparciu o region TJ, aby zminimalizować wpływ zmiany temperatury na wartość stałej dysocjacji. Ponieważ oddziaływania białko nukleotyd w dużej mierze opierają się na oddziaływaniach elektrostatycznych, wszystkie wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej były uzyskane poprzez analizę regionu TJ.

Aby powiązać zmiany fluorescencji ze stałą dysocjacji w przypadku kompleksu o stechiometrii 1:1 z jednym miejscem wiązania ligandu, należy przeprowadzić następujące rozważania. Obserwowana dla danej próbki fluorescencja znormalizowana jest średnią ważoną fluorescencji znormalizowanej wolnej cząsteczki znakowanej (B^*) oraz fluorescencji znormalizowanej jej kompleksu z ligandem (AB^*):

$$F_n = \left(\frac{B^*}{B_{tot}^*} \cdot F_{n,B^*} \right) + \left(\frac{AB^*}{B_{tot}^*} \cdot F_{n,AB^*} \right)$$

gdzie F_{n,B^*} oznacza fluorescencję znormalizowaną niezwiązanego liganda, F_{n,AB^*} fluorescencję znormalizowaną utworzonego kompleksu, zaś B_{tot}^* całkowite stężenie B^* . Stała dysocjacji jest opisana równaniem:

$$K_D = \frac{A \cdot B^*}{AB^*}$$

Przyjmując założenie:

$$A_{tot} = A + AB^*$$

$$B_{tot} = B^* + AB^*,$$

rozwiązując równania dla AB^* otrzymujemy:

$$AB^* = \frac{(K_D + A_{tot} + B_{tot}^*) - \sqrt{(K_D + A_{tot} + B_{tot}^*)^2 - 4 \cdot A_{tot} B_{tot}^*}}{2}$$

Znając AB^* możemy obliczyć A oraz B^* , wyznaczyć krzywą zależności ΔF_n od stężenia liganda oraz K_D ⁹².

5. BADANIA WŁASNE

5.1. CEL PROJEKTU

Celem niniejszej pracy była synteza nowych analogów wybranych kofaktorów adeninowych i ich ewaluacja jako narzędzi molekularnych do badania powiązanych enzymów. Aby zwiększyć jej przejrzystość została ona podzielona na dwie odrębne części.

Pierwszą część stanowi synteza analogów kofaktorów adeninowych jako narzędzi molekularnych, które umożliwią lub przyspieszą badania struktury i funkcji NAD-kapowanych RNA oraz pokrewnych związków i ich specyficznych białek wiążących. W tym celu zaprojektowałam m.in. analogi NAD oraz FAD, które w założeniu miały być częściowo lub całkowicie odporne na działanie enzymów hydrolizujących, NudC i Nudt12 (NAD-RNA) oraz DXO (NAD-RNA oraz FAD-RNA). Dzięki zwiększonej stabilności komórkowej, analogi takie mogą stanowić cenne narzędzia do badań strukturalnych i funkcjonalnych niekanonicznych RNA.

Druga część rozprawy dotyczyła syntezy analogów 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfoadenozyny (PAPS) jako narzędzi do badania sulfotransferaz. W tej części rozprawy wyróżnić można dwa główne wątki. Pierwszy dotyczy syntezy funkcjonalnych analogów PAPS, które w założeniu będą kofaktorami zastępczymi dla enzymów z grupy sulfotransferaz. Zaprojektowane związki posiadają grupę siarczanową lub została ona zastąpiona inną grupą izosteryczną (o zbliżonym ładunku oraz wielkości), tak aby mimo wprowadzonych modyfikacji, nie zaburzyć aktywności ST. Takie analogi umożliwiłyby monitorowanie aktywności sulfotransferaz oraz stanowiłyby narzędzie do śledzenia szlaków metabolicznych w których wspomniane enzymy biorą udział. Aby określić właściwości funkcjonalnych analogów PAPS podjęłam próbę opracowania wysokoprzepustowej metody analitycznej opartej na technikach HPLC oraz NMR. Jako białka modelowe wybrałam dwie sulfotransferazy:

- AtSOT18, sulfotransferaza roślinna pozyskana z organizmu *Arabidopsis Thaliana*, która odpowiada za sulfurylację glukozyzolanów a tym samym bierze udział w procesie regulacji wzrostu czy adaptacji w warunkach stresowych

- SULT1A3, ludzka sulfotransferaza cytozolowa, która sulfuryluje katecholaminy (w szczególności dopaminę) co sugeruje jej rolę w metabolizmie tych związków i przekazywaniu sygnału.

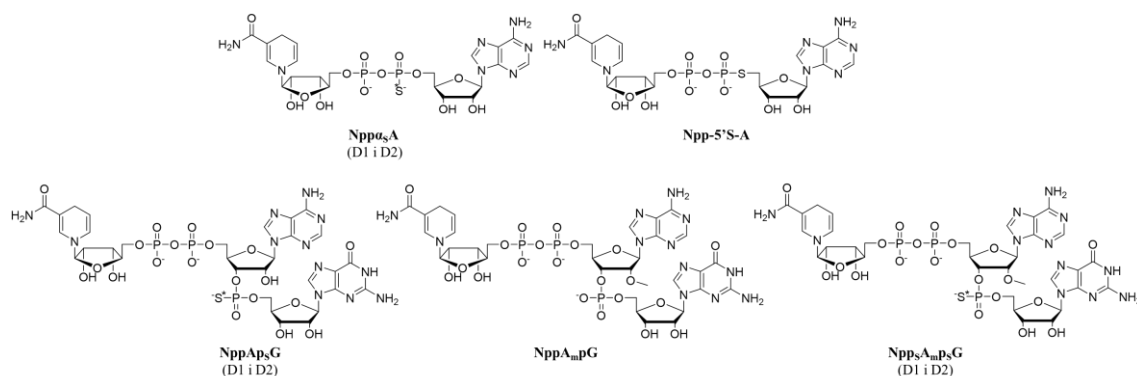
Drugi, stosunkowo niezależny nurt badań nad analogami PAPS dotyczy zaprojektowania, syntezy i ewaluacji nowych analogów PAPS wykazujących właściwości inhibitorowe dla sulfotransferaz. Badania te obejmowały otrzymanie grupy związków modyfikowanych zarówno w obrębie adeniny, rybozy jak i reszty fosfosiarczanowej. W celu zbadania oddziaływań tych analogów z sulfotransferazami opracowałam nową metodę badania oddziaływań sulfotransferaza-ligand, bazującą na zjawisku termoforezy mikroskalowej monitorowanej fluorescencją. Sulfotransferazy modelowe stanowiły wspomniane wyżej AtSOT18 oraz SULT1A3.

Dodatkowo, niektóre ze związków otrzymanych przeze mnie w tej części projektu doktorskiego, zostały wykorzystane jako reagenty do znakowania RNA, co również po krótko opisałam w rozprawie.

5.2. OTRZYMYWANIE ORAZ EWALUACJA ANALOGÓW NAD

5.2.1. SYNTEZA ANALOGÓW NAD

Głównym celem tej części badań było zaprojektowanie i otrzymanie analogów NAD, które będą m.in. odporne na enzymy denadujące tj. pirofosfatazy z rodziny NUDIX, takie jak NudC i Nudt12. W tym celu postanowiłam w strukturze NAD, w miejscach rozpoznawanych przez wspomniane enzymy (pozycja 5' w mostku fosforanowym oraz w fosforanie α), zastąpić atom tlenu atomem siarki. Ten rodzaj modyfikacji okazał się wcześniej skuteczną strategią stabilizacji m⁷G-kapowanego RNA przed enzymami dekapującymi, nie zakłócając ich aktywności translacyjnej⁹³. Aby osiągnąć założony cel, zsyntetyzowałam dwa dinukleotydowe analogi NAD (dwa stereoizomery), zawierające grupę α -tiofosforanową (Npp α sA) i jeden analog posiadający S w pozycji mostkowej 5' (Npp-5'S-A).

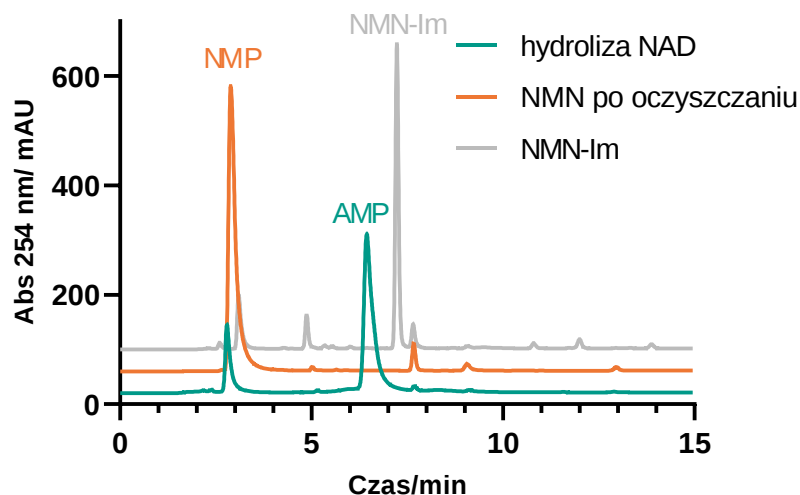


Rys. 17. Struktury i skrócone nazwy zaprojektowanych analogów NAD.

Dodatkowo, aby nadać odporność na fosfodiesterazy takie jak DXO, zsyntezowałam dwa trinukleotydydowe analogi NAD (NADpG) zawierające modyfikację w obrębie wiązania 5',3'-fosfodiesterowego (zamiana grupy fosforanowej na tiofosforanową - dwa diastereomery NppAp₅G). Zaprojektowałam również trinukleotydydowy analog NAD posiadający grupę metylową w pozycji 2'-O-adenozyny (NppA_{mp}G), sugerując się doniesieniami literaturowymi, że taka modyfikacja zwiększa odporność na degradację przez DXO w przypadku m⁷GpppN i GpppN-kapowanych RNA⁹⁴. Dwa ostatnie związki, diastereoizomery NppsA_{mp}G, posiadają obie wspomniane modyfikacje mające na celu zwiększenie odporności na oba rodzaje enzymów deNADujących. Struktury wymienionych związków zostały przedstawione na **Rys. 17**.

Synteza analogów NAD została zaprojektowana i przeprowadzona w kilku etapach. Pierwszym krokiem, jednakowym dla wszystkich otrzymanych analogów, było pozyskanie 5'-monofosforanu nikotynamidu (NMP), który jest związkiem trudno dostępnym handlowo (i drogim). Literaturowe ścieżki syntezy NMP *de novo* są wieloetapowe i wymagają użycia trudnych odczynników (np. gazowego SO₃)⁹⁵. Synteza tego związku możliwa jest również na drodze enzymatycznej, ale wymaga to dużych nakładów pracy lub kosztów związanych z pozyskaniem odpowiednich enzymów. Jako najkorzystniejszą drogę do pozyskania znaczących (gramowych) ilości NMP wybrałam chemiczną hydrolizę handlowo dostępnego NAD z użyciem chlorku cyrkonu⁹⁶. Do wodnego roztworu NAD (~11 mM) dodałam ZrCl₄ (~53 mM) i inkubowałam przez 30 min w temperaturze 50°C. Postęp reakcji monitorowałam na HPLC. Powstała mieszanina AMP i mononukleotydu nikotynamidowego została rozdzielona metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex A25) z wydajnością 32%. Mimo iż oba związki (NMP oraz AMP) są monofosforanami, ich rozdział na kolumnie jonowymiennej jest możliwy dzięki ładunkowi dodatniemu na zasadzie w NMP, co zmienia ładunek wypadkowy tej

cząsteczki w porównaniu do AMP. Otrzymany NMP został następnie zaktywowany imidazolem w obecności trifenylofosfiny i 2,2'-ditiopirydyny w DMSO. Otrzymaną imidazolową pochodną NMP (NMP-Im) wydzieliłam z mieszaniny reakcyjnej w postaci soli sodowej poprzez strącanie za pomocą roztworu NaClO₄ w acetonie i po wysuszeniu wykorzystałam w następnych etapach syntez (**Rys. 18**).



Rys. 18. Przykładowe profile HPLC z reakcji hydrolizy NAD, NMN po oczyszczaniu oraz reakcji aktywacji NMN.

W celu uzyskania dinukleotydowych analogów NAD modyfikowanych resztą tiofosforanową, uzyskany NMN-Im poddałam reakcji sprzęgania z 5'-tiofosforanem adenozyiny (AMPS) w DMF w obecności ZnCl₂ jako katalizatora reakcji. AMPS otrzymałam uprzednio w reakcji adenozyiny z PSCl₃ w fosforanie etylu w obecności 2,6-lutydyny⁹⁷. Produktem reakcji sprzęgania AMPS z NMN-Im był NppsA w postaci mieszaniny dwóch distereoizomerów w stosunku 0,8:1. NMN-Im poddałam także reakcji sprzęgania z dinukleotydami otrzymanymi przez dr Anaïs Depaix metodą syntezy na fazie stałej, w celu otrzymania odpowiednich trinukleotydowych analogów NAD. Reakcje sprzęgania z NMN-Im, które prowadziły do otrzymania trinukleotydów, przeprowadziłam w podobnych warunkach jak dla dinukleotydów. Reakcje te przebiegały jednak znacznie wolniej (całkowita konwersja zachodziła w 2-3 dni). Kolejny związek, Npp-5'S-A, zsyntetyzowałam w analogicznej reakcji sprzęgania NMN-Im z 5'-monofosforanem 5'-tio-5'-deoksyadenozyiny, otrzymanym w wyniku reakcji tiofosforanu trietyloamoniowego z 5'-deoksy-5'-jodoadenozyną⁹⁸ (**Rys. 19**). Wydajności syntez zebrałam w tabeli poniżej (**Tabela 3**). Analizy spektroskopowe i MS-ESI dla wszystkich analogów potwierdziły oczekiwaną strukturę związków i obecność formy

utlenionej nikotynamidu (jak w NAD^+), ze śladowymi ilościami formy zredukowanej (tj. jak w NADH ; <5%).

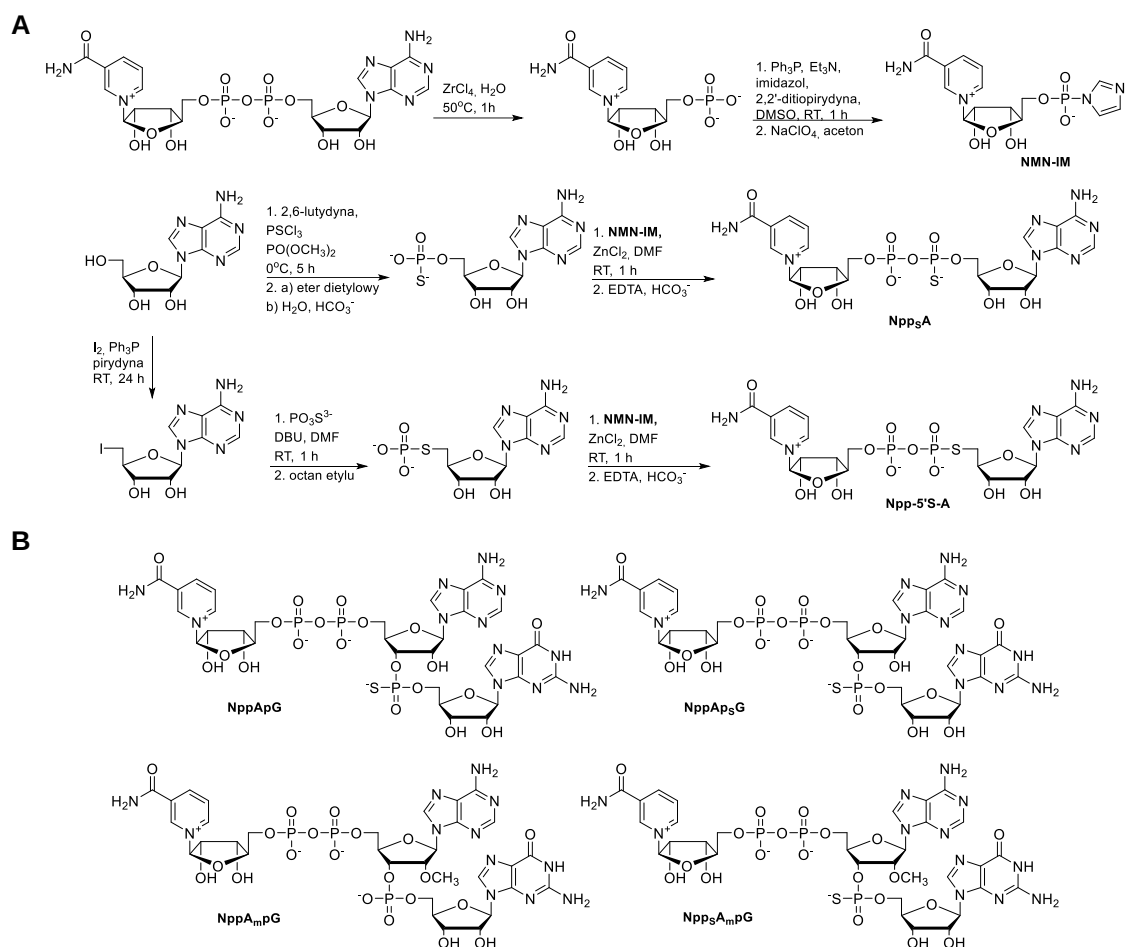
Tabela 3. Wydajności syntezy i oczyszczania analogów NAD .

Symbol związku	Wydajność [%]
NMP	32 ^a
NMN-IM	56 ^a
NppsA D1	6 ^b
NppsA D2	8 ^b
Npp-5'S-A	8 ^b
NppApG	32 ^b
NppApsG D1	3 ^b
NppApsG D2	8 ^b
NppAmpG	33 ^b
NppAmpsG D1	5 ^b
NppAmpsG D2	5 ^b

^a wydajność po oczyszczaniu metodą chromatografii jonowymiennej

^b wydajność po oczyszczaniu metodą HPLC

Wykorzystując opisaną ścieżkę syntezy otrzymałam 6 związków. Trzy z nich (zawierające w swojej strukturze atom siarki) występowały w formie P-diastereoizomerów i zostały rozdzielone na kolumnie RP-HPLC. Dzięki temu mogły one zostać poddane badaniom biologicznym w formie diastereomerycznie czystej. W dalszej części rozprawy diastereomery te będą one oznaczane jako D1 oraz D2, odpowiednio do kolejności ich elucji z kolumny RP-HPLC (szczegóły w części eksperymentalnej). Konfiguracje absolutne dla izomerów D1 i D2 nie zostały przypisane, ale uzyskane widma ^{31}P NMR i ^1H NMR potwierdziły, że zostały one rozdzielone metodą RP HPLC (czystość > 90%).

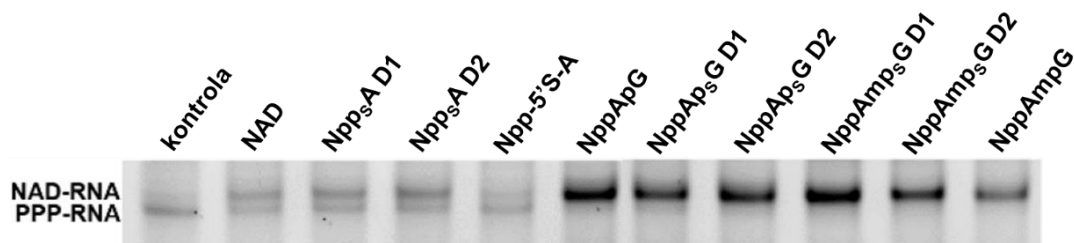


Rys. 19. A. Schemat syntezy wybranych analogów NAD. **B.** Pozostałe analogi NAD syntezowane we współpracy z dr Anaïs Depaix.

5.2.2. BADANIA BIOLOGICZNE OTRZYMANYCH ANALOGÓW NAD

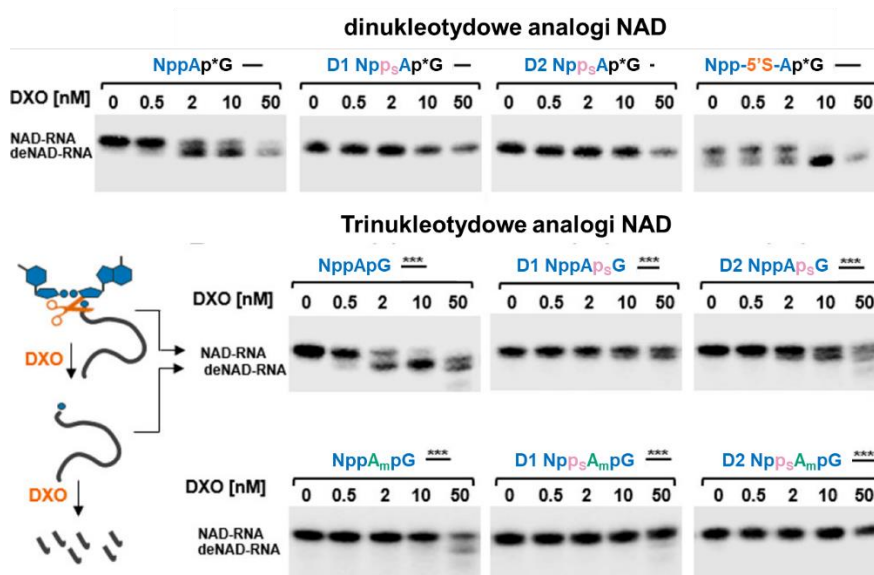
Po otrzymaniu nowych analogów NAD, przeprowadzono próbę wbudowania ich na końcu 5' RNA. Badania te zostały przeprowadzone przez Ewę Grudzień – Nogalską z Rutgers University, natomiast interpretacji wyników dokonałam samodzielnie. Reakcję transkrypcji *in vitro* (IVT) przeprowadzono z udziałem polimerazy T7 RNA na matrycy DNA zawierającej odpowiednią sekwencję promotorową. Wbudowywanie (inaczej kaping) wspomnianych związków przebiegło z min. 60% wydajnością. Wyjątek stanowił związek Npp-5'S-A w przypadku którego wydajność wbudowywania (z *ang.* *Capping efficiency*) była niższa, co oznacza, że analog ten jest słabiej rozpoznawany przez polimerazę T7 oraz niemodyfikowany trinukleotyd (NppApG), który został wbudowany z prawie 100% wydajnością. Co ciekawe, trinukleotydowe analogi NAD charakteryzowały się znacznie wyższą wydajnością kapingu niż dinukleotydy⁹⁹ oraz opisane literaturowo NAD-RNA otrzymane na drodze syntezy chemicznej¹⁰⁰ (**Rys. 20**). Oznacza to, że użycie trinukleotydowych analogów NAD-kapu może być skuteczną

metodą otrzymywania homogennego NAD-RNA, co jest niezwykle istotne w przypadku eksperymentów biochemicznych.



Rys. 20. Wydajność wbudowywania analogów NAD w procesie transkrypcji *in vitro* przedstawiona na 20% żelu poliakrylamidowym.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie podatności otrzymanych analogów NAD na działanie dwóch pirofosfataz z rodziny NUDIX (NudC z *E.coli* i mysiej Nudt12) oraz mysiej fosfodiesterazy DXO. Badania te zostały wykonane przez dr Anaïs Depaix. Rekombinowane białka inkubowano z RNA znakowanym ^{32}P , a powstałe produkty rozdzielano za pomocą chromatografii żelowej w celu oceny ilości pozostałego NAD-kapowanego RNA. Jako kontrolę reakcji hydrolizy użyto niemodyfikowanego, NAD-kapowanego RNA.

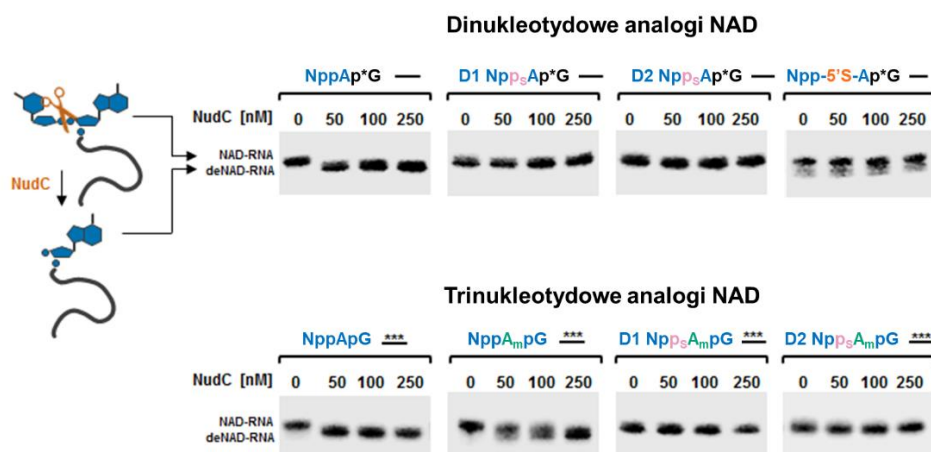


Rys. 21. Wyniki odporności poszczególnych dinukleotydowych i trinukleotydowych analogów NAD na enzym DXO przedstawiona na 20% żelu poliakrylamidowym.

Wyniki eksperymentu przedstawiono na **Rys. 21**. Na żelu z reakcji kontrolnej (przeprowadzonej na RNA zawierającym niemodyfikowaną resztę NAD, NppApG) wraz z upływem czasu pojawia się dodatkowy prążek, który odpowiada produktowi degradacji

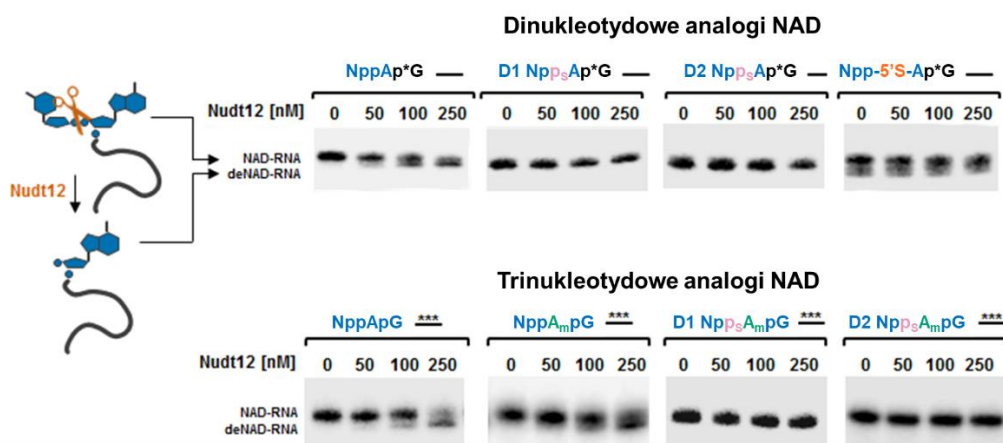
NAD-RNA przez DXO, 5'-monofosforanowi RNA. Przy wyższych stężeniach (50 nM) prążek od 5' monofosforanu zanika zaś pojawiają się kolejne co świadczy o dalszej degradacji 5' – 3' RNA przez DXO (DXO posiada również aktywność 5'-egzonukleolityczną). Zgodnie z oczekiwaniami, RNA zawierające na końcu 5' NAD modyfikowany tiofosforanem (NppsA D1 i D2) również były hydrolizowane przez enzym DXO, jednak co ciekawe, nie zaobserwowano powstawania 5' monofosforanu RNA, co sugeruje wolniejszą kinetykę deNADdingu i względnie szybki rozpad produktu deNADdingu wynikający z aktywności egzonukleazy. Analog posiadający atom siarki w pozycji 5' (Npp-5'S-A) również był podatny na działanie DXO i wykazywał właściwości zbliżone do naturalnego NAD-RNA pomimo zauważalnej niejednorodności RNA w punkcie czasowym 0. W przypadku trinukleotydów niemodyfikowany NADpG-RNA był równie łatwo degradowany przez DXO, jak NAD-RNA. RNA z wbudowanymi analogami D1 i D2 NppApsG wykazywało znacznie mniejszą podatność na działanie DXO. Częściowa degradacja zachodziła dopiero przy wysokim stężeniu enzymu (50 nM). Efekt ten był szczególnie widoczny dla diastereoizomeru D2. Zbliżona sytuacja miała miejsce w przypadku 2'-O-metylowanego analogu NppA_{mp}G, który był wyraźnie mniej podatny na degradację, jednak proces ten zachodził, przy wyższych stężeniach DXO. W kontekście tych wyników niezwykle ciekawy był eksperyment z analogiem NppsA_{mp}G, który zawiera w sobie obie modyfikacje, zarówno grupę 2'-O-metylową jak i siarkę przy fosforanie α. Okazał się on mniej podatny na działanie DXO niż RNA z analogami mającymi pojedyncze modyfikacje, odpowiednio NppA_{mp}G oraz NppSA_{sp}G (D1 i D2). Oznacza to, że transkrypty z wbudowanymi analogami NAD były najbardziej odporne na działanie DXO z prawie pomijalną degradacją (nawet przy najwyższym stężeniu DXO) dlatego też można je określać mianem „odpornych na działanie DXO”.

Kolejnym krokiem była ocena podatności analogów NAD na działanie enzymów NudC i Nudt12, które hydrolizują wiązanie pirofosforanowe. W tym kontekście najciekawszych wyników spodziewałam się w przypadku analogów modyfikowanych w obrębie mostka fosforanowego tj. NppsA (D1 i D2) oraz Npp-5'S-A. Eksperyment wykonano analogicznie jak w przypadku DXO, wyznakowane izotopem ³²P RNA z wbudowanymi w procesie transkrypcji modyfikowanymi NAD było inkubowane z NudC (**Rys. 22**) lub Nudt12 (**Rys. 23**).



Rys. 22. Podatność di- i tri- nukleotydowych analogów NAD wbudowanych do RNA na działanie enzymu NudC. Schemat hydrolizy NAD-kapowanego RNA przez NudC przedstawiono po lewej stronie.

Zgodnie z oczekiwaniami RNA z wbudowanym na końcu 5'-NAD (oraz jego trinukleotydowym odpowiednikiem) był całkowicie degradowany nawet przy najniższym badanym stężeniu enzymu (50 nM). Podobny wynik zaobserwowano dla NppA_mpG, który posiada modyfikację poza mostkiem pirofosforanowym, co powoduje, że nie wpływa ona aktywność pirofosfatazy. Natomiast, wszystkie analogi modyfikowane siarką w pozycji α lub 5'-O były odporne na NudC w stężeniach do 250 nM.



Rys. 23. Podatność di- i tri- nukleotydowych analogów NAD wbudowanych do RNA na działanie enzymu Nudt12. Schemat hydrolizy NAD-kapowanego RNA przez Nudt12 przedstawiono po lewej stronie.

Mysi Nudt12 wykazywał podobne preferencje substratowe jak NudC, tzn. RNA zakończone NAD, NppApG oraz NppA_mpG były podatne na degradację, natomiast pozostałe badane analogi były odporne na działanie pirofosfatazy.

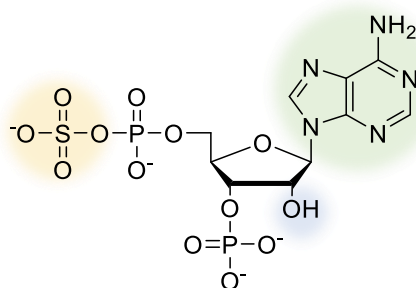
Podsumowując, w celu stworzenia nowych narzędzi do badania NAD-RNA opracowałam metodę syntezy aktywnej pochodnej mononukleotydu nikotynamidowego (NMP-Im) co umożliwiło syntezę 8 nowych analogów NAD (3 związki zsyntezowałam i oczyściłam samodzielnie, pozostałe zostały otrzymane we współpracy z dr Anaïs Depaix). Analogi te zostały następnie scharakteryzowane biochemicznie. Badania wykazały, że analogi te mogą być inkorporowane do RNA w reakcji transkrypcji *in vitro*, a otrzymywanie NAD-RNA charakteryzują się zmniejszoną podatnością na degradację enzymatyczną. Trinukleotydowe analogi NAD wbudowywały się ze znacznie wyższą wydajnością niż naturalne NAD, co sprawia, że są one szczególnie przydatne do otrzymywania NAD-kapowanego RNA o wysokiej homogenności. Badania odporności RNA z różnymi NAD-kapami na działanie enzymów degradujących pozwoliły zidentyfikować związki o różnorodnych właściwościach. Wśród ośmiu nowych chemicznie zmodyfikowanych analogów NAD zidentyfikowano związki, które nadawały RNA odporność na aktywność pirofosfataz (NudC/Nudt12), ale zachowywały podatność na aktywność fosfodiesterazy DXO (NppsA), związki, które były podatne na pirofosfatazy, ale nadawały zmniejszoną podatność na DXO (NppA_{mpG}) oraz związki, które nadawały zmniejszoną (w różnym stopniu) podatność na oba rodzaje enzymów (D1 i D2 NppsA, D1 i D2 NppsA_{mpG}). Wyniki te pozwalają sądzić, że grupa otrzymanych związków stanowi zestaw narzędzi chemicznych szczególnie przydatnych w badaniach biochemicznych nad udziałem różnych enzymów degradujących NAD-RNA. Inne potencjalne zastosowania zsyntetyzowanych analogów obejmują badania nad biologicznymi funkcjami NAD-RNA i identyfikację białek efektorowych, które rozpoznają 5'-koniec NAD-RNA. Opracowane przeze mnie metody syntezy analogów NAD i analogów PAPS (o czym poniżej) wykorzystałam także do chemicznej syntezy analogu FAD fosforylowanego w pozycji 3' (FADP). Związek ten został wykorzystany w badaniach krystalograficznych z enzymem DXO¹⁰¹.

5.3. OTRZYMYWANIE ANALOGÓW PAPS ORAZ ICH EWALUACJA

Drugim kofaktorem, na którym skupiłam swoją uwagę w trakcie badań doktorskich, była cząsteczka PAPS. Oba związki należą do grupy kofaktorów adeninowych a ich strukturalne podobieństwo sprawiło, że doświadczenie zdobywane w procesie syntezy analogów NAD i FAD, mogłam wykorzystać do syntezy analogów PAPS i *vice versa*. Dodatkowo, zarówno w przypadku enzymów rozpoznających NAD jak i sulfotransferaz, potrzebne są narzędzia oparte na strukturze naturalnych kofaktorów. Zainteresowanie

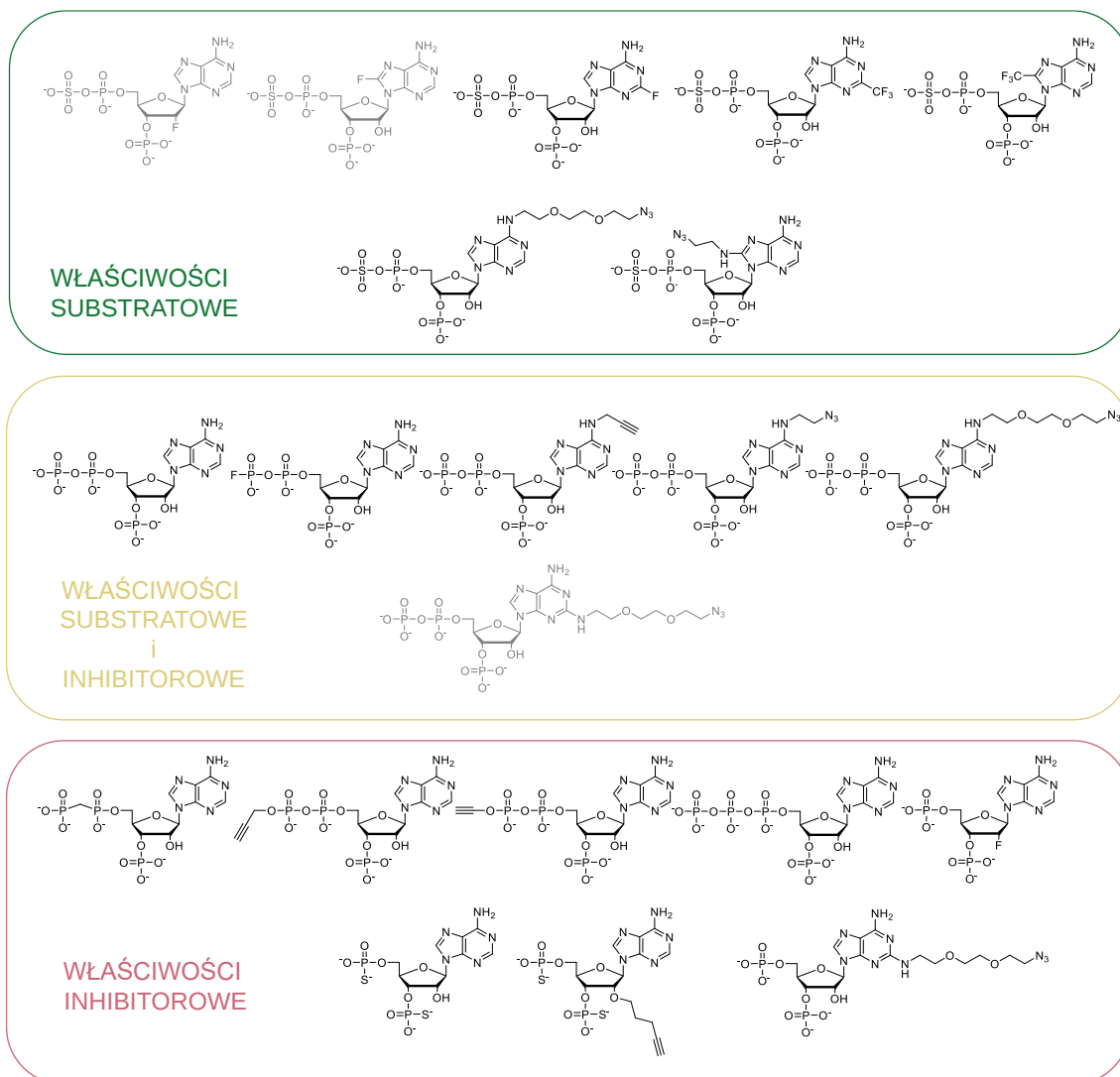
jakim cieszy się w ostatnich latach cząsteczka NAD przyczyniło się do powstania wielu nowych metod wykorzystujących zjawiska fizyczne, które mają na celu pomóc w zrozumieniu roli NAD-RNA. Jednakże, w przypadku sulfotransferaz, wciąż brakuje narzędzi i metod, które umożliwią lepsze poznanie tej niezwykle ważnej grupy enzymów. W ramach badań doktorskich postanowiłam podjąć próbę rozwiązania tego problemu.

Swoje rozważania, w kontekście postawionego celu, rozpoczęłam od zadania sobie pytania: gdzie możliwe jest wprowadzenie modyfikacji w obrębie struktury PAPS w kontekście syntezy oraz na co wpłyną te modyfikacje (**Rys. 24**). W wyniku tej analizy zarysował się naturalny podział zaprojektowanych związków na analogii funkcjonalne (substraty) oraz inhibitory.



Rys. 24. Możliwe miejsca modyfikacji struktury PAPS.

Pierwszą grupę czyli (potencjalne) analogi funkcjonalne stanowią przede wszystkim związki posiadające ugrupowanie siarczanowe oraz modyfikacje w miejscach niebiorących udziału w procesie katalitycznym. Miejsca te mogą stanowić przestrzeń do wprowadzania znaczników, ich funkcjonalizację linkerami z ugrupowaniem alkinowym (co pozwala w kolejnym etapie przyłączyć znacznik metodą addycji azydkowo-alkilowej) lub wprowadzenie atomów takich jak fluor (wykorzystanie tych analogów do badania innymi technikami np. ^{19}F NMR). Interesująca w tym kontekście jest szczególnie pozycja 2' rybozy oraz C2, C8 i N6 zasady azotowej (**Rys. 25**; zielona ramka). Kolejną grupę stanowią analogi, w których ugrupowanie siarczanowe zostało zastąpione innym ugrupowaniem o takim samym (lub zbliżonym) ładunku oraz objętości np. fosforanem lub fluorofosforanem, co ma na celu zwiększenie stabilności otrzymanych analogów nie zmniejszając (lub potencjalnie poprawiając) powinowactwo tych ligandów do białka (**Rys. 25**; żółta ramka). Ostatnią grupę stanowią związki, które są strukturalnymi odpowiednikami naturalnego inhibitora sulfotransferaz (PAP) lub posiadają modyfikacje hamujące aktywność ST jednocześnie zachowując wysokie powinowactwo (**Rys. 25**; czerwona ramka).



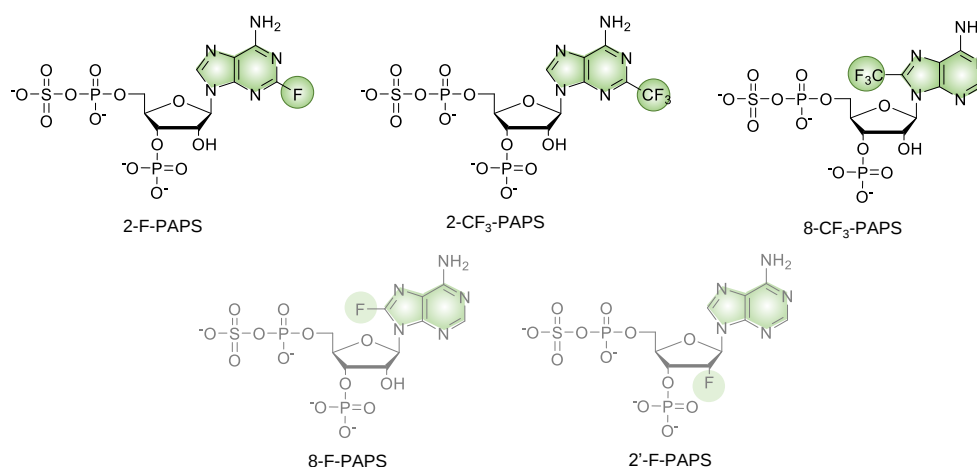
Rys. 25. Umowny podział zaprojektowanych związków ze względu na ich potencjalne właściwości względem sulfotransferaz. Jaśniejszym kolorem zazaczyłam związki, których nie udało się otrzymać, pomimo wielokrotnych prób syntezy.

5.3.1. SYNTEZA ANALOGÓW PAPS

W pierwszej kolejności przedstawię syntezę analogów PAPS posiadających niezmodyfikowaną resztę siarczanową, ponieważ związki te otrzymywałam na drodze zbliżonych ścieżek syntezy. Do grupy tych związków należą fluorowane analogi PAPS (posiadające grupę fluorową lub trifluorometylową w pozycjach C2 oraz C8 adeniny) oraz związki posiadające różnej długości linkery w pozycji C8 oraz N6 adeniny.

Fluorowane analogi PAPS otrzymywałam, głównie z myślą o ich potencjalnym zastosowaniu w spektroskopii ^{19}F NMR. W tym celu otrzymałam trzy fluorowane analogi PAPS: jeden z podstawnikiem fluorowym w pozycji C2 adeniny, oraz dwa z grupą trifluorometylową w pozycji C2 lub C8. Założeniem wprowadzenia tych modyfikacji

było porównanie właściwości związków podstawionych jednym lub trzema (w formie grupy trifluorometylowej) atomami fluoru. Spodziewałam się, że fluorowany substrat, PAPS, oraz produkt, PAP, będą wykazywały inne przesunięcia chemiczne w widmie NMR oraz, że obecność trzech równoważnych atomów fluoru powinna zwiększyć czułość i jakość sygnału ^{19}F NMR. Istniało jednak ryzyko, że przestrzennie bardziej wymagająca grupa trifluorometylową będzie stanowić zawadę przestrzenną lub wpływać na konformację cząsteczki PAPS, co może skutkować odrzuceniem zmodyfikowanego związku jako kofaktora przez enzymy z grupy ST. Początkowy plan modyfikacji obejmował również otrzymanie dwóch analogów PAPS, z podstawnikiem 8-fluorowym na adeninie (8-F-PAPS) oraz fluorem w pozycji 2' rybozy (2'-F-PAPS) (**Rys. 26**). Jednakże w trakcie syntezy okazało się, że 8-fluoroadenozyna jest bardzo podatna na depurynację, co uniemożliwiło przeprowadzenie syntezy zaś 2'-F-PAPS ulegał rozpadowi podczas oczyszczania metodą chromatografii jonowymiennej. Miejsca i sposoby modyfikacji wybrałam analizując możliwości syntetyczne oraz struktury krystalograficzne modelowych sulfotransferaz używając programu Chimera (struktury pozyskane z bazy PDB: AtSOT18 w kompleksie z PAP; symbol: 5MEK oraz SULT1A3 w kompleksie z dopaminą i PAP; symbol: 2A3R). Z moich obserwacji wynikało, że pozycje C2 oraz C8 adeniny nie są bezpośrednio zaangażowane w oddziaływania w kieszeni wiążącej PAPS i dodatkowo wokół tych atomów węgla nie ma dużego zatłoczenia reszt aminokwasowych, co potencjalnie umożliwia wprowadzenie niewielkich objętościowo grup funkcyjnych, nie zaburzających przy tym oddziaływania białko – kofaktor.



Rys. 26. Struktury zaprojektowanych analogów PAPS do badania ^{19}F NMR

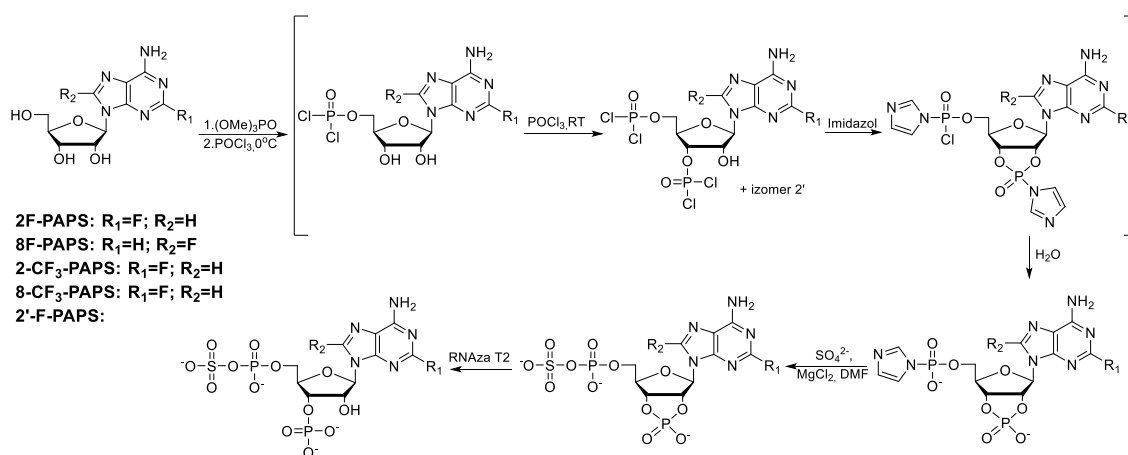
Synteza zaprojektowanych powyżej związków obejmuje dwa kluczowe etapy. Pierwszym jest wprowadzenie modyfikacji w obrębie adeniny oraz selektywne otrzymanie cząsteczki PAPS. W literaturze opisano wiele ścieżek syntezy PAPS metodami enzymatycznymi, jednakże, taka droga syntezy jest bardzo ograniczona ze względu na skalę oraz wysoki koszt. Z tego względu jedynym wyborem było opracowanie metody syntezy chemicznej. Jest to podejście trudne i niesie ze sobą kilka istotnych problemów do rozwiązania:

- Selekttywne wprowadzenie w obrębie adenozyiny (lub jej analogu) 3'-fosforanu lub jego prekursora – 2',3'-cyklofosforanu. Wynika to z faktu, że rozdzielenie izomerów 2' i 3' fosforanu jest niezwykle trudne, a wręcz niemożliwe za pomocą większości metod.

- Wprowadzenie grupy fosforanowej (lub jej pochodnej) w pozycję 5' bez naruszenia 3'-fosforanu/cyklicznego fosforanu w pozycji 2',3', co skutkowałoby otrzymaniem mieszaniny izomerów 2' i 3'.

Fluorowane nukleozydy pozyskałam ze źródeł handlowych (2-fluoroadenozyina) lub dzięki uprzejmości dr Mikołaja Chromińskiego, który otrzymał je według opracowanej przez siebie procedury^{102, 103}. Syntezę rozpoczęłam od przeprowadzenia fosforylacji metodą Yoshikawy z pewnymi modyfikacjami⁸⁵. Odpowiedni nukleozyd zawieszałam w (MeO)₃PO (osiągając stężenie ok. 190 mM) a następnie dodawałam odczynnik fosforylujący, POCl₃ (3 ekwiw.). Utworzony addukt rozpuszczalnika z POCl₃, ze względu na dużą zawadę steryczną, ulega w pierwszej kolejności atakowi nukleofilowemu grupy hydroksylowej w pozycji 5' adenozyiny. Reakcja jest na tym etapie prowadzona w 0 °C, aby zapewnić selektywność procesu. Ponieważ w trakcie postępu reakcji fosforylacji powstaje HCl, powodując zakwaszenie środowiska reakcji, bardziej wrażliwe związki mogą w tych warunkach ulegać depurynacji. Dlatego też w przypadku analogów z ugrupowaniem trifluorometylowym konieczne było prowadzenie reakcji w obecności 2,6-lutydyny. Po stwierdzeniu całkowitej konwersji nukleozydu w odpowiedni 5'-dichlorofosforan nukleozydu (około 1 h) dodawałam kolejną porcję odczynnika fosforylującego POCl₃ (6 ekwiw.) i pozostawiałam reakcję na około 20 h w temperaturze pokojowej. Zwiększenie temperatury prowadziło do przebiegu reakcji fosforylacji również w pozycjach mniej preferowanych, trudniej dostępnych dla adduktu POCl₃-(OMe)₃PO, czyli 2'-O- oraz 3'-O nukleozydu, a potencjalnie, również do reakcji ubocznych polegających na następczym podstawieniu grupy fosforylowej halogenem. Następnie difosforylowany produkt pośredni wytrącałam zimnym eterem dietylowym

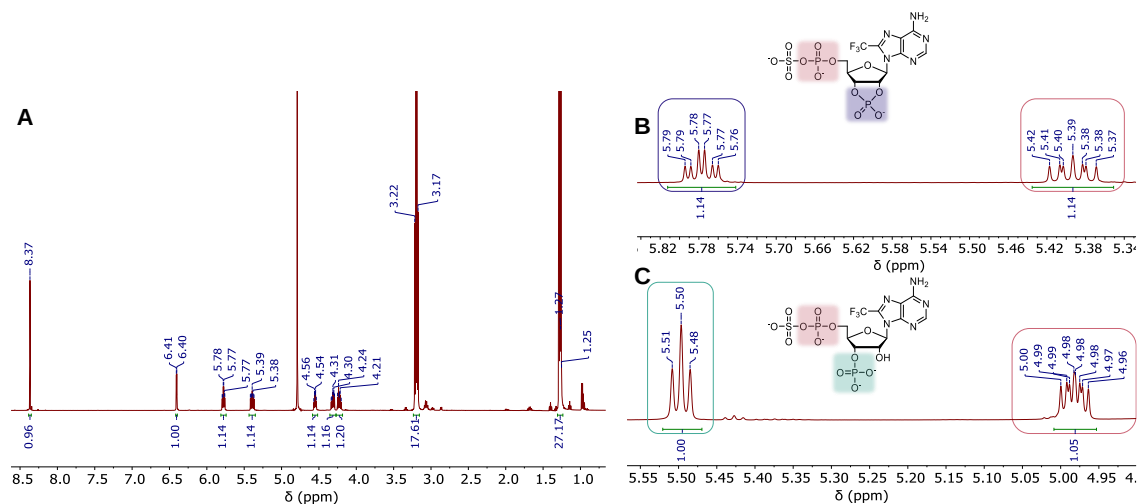
w celu pozbycia się nadmiaru odczynnika fosforylującego. Powstały biały osad odwirowywałam, a następnie ponownie rozpuszczałam w fosforanie trimetylu (do stężenia ~100 mM). Na tym etapie produkt występuje w formie 5'-dichlorofosforanu 3'-dichlorofosforanu adenozyiny (oraz jego izomeru 2'; **Rys. 27**). Rozpuszczony osad poddałam reakcji substytucji heterocyklicznym nukleofilem, imidazolem, a produkt tej reakcji hydrolizie. Aktywacja nukleotydu jest konieczna aby zwiększyć elektrofilowość terminalnego atomu fosforu a tym samym umożliwić późniejsze sprzęganie nukleotydu z odpowiednim analogiem siarczanu. Powstały w ten sposób *P*-imidazolid 5'-monofosforanu 2',3'-cyklofosfoadenozyny ulega rozkładowi w formie stałej, dlatego izolowałam go w postaci roztworu DMF.



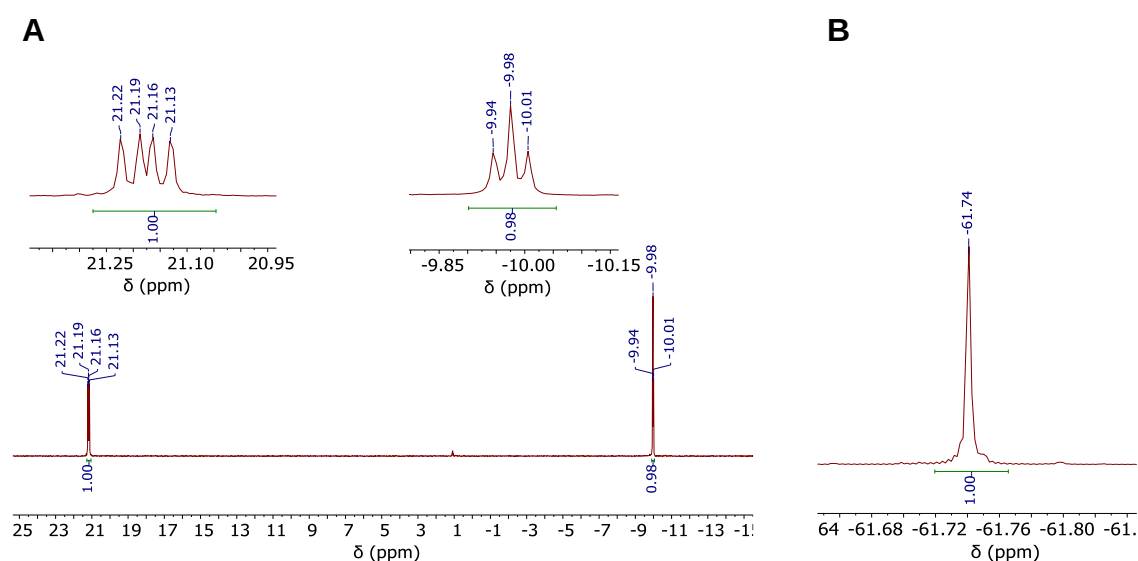
Rys. 27. Schemat syntezy fluorowanych analogów PAPS.

Powstałe *P*-imidazolidy oczyszczałam metodą chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sephadex. Oczyszczone związki, w formie soli trietyloamonowej w postaci zamrożonego roztworu wodnego, przechowywałam w temp. -20°C, aby uniknąć rozkładu, który występował podczas próby wyizolowania ich w postaci stałej. W celu użycia w następnym etapie reakcji roztwory *P*-imidazolidów odparowywałam pod zmniejszonym ciśnieniem w obecności DMF (ok. 1-2 ml), aż do uzyskania stężonego roztworu DMF. Fluorowane *P*-imidazolidy nukleotydów w roztworze DMF (54,5 mM) poddawałam reakcji sprzęgania z siarczanem tributylamonowym (4 ekwiw.) w obecności jonów Mg^{2+} (8 ekwiw.). Dodatek jonów metali jest w tej reakcji konieczny aby zneutralizować ładunki ujemne na fosforanie i siarczanie, a tym samym zwiększyć rozpuszczalność tych związków w rozpuszczalniku aprotycznym i dzięki odpowiedniej koordynacji umożliwić ich zbliżenie niezbędne do przebiegu reakcji. Tak otrzymane fluorowane analogi PAPS oczyszczałam z użyciem złoża DEAE-Sephadex. Wydajność na tym etapie wynosiła około 42-73%. Następnie związki oczyszczałam metodą

RP HPLC (wydajność etapu: 27-52%). Ponieważ związki wciąż pozostawały w formie cyklicznego fosforanu konieczna była jego selektywna hydroliza (pożądanym produktem jest 5'-fosfosiarczan 3'-fosforanu adenozyiny a nie jego izomer 2'). Jest to możliwe jedynie na drodze enzymatycznej z użyciem RNAzy T2, która hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe.⁸² Proces ten przebiegał z wydajnością ~90%. Struktury otrzymanych związków potwierdziłam metodą HR-MS, ¹H NMR (**Rys. 28**), ³¹P NMR (**Rys. 29.A**) oraz ¹⁹F NMR(**Rys. 29.B**).

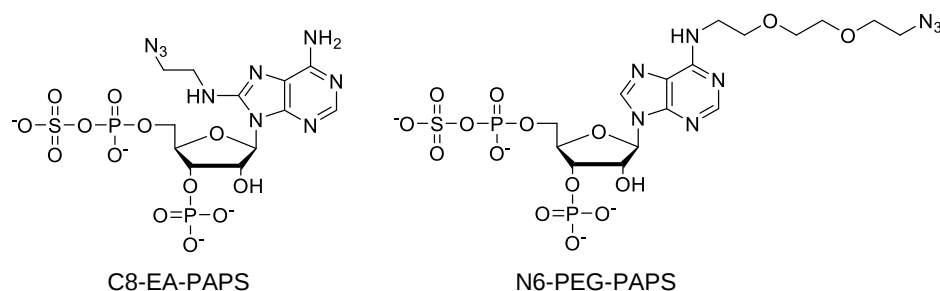


Rys. 28. Widmo ¹H NMR związku 8CF₃-cPAPS; **A.** Widmo przedstawione w pełnym zakresie; **B.** Sygnały dla ¹H w pozycji 2' oraz 3' przed rozcinaniem enzymatycznym (8CF₃-cPAPS); **C.** Sygnały dla ¹H w pozycji 2' oraz 3' po rozcinaniu enzymatycznym (8CF₃-PAPS). Obserwowany jest zanik sprzężeń z jądrem ³¹P dla protonu 2' w wyniku hydrolizy enzymatycznej, skutkujący uproszczeniem struktury subtelnego odpowiedniego multipletu (5,78→5,50 ppm), co potwierdza oczekiwany przebieg reakcji.



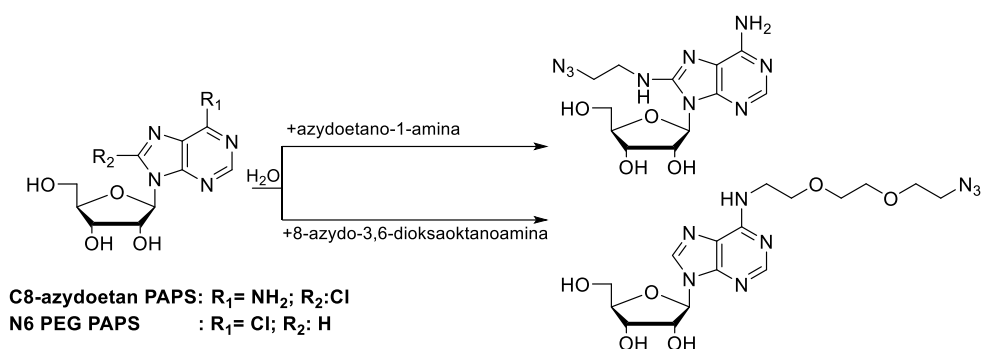
Rys. 29. A. Widmo ³¹P NMR związku 8CF₃-cPAPS; **B.** Widmo ¹⁹F NMR związku 8CF₃-cPAPS.

Podobne ścieżki syntezy zastosowałam do otrzymania analogów modyfikowanych w obrębie zasady innymi podstawnikami (**Rys. 30**).



Rys. 30. Struktury analogów PAPS modyfikowanych w obrębie adeniny.

Pierwszym etapem było otrzymanie odpowiednio zmodyfikowanych nukleozydów (**Rys. 31**). Synteza polegała na wprowadzeniu znacznika w reakcji podstawienia z użyciem 2- lub 6- chloropurynorybozydów zawieszonych w H₂O (lub DMSO) oraz odpowiedniego linkera.



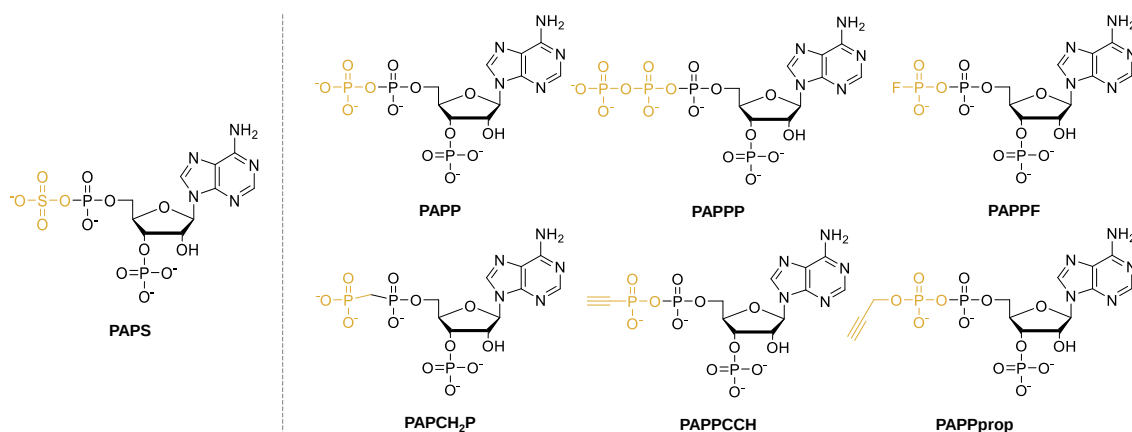
Rys. 31. Schemat syntezy rybonukleozydów podstawionych wybranymi linkerami.

Tak otrzymane związki następnie poddawano reakcji fosforylacji, sprzęgania oraz rozcinania enzymatycznego analogicznie jak w przypadku fluorowanych analogów PAPS, co doprowadziło do izolacji oczekiwanych związków z dobrymi lub średnimi wydajnościami (szczegóły w części eksperymentalnej).

5.3.2. SYNTEZA ANALOGÓW PAPS – ANALOGI UGRUPOWANIA FOSFOSIARCZANOWEGO

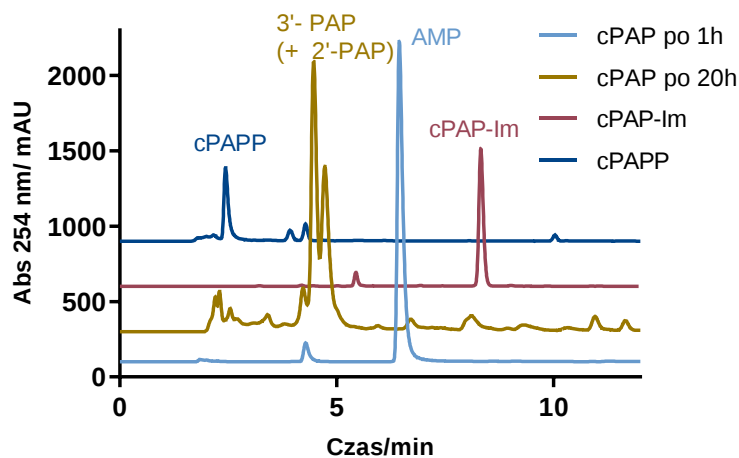
Zastąpienie ugrupowania siarczanowego miało na celu potencjalne stworzenie zarówno analogów funkcjonalnych, które nie wpływałyby na aktywność sulfotransferazy zaś w wyniku zajścia reakcji enzymatycznej następowałoby przeniesienie grupy izosterycznej z analogu PAPS na substrat, jak i inhibitorów sulfotransferaz. Analogii te miały w założeniu m.in. ułatwić badania przebiegu reakcji sulfurylacji, umożliwić lokalizację komórkową a także badanie szlaków metabolicznych w których biorą udział ST. Modyfikacje obejmowały wprowadzenie grupy fluorofosforanowej (możliwość

wykorzystania techniki ^{19}F NMR), fosforanowej (ten sam ładunek oraz objętość), C-fosfonianowej czy fosforan propargilu (umożliwienie znakowania). Wśród zaprojektowanych związków znalazł się też jeden związek, PAPCH₂P będący potencjalnym inhibitorem ST. W jego strukturze grupa siarczanowa zastąpiona została metylenobisfosfonianem w celu zwiększenia odporności tego analogu na hydrolizę enzymatyczną. Zsyntezowane związki należące do tej grupy są przedstawione są na **Rys. 32**.



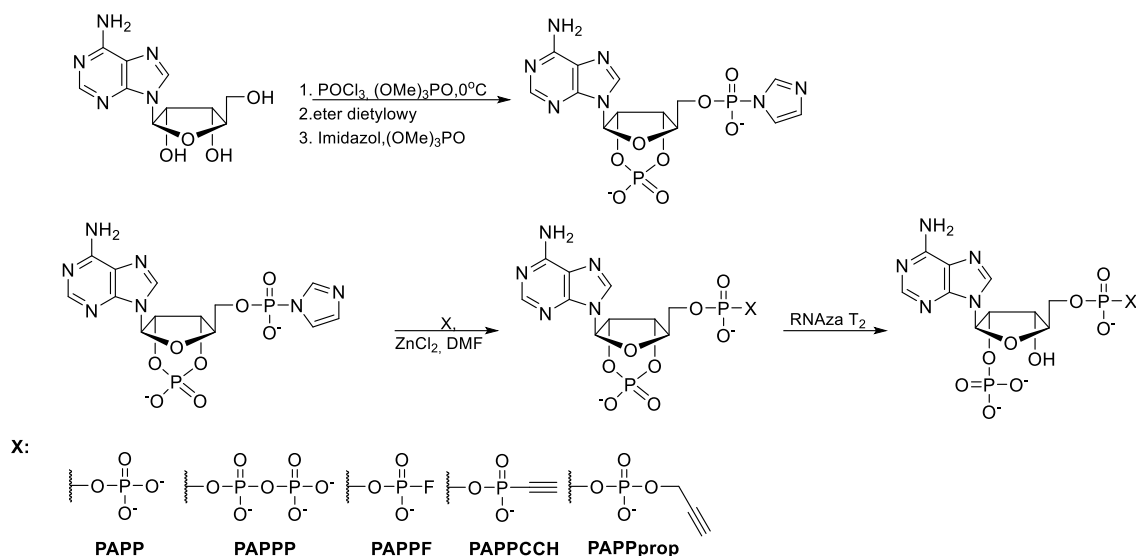
Rys. 32. Struktury zaprojektowanych analogów PAPS z modyfikacjami w miejscu przyłączenia grupy siarczanowej.

Synteza przebiegała analogicznie do funkcjonalnych analogów PAPS z pewnymi modyfikacjami. W pierwszym etapie przeprowadzałam fosforylację adenozyiny zakończoną hydrolizą w warunkach zasadowych (w obecności imidazolu). Następnym etapem było sprzęganie otrzymanego *P*-imidazolidu w rozpuszczalniku aprotycznym w obecności ZnCl_2 z odpowiednią podjednostką fosforanową (**Rys. 33**).



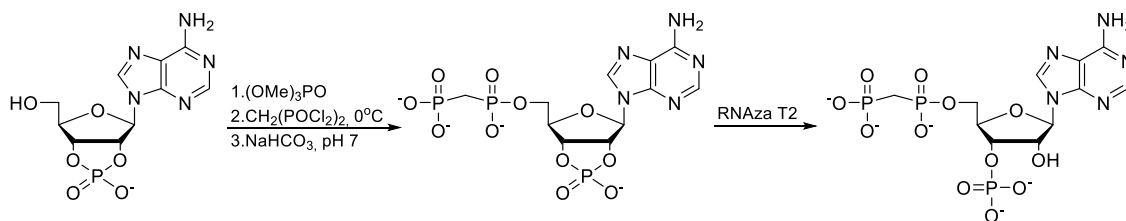
Rys. 33. Przykładowe profile HPLC z reakcji fosforylacji zakończonej imidazolem oraz sprzęganiem w celu otrzymania cPAPP.

Po etapie oczyszczania otrzymane analogi w postaci soli amonowych poddawałam hydrolizie enzymatycznej z użyciem RNAzy T2, zaś produkty końcowe oczyszczałam na handlowo dostępnych filtrach Amicon (**Rys. 34**).



Rys. 34. Schemat etapu sprzęgania P-imidazolidu z odpowiednią podjednostką fosforanową.

Wyjątek, w kontekście syntezy stanowił związek PAPCH_2P , który otrzymywałam fosforylując 2',3'-cyklofosfoadenozynę z udziałem $\text{CH}_2(\text{POCl}_2)_2$. Wykazuje on większą reaktywność niż standardowo używany przeze mnie POCl_3 co wynika z faktu, że grupa CH_2 zwiększa elektrofilowość atomu fosforu¹⁰⁴. Reakcja prowadzona była w fosforanie trimetylu i została zakończona zgodnie z opisywaną przeze mnie wyżej procedurą (**Rys. 35**).

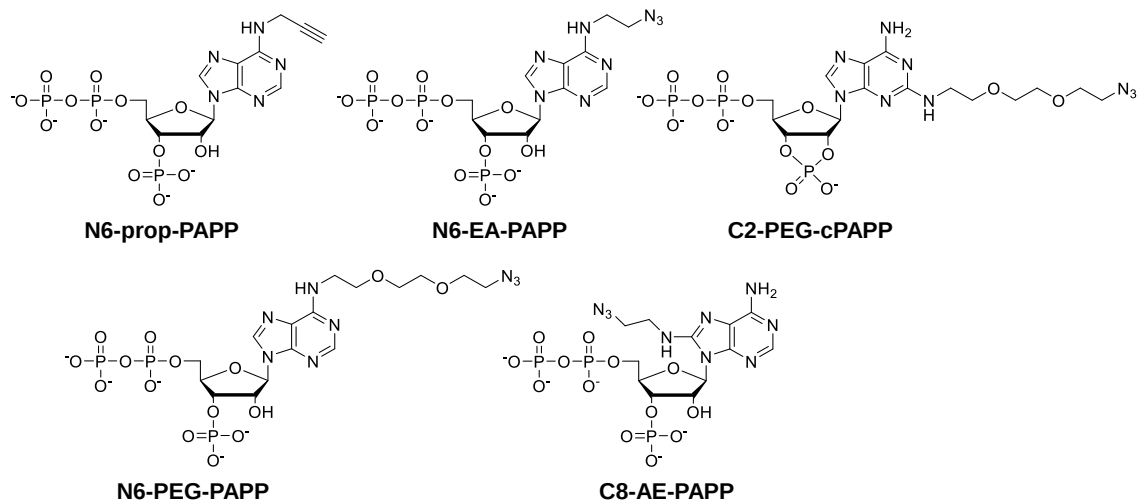


Rys. 35. Schemat syntezy niehydrolizowalnego analogu PAPS.

5.3.3. SYNTEZA ANALOGÓW PAP I PAPS – MODYFIKACJE ZASADY AZOTOWEJ

Głównym celem, wprowadzenia modyfikacji na adeninie była późniejsza funkcjonalizacja otrzymanych analogów poprzez dodanie znacznika fluorescencyjnego. Takie związki mogłyby posłużyć m.in. do badania lokalizacji komórkowej, aktywności oraz jako złoże powinowactwa do wychwyty i oczyszczania sulfotransferaz. W założeniu analogii te miały wykazywać wysokie powinowactwo do sulfotransferaz bez ulegania

przekształceniom enzymatycznym (właściwości inhibitorowe). Dlatego też zastosowane w tym kontekście modyfikacje obejmowały wprowadzenie fosforanu w miejsce grupy siarczanowej (analogi PAPS) lub całkowite jej pominięcie (analogi PAP, naturalnego inhibitora sulfotransferaz). Dodatkowo, wprowadzone zostały linkery o różnej długości w trzy wybrane pozycje adenozyiny: C2, C8 oraz N6. Zaprojektowane i zsyntezowane analogii zostały przedstawione na **Rys. 36**. Jeden z zaprojektowanych związków, C2-PEG-cPAPP, nie ulegał hydrolizie enzymatycznej z udziałem RNAzy T2.

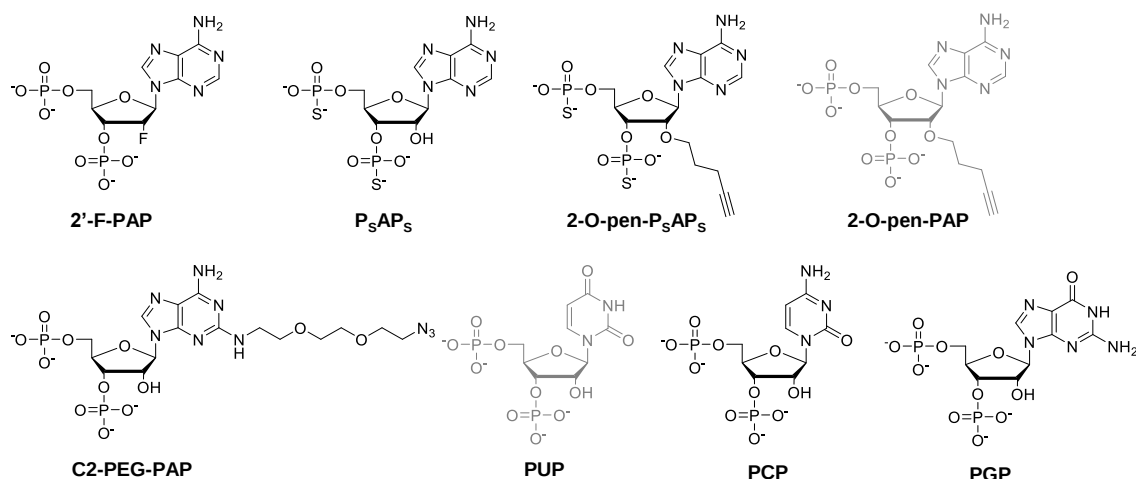


Rys. 36. Struktury analogów PAPS modyfikowanych na zasadzie azotowej.

Ścieżki syntezy tych związków przebiegały analogicznie do przedstawionych na **Rys. 35**. Jako substratów używałam samodzielnie zsyntezowanych nukleozydów podstawionych wybranym linkerem (propargiloaminą, azydoetano-1-aminą lub 8-azydo-3,6-dioksaoktanoaminą) na zasadzie azotowej.

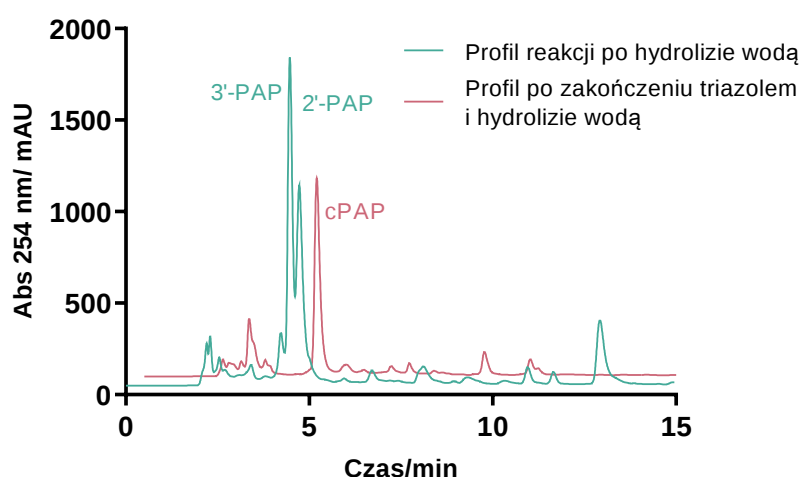
5.3.4. SYNTEZA ANALOGÓW PAP

Głównym celem otrzymania analogów PAP było stworzenie potencjalnych inhibitorów sulfotransferaz, które pozwolą zrozumieć procesy komórkowe w jakie zaangażowane są sulfotransferazy a także samą naturę oddziaływań jakie występują w kieszeni wiążącej kofaktor. Zaprojektowałam grupę związków posiadających modyfikacje na rybozie, czyli 2'-F-PAP, PsAPs oraz 2-O-pent PsAPs. Plan obejmował również syntezę 2-O-pent PAP jednakże próby syntezy zakończyły się niepowodzeniem. Druga grupa związków, modyfikowanych na zasadzie azotowej, obejmowała wprowadzenie linkera w pozycję C2 (C2-PEG-PAP) oraz zamianę zasady azotowej na inną tj. guanozynę, cytozynę czy uracyl (ostatniego związku nie udało się otrzymać). Struktury zaprojektowanych analogów PAP zostały przedstawione na **Rys. 37**.



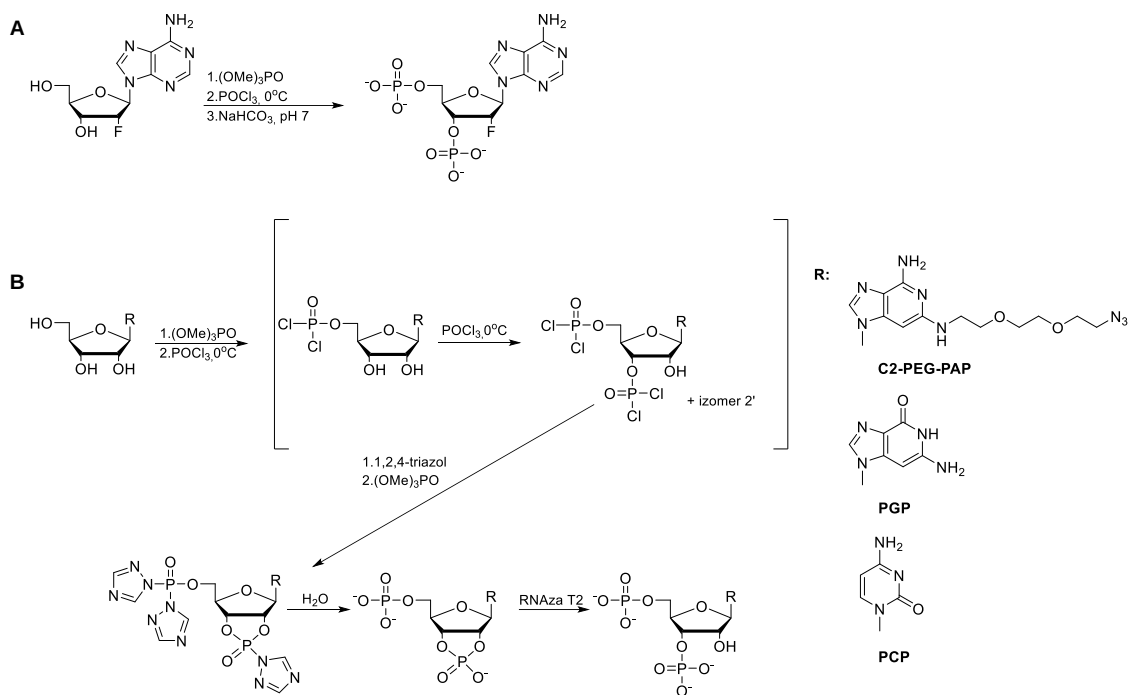
Rys. 37. Struktury zaprojektowanych analogów PAP. Związków zaznaczonych jaśniejszym kolorem nie udało się uzyskać mimo podejmowanych prób syntezy.

Ścieżkę syntezy związków 2'-F-PAP, C2-PEG-PAP, PCP i PGP przedstawiłam na **Rys. 39**. Syntezę rozpocząłam wychodząc z handlowo dostępnych (2'-FA, C, G) lub zsyntezowanych samodzielnie (C2-PEG-A) nukleozydów. W pierwszym etapie nukleozydy poddałam reakcji fosforylacji POCl₃ (3 ekwiw.) w fosforanie trimetylu, w temp. 0°C. Po około 1 h dodawałam kolejną porcję POCl₃ (6 ekwiw.) i pozostawiałam mieszaninę w łaźni lodowej gdzie powoli ogrzewała się do temperatury pokojowej. Po 24 h wytrąciłam produkt w zimnym eterze dietylowym. W przypadku związku 2'-F-PAP wytrącony osad rozpuściłam w wodzie i doprowadziłam do pH 7 za pomocą NaHCO₃ (**Rys. 38**).



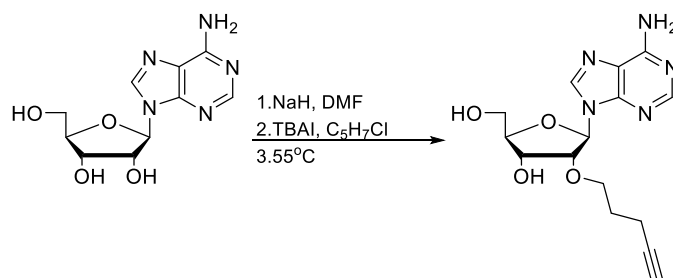
Rys. 38. Chromatogramy z przebiegu reakcji fosforylacji adenozyiny zakończone wodą oraz w obecności nukleofilowej zasady.

Ponieważ podczas prób oczyszczania związku metodą chromatografii jonowymiennej produkt ulegał degradacji, etap ten został pominięty, zaś związek oczyściłam metodą RP-HPLC. W przypadku związków PCP oraz PGP konieczna była optymalizacja ostatniego etapu syntezy. Po etapie wytrącania produktu fosforylacji w zimnym eterze dietylowym konieczne okazało się użycie zasady, która będzie w reakcji pełnić rolę nukleofila co umożliwi cyklizację fosforanu w pozycji 2', 3' (w celu uniknięcia izolacji mieszaniny izomerów 2'/3'). Mając na uwadze niestabilność imidazolowych pochodnych w niskim pH postanowiłam w pierwszej kolejności wykorzystać w tym celu stosowany już imidazol, a następnie poddać otrzymany P-imidazolid hydrolizie w środowisku kwaśnym. Jak się okazało, reakcja hydrolizy P-imidazolidu biegła równolegle z hydrolizą 2',3'-cyklofosforanu do niepożądanego mieszaniny 2'/3'-fosforanów. Dlatego też potrzebne było znalezienie innej zasady, która sprzyjałaby cyklizacji w pozycji 2'/3' podobnie jak imidazol, ale ulegałaby hydrolizie już w pH bliskim obojętnego. Przetestowałam takie aminy jak trietyloaminę, diizopropylaminę, 3-amino-1,2,4-triazol i 1,2,4-triazol. Dwie pierwsze zasady nie powodowały cyklizacji (prawdopodobnie ze względu na brak właściwości nukleofilowych), w przeciwieństwie do 3-amino-1,2,4-triazolu i 1,2,4-triazolu. Głównym celem optymalizacji było wybranie odczynnika, który umożliwi hydrolizę wszystkich wiązań P – N. Warunek ten został spełniony przez 1,2,4-triazol, który umożliwił otrzymanie produktu końcowego, 5'-fosforanu 2',3'-cyklofosforanu adenozyne (wydajność: 20%) (**Rys. 39.B.**).



Rys. 39. Schemat syntezy analogów PAP; **A.** 2'-F-PAP; **B.** C2-PEG-PAP, PGP oraz PCP.

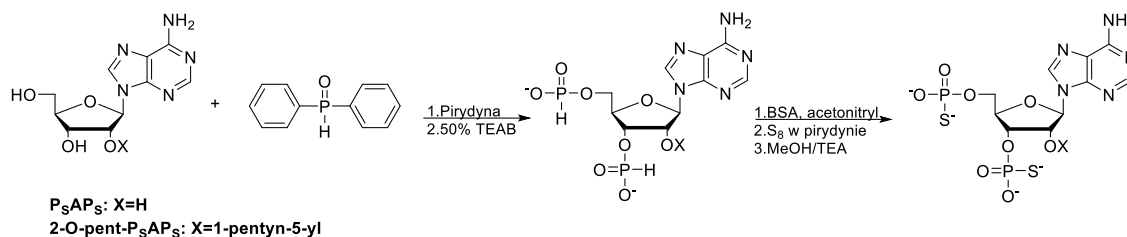
Syntezę 2-O-pent-PsAPs rozpoczęłam od przyłączenia 5-chloro-1-pentyenu w pozycję 2' adenozyne. W tym celu adenozyne, suszoną pod próżnią, rozpuszczono w DMF (50 mM) w 50°C. Reakcję schłodzono do temperatury 0°C i dodano NaH (4 ekwiw.). Na tym etapie widoczne było wydzielanie H₂. Po 1 h dodano TBAI oraz 5-chloropent-1-yn. Po 5 dniach, gdy stwierdziłam całkowitą konwersję substratu, mieszaninę oczyszczałam metodą chromatografii kolumnowej (12% MeOH w DCM) i wytrąciłam w etanolu¹⁰⁵ (**Rys. 40**).



Rys. 40. Schemat syntezy 2'-O-pent-A.

Tak otrzymaną 2'-O-(1-pent-4-ynylo)adenozyne lub adenozyne (w przypadku syntezy PsAPs) poddałam reakcji z H-fosfonianem difenylu w celu wprowadzenia grupy H-fosfonianowej w pozycję 5'-O oraz 3'-O. Reakcję tę prowadziłam w atmosferze gazu obojętnego. Mieszaninę poreakcyjną traktowałam roztworem 0,6 M w celu usunięcia

podstawnika fenyłowego. Oczyszczony produkt poddałam reakcji utleniania siarką elementarną w obecności bis(trimetylosylil)acetamid (BSA)¹⁰⁶(Rys. 41).



Rys. 41. Schemat syntezy PsAP_S oraz 2-O-pent-PsAP_S .

Ostatnim etapem syntezy było oczyszczanie, kolejno metodą chromatografii jonowymiennej oraz RP-HPLC, co pozwoliło na wydzielenie pożądanego produktu z wydajnością 32-40%.

5.4. BADANIE WŁAŚCIWOŚCI ANALOGÓW PAP I PAPS

Po etapie projektowania i syntezy, który zaowocował 19 nowymi analogami PAP i PAPS, przystąpiłam do badania ich właściwości względem ST. Biorąc pod uwagę liczbę otrzymanych związków, poszukiwałam metod, które pozwoliłyby w sposób szybki i precyzyjny wyznaczyć (i) powinowactwo, (ii) potencjalne właściwości substratowe lub (ii) potencjał inhibitorowy tych związków względem modelowych sulfotransferaz, co dałoby informacje na temat wpływu poszczególnych modyfikacji na aktywność związków i umożliwiło porównanie wybranych analogów między sobą.

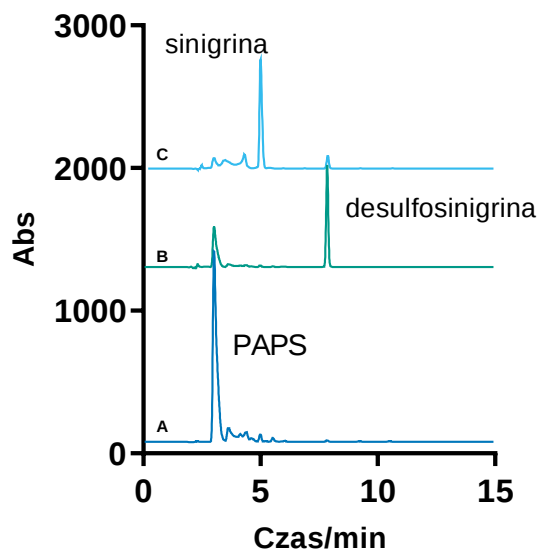
Moją uwagę zwrócił fakt, że dotychczas w literaturze nie została opisana metoda, która spełniałaby te kryteria. Dostępne metody wymagają wprowadzenia izotopów, są kosztowne i nie pozwalają wyznaczyć poszukiwanych przeze mnie parametrów w sposób bezpośredni. Co więcej brakuje metod, które będą uniwersalne dla wszystkich ST. Analizując dostępne techniki postanowiłam podjąć próbę rozwiązania nakreślonego powyżej problemu opracowując w pierwszej kolejności metodę HPLC. Dostępność i precyzyjność tej metody spowodowały, że wydała się ona odpowiednia do oceny właściwości substratowych otrzymanych związków. Jednakże, metoda HPLC posiada szereg istotnych ograniczeń takich jak niska przepustowość, konieczność optymalizacji warunków analizy względem każdego substratu, długi czas trwania pomiarów czy wysoka konsumpcja analitów. Tym samym wciąż nie zostaje rozwiązany problem uniwersalności metody. W tym kontekście moją uwagę zwróciły metoda termoforezy mikroskalowej, która może posłużyć do oceny powinowactwa związków do

sulfotransferaz oraz ^{19}F NMR jako metoda oceny aktywności. W poniższym rozdziale przedstawię wyniki badań prowadzonych z użyciem wspomnianych technik.

5.4.1. BADANIE WŁAŚCIWOŚCI SUBSTRATOWYCH I INHIBITOROWYCH ZA POMOCĄ HPLC.

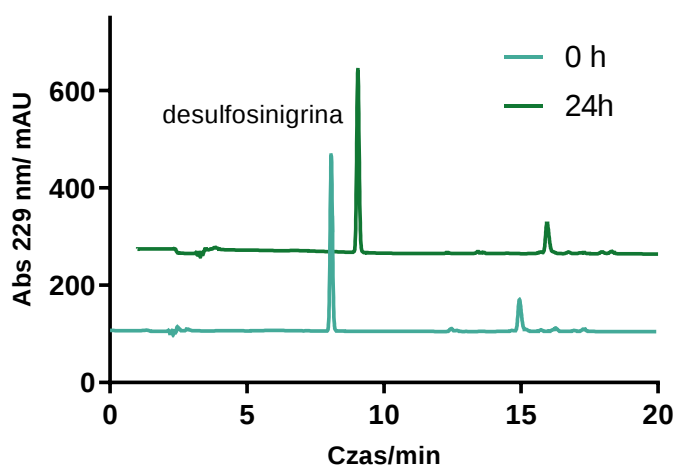
W przypadku metody HPLC kluczowe jest w pierwszej kolejności określenie długości fali najbardziej optymalnej do monitorowania przebiegu reakcji oraz optymalizacji rozdziału substratów i produktów na kolumnie chromatograficznej. W przypadku sulfotransferaz są dwie możliwe ścieżki analizy tj. obserwowanie kofaktora (który z biegiem reakcji przekształca się w odpowiedni analog PAP; długość fali 254 nm) lub substratu (ulega reakcji sulfurylacji; długość fali odpowiednia dla wybranego substratu). W kontekście uniwersalności metody intuicyjny wydaje się wybór analizy kofaktora jednakże długość fali 254 nm absorbowana jest również przez inne składniki reakcji w wyniku czego na chromatogramie widocznych jest wiele sygnałów. Utrudnia to poprawne przypisanie sygnałów do związków i wymusza każdorazowe użycie metody MS-ESI w celu identyfikacji sygnałów. Aby rozwiązać ten problem analizę prowadziłam dla dwóch długości fal 254 nm, w celu obserwowania PAPS i produktu reakcji, PAP, oraz 229 nm lub 280 nm odpowiednio dla desulfosinigriny (oraz sinigriny)⁶⁸ i dopaminy (oraz dwóch izomerów siarczanu dopaminy)¹⁰⁷.

W celu optymalizacji metody przetestowałam różne układy chromatograficzne w tym bufora na bazie octanu amonu oraz fosforanów, a także kolumny HPLC ze złożem C18 modyfikowanym grupami funkcyjnymi takimi jak TMS (trimetylsilil) czy oktadecyl. Najlepszy rozdział (największe różnice w czasach retencji substratu i produktu) uzyskałam w buforze 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6, na kolumnie ze złożem C18 oktadecyl (Supelcosil LC-18T). Taki układ stosowałam w dalszych badaniach. Po optymalizacji metody, zoptymalizowałam warunki reakcji tak aby stopień przereagowania dla niemodyfikowanego PAPS wynosił 30 lub 70% (**Rys. 42**). Miało to umożliwić identyfikację sygnałów pochodzących od poszczególnych reagentów. W przypadku gdyby reakcja zachodziła np. w 50% utrudnione byłoby określenie, który sygnał odpowiada wybranej cząsteczce. Warunki, które pozwoliły na spełnienie tego założenia wynosiły 200 μM analogu PAPS, 100 μM substratu (odpowiednio desulfosinigriny lub dopaminy), 100 nM enzymu oraz czas reakcji wynoszący 1 h.



Rys. 42. Analiza reakcji enzymatycznej metodą HPLC w buforze 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6. A. PAPS; B. desulfosinigrina; C. 200 μM PAPS, 100 μM desulfosinigriny, 100 nM AtSOT18, 1 h.

Po optymalizacji warunków przeprowadziłam reakcję z użyciem analogów będących potencjalnymi substratami ST. Były to związki C8-AE-PAPS, N6-PEG-PAPS oraz trzy fluorowane analogi PAPS, 2-F-PAPS, 2- CF_3 -PAPS i 8- CF_3 -PAPS. Wynik pomiarów był zaskakujący gdyż dwa pierwsze analogi nie wykazywały właściwości substratowych tj. nie obserwowałam postępu reakcji na chromatogramie (**Rys. 43**). Może to wynikać z faktu, że związki te wykazują powinowactwo do kieszeni wiążących białek jednakże wprowadzone na adeninie modyfikacje powodują taką zmianę konformacji w miejscu aktywnym białka, która uniemożliwia zajście reakcji.



Rys. 43. Chromatogramy przedstawiające przebieg reakcji N6-PEG-PAPS z AtSOT18 z dodatkiem desulfosinigriny w czasie 0 h i 24 h.

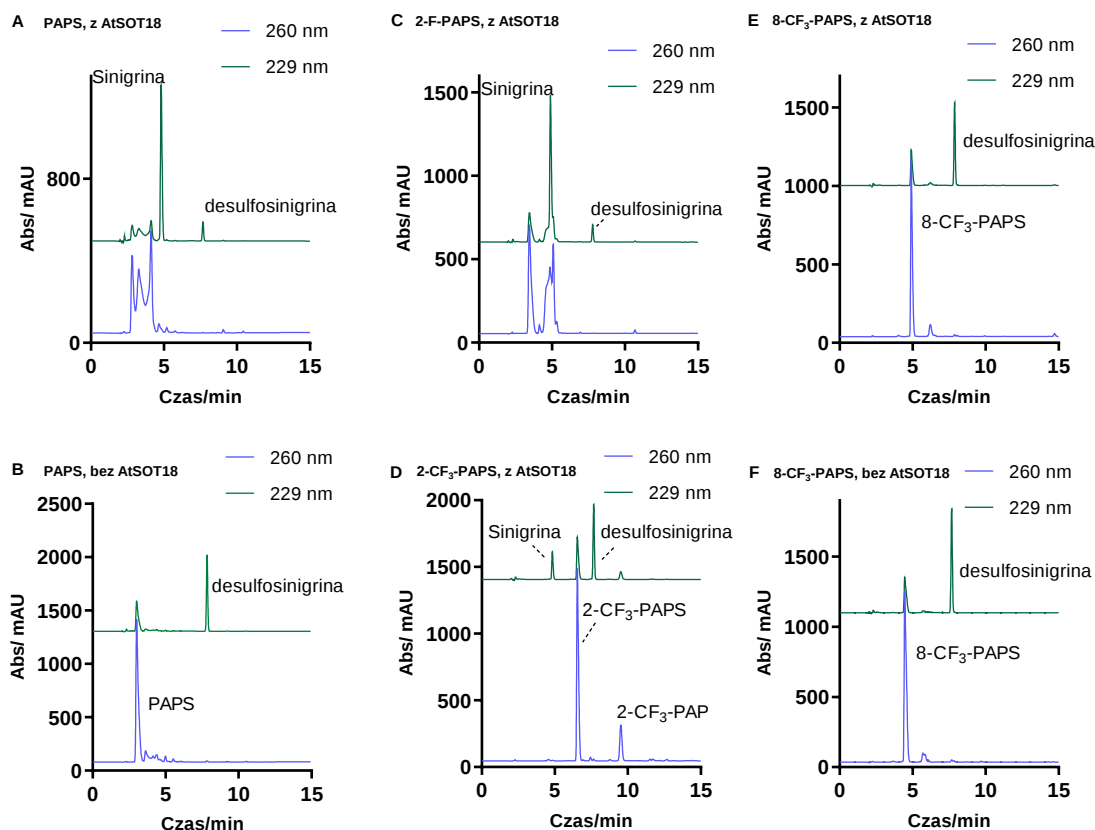
Natomiast w przypadku fluorowanych analogów PAPS obserwowałam jednoznacznie powstawanie oczekiwanych produktów reakcji, odpowiednio sinigriny dla AtSOT18 oraz siarczanu dopaminy dla SULT1A3. Wyniki te wskazują, że tylko bardzo niewielkie modyfikacje w obrębie zasady azotowej nie powodują utraty właściwości substratowych przez analogi PAPS. W następnym etapie badań przystąpiłam do weryfikacji, czy związki modyfikowane podstawnikami fluorowanymi mogą zostać użyte jako alternatywne substraty w badaniach z użyciem techniki ^{19}F NMR, w szczególności do monitorowania aktywności sulfotransferaz w czasie rzeczywistym.

5.4.2. OPRACOWANIE METODY ^{19}F NMR

Posiadając już zestaw analogów PAPS modyfikowanych fluorem, czyli 2-F-PAPS, 2-CF₃-PAPS oraz 8-CF₃-PAPS, postanowiłam zbadać ich właściwości substratowe względem dwóch modelowych sulfotransferaz, AtSOT18 i SULT1A3, czyli odpowiednio roślinnej i ludzkiej sulfotransferazy cytozolowej. Postęp reakcji niezależnie badałam metodami ^{19}F NMR oraz RP-HPLC. W obu przypadkach badania wymagały przeprowadzenia wstępnej optymalizacji. Dla lepszego zrozumienia w pierwszej kolejności przedstawię wyniki badań otrzymane metodą RP HPLC, które pozwoliły mi właściwie interpretować wyniki pomiarów metodą ^{19}F NMR. W pierwszej kolejności rozpoczęłam optymalizację metody RP HPLC umożliwiającą jednoczesną obserwację konsumpcji kofaktora (PAPS) i powstawania produktu (odpowiednio $R_t = 2,6$ min dla PAPS lub $R_t = 4,1$ min dla PAP). Przeprowadziłam reakcje enzymatyczne z AtSOT18 oraz SULT1A3 i ich specyficznymi substratami, odpowiednio desulfosinigriną oraz dopaminą w optymalnych dla tych enzymów warunkach^{108, 109}.

Dla białka AtSOT18 reakcja z 2-F-PAPS przebiegała w takim samym stopniu co z niemodyfikowanym PAPS co sugeruje, że wprowadzenie jednego atomu fluoru w pozycję C2 nie zaburzyło znacząco oddziaływania z kieszenią wiążącą białka. Na chromatogramie uzyskanym w wyniku analizy reakcji z 2-CF₃-PAPS również można zaobserwować dwa sygnały, desulfosinigrinę oraz sinigrinę, reakcja biegnie jednak znacznie wolniej. W przypadku reakcji z 8-CF₃-PAPS reakcja nie biegnie, gdyż na chromatogramie widnieje jedynie sygnał od desulfosinigriny, co potwierdziłam analizując reakcję bez dodatku enzymu (**Rys. 44**). Podsumowując wyniki dla AtSOT18 można stwierdzić, że wprowadzenie modyfikacji w pozycję C2, zarówno jednego atomu fluoru jak i większej objętościowo grupy trifluorometylowej, nie spowodowało braku oddziaływania tych analogów z enzymem. W przypadku wprowadzenia większego

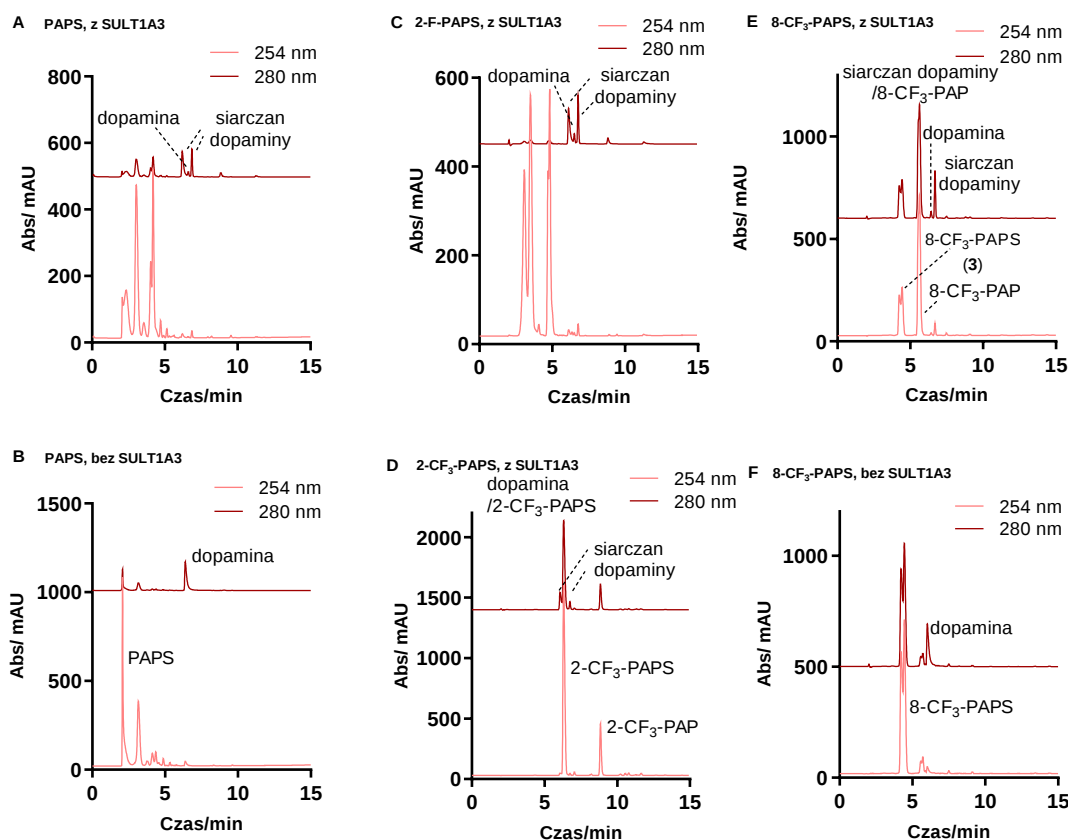
podstawnika trifluorometylowego, modyfikacja spowolniła kinetykę reakcji, co może wynikać z braku oddziaływania do kieszeni wiążącej białka lub właściwości inhibitorowych tego analogu. Możliwa jest również hipoteza, że wprowadzona modyfikacja w pozycję C8 stanowi zawadę steryczną i uniemożliwia wiązanie się desulfosinigriny w odpowiedniej dla przebiegu reakcji konformacji.



Rys. 44. Analiza reakcji sulfatacji desulfosinigriny katalizowanych przez AtSOT18 za pomocą RP HPLC. Reakcje przeprowadzono w obecności: **A.** PAPS; **C.** 2-F-PAPS; **D.** 2-CF₃ -PAPS; **E.** 8-CF₃ -PAPS; **B** i **F.** próbki kontrolne bez AtSOT18 dla PAPS i 8-CF₃-PAPS pokazano w celu ułatwienia interpretacji wyników.

Analogiczne eksperymenty wykonałam dla SULT1A3. Dodatkową trudność w analizie tych reakcji sprawiał fakt, że pasmo absorpcji nukleotydów pokrywa się z pasmem absorpcji dopaminy a tym samym analiza sygnałów była nieznacznie utrudniona. Tak jak w przypadku AtSOT18, 2-F-PAPS wykazuje aktywność zbliżoną do naturalnego kofaktora. Na chromatogramie uzyskanym w wyniku analizy reakcji z 2-CF₃-PAPS dla długości fali 280 nm zaobserwować można dwa sygnały przypisane do siarczanu dopaminy (siarczan dopaminy powstaje w reakcji w postaci dwóch izomerów : 3-O-, powstający w znacznej przewadze, oraz 4-O-¹¹⁰) oraz brak widocznego sygnału pochodzącego od dopaminy (sygnał ten nakłada się z sygnałem 2-CF₃-PAPS). Nakładanie

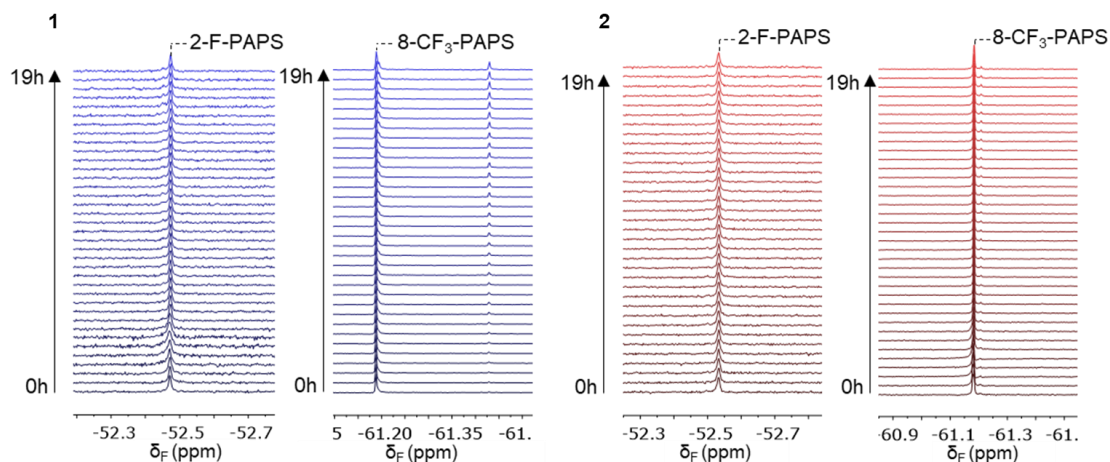
sygnałów można zaobserwować również analizując chromatogram z reakcji z 8-CF₃-PAPS (siarczan dopaminy/ 8-CF₃-PAP), widoczne jest jednak, że reakcja przebiega (**Rys. 45**). Analiza wyników RP HPLC wykazuje, że SULT1A3 rozpoznaje wszystkie trzy fluorowane analogi PAPS, trudno jednak określić różnice pomiędzy kinetyką tych procesów.



Rys. 45. Analiza reakcji sulfatacji dopaminy katalizowanych przez SULT1A3 za pomocą RP HPLC. Reakcje przeprowadzono w obecności: **A.** PAPS; **C.** 2-F-PAPS; **D.** 2-CF₃-PAPS; **E.** 8-CF₃-PAPS; **B** i **F.** próbki kontrolne bez SULT1A3 dla PAPS i 8-CF₃-PAPS pokazano w celu ułatwienia interpretacji wyników.

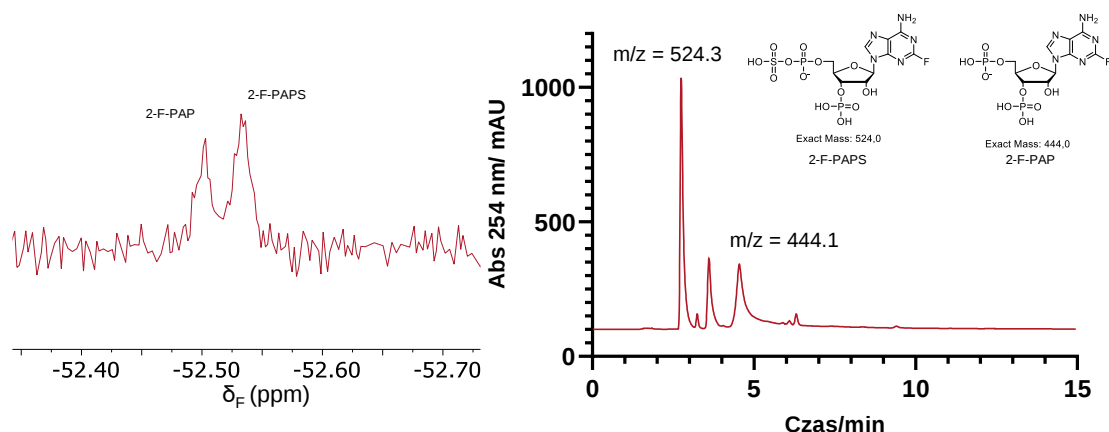
Następnie przeprowadziłam pomiary metodą ¹⁹F NMR w czasie rzeczywistym dla analogicznych reakcji z enzymami AtSOT18 oraz SULT1A3. Dla każdego z trzech fluorowanych analogów przygotowałam mieszaninę reakcyjną, zawierającą 200 μM analogu kofaktora, 100 μM desulfosinigriny, 83 mM TRIS-HCl, pH 9, 9,2 mM MgCl₂, 10% D₂O, dla AtSOT18 lub 200 μM analogu kofaktora, 100 μM dopaminy, 6,7 mM bufor K₂HPO₄, pH 7,4, 10% D₂O, dla SULT1A3. W pierwszej kolejności rejestrowałam widmo reakcji bez dodatku enzymu (czas 0) a następnie dodawałam 100 nM białka i w rejestrowałam widma ¹⁹F NMR w odstępach czasowych wynoszących 5 min. Stabilność analogów PAPS w warunkach eksperymentu (analogiczne do czasu 0 reakcji)

potwierdziłam rejestrując widma ^{19}F NMR badanej próbki co 30 min przez 18 h (**Rys. 46**).



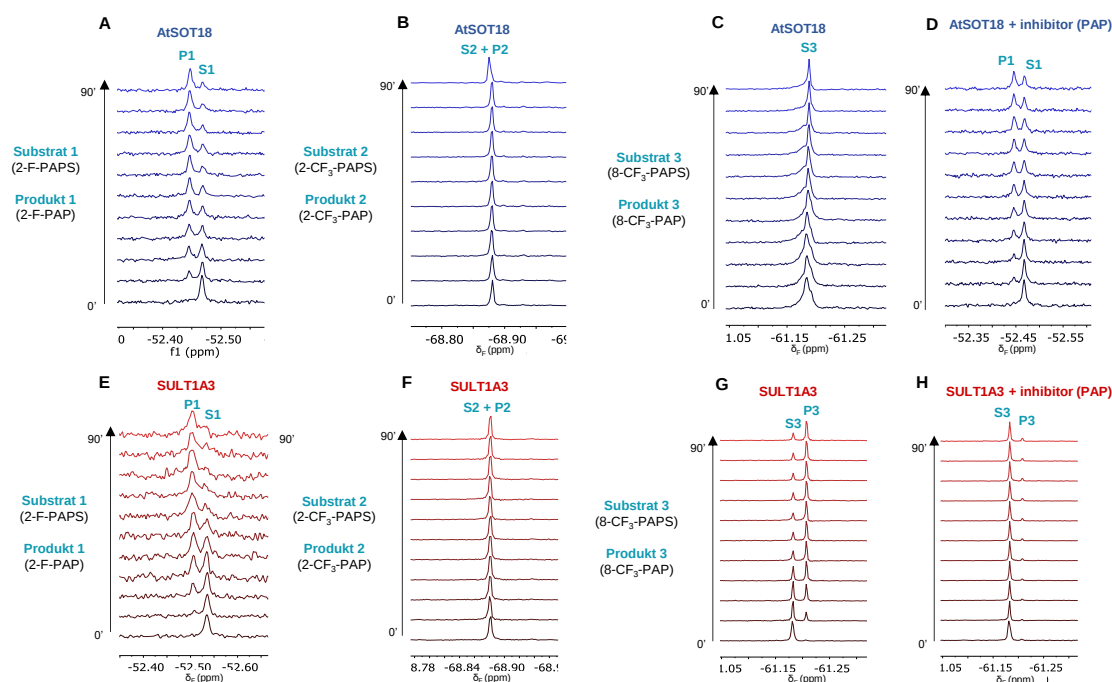
Rys. 46. Monitorowanie stabilności analogów 2-F-PAPS i 8-CF₃-PAPS z 1. AtSOT18 i 2. SULT1A3, w warunkach eksperymentu metodą ^{19}F NMR. Warunki dla AtSOT18: 200 μM analogu PAPS, 100 μM desulfosinigriny, 100 nM enzymu, 83 mM bufor TRIS, pH 9,0, 9,2 mM MgCl₂, 10% D₂O, 37 °C; dla SULT1A3 200 μM analogu PAPS, 100 μM dopaminy, 100 nM enzymu, 6,7 mM K₂ HPO₄, pH 6,5 (dla 2-F-PAPS) lub 7,4 (dla 8-CF₃-PAPS), 10% D₂O w 37 °C. Produkt rozkładu 8-CF₃-PAPS w pH 9,0 (δ_{F} -61,43) zidentyfikowano jako 8-CF₃-adeninę.

Widmo ^{19}F NMR zarejestrowane dla reakcji z analogiem 2-F-PAPS składało się z singletu o przesunięciu chemicznym 52,5 ppm, odpowiadającemu 2-F-PAPS. Sygnał ten stopniowo malał w obecności enzymu, podczas gdy pojawiał się nowy, przesunięty o 0,02 ppm (**Rys. 46**). Intensywność zaobserwowanego singletu wzrastała wolniej w obecności PAP, naturalnego inhibitora sulfotransferaz, natomiast nie był on w ogóle obserwowany na widmie kontrolnym (bez enzymu), co sugeruje, że odpowiada on 2--F--PAP, produktowi reakcji enzymatycznej (**Rys. 48.D**). Dla potwierdzenia interpretacji obserwowanych wyników reakcję enzymatyczną analizowałam metodą RP HPLC, a tożsamość składników mieszaniny reakcyjnej potwierdziłam metodą ESI-MS (**Rys. 47**).



Rys. 47. A. Widmo ^{19}F NMR reakcji katalizowanej przez SULT1A3 w obecności 2F-PAPS; B. Analiza RP HPLC mieszaniny reakcyjnej odzyskanej po pomiarach ^{19}F NMR. Przypisanie sygnałów widocznych na chromatogramie zostało potwierdzone metodą ESI-MS.

Obecność dwóch sygnałów na widmie ^{19}F NMR zaobserwowałam dla obu enzymów modelowych, co było zgodne z wynikami otrzymanymi metodą RP HPLC, czyli że 2-F-PAPS jest analogiem PAPS, rozpoznawanym przez ST (Rys. 46. A; Rys. 46. E).



Rys. 48. Zastosowanie fluorowanych analogów PAPS jako uniwersalnych substratów do śledzenia aktywności sulfotransferaz metodą ^{19}F NMR. A. 2-F-PAPS z AtSOT18; B. 2- CF_3 -PAPS z AtSOT18; C. 8- CF_3 -PAPS z AtSOT18; D. 2-F-PAPS + PAP z AtSOT18; E. 2-F-PAPS z SULT1A3; F. 2- CF_3 -PAPS z SULT1A3; G. 8- CF_3 -PAPS z SULT1A3; H. 2-F-PAPS + PAP z SULT1A3. Warunki reakcji AtSOT18: 200 μM analogu PAPS, 200 μM desulfosinigriny, 100 nM enzymu w 83 mM TRIS, pH 9,0, zawierającym 9,2 mM MgCl_2 i 10% D_2O w 37 $^\circ\text{C}$; Warunki reakcji SULT1A3 - 200 μM analogu PAPS, 200 μM dopaminy, 100 nM enzymu w 6,7 mM K_2HPO_4 , pH 7,4, zawierającym 10% D_2O w 37 $^\circ\text{C}$.

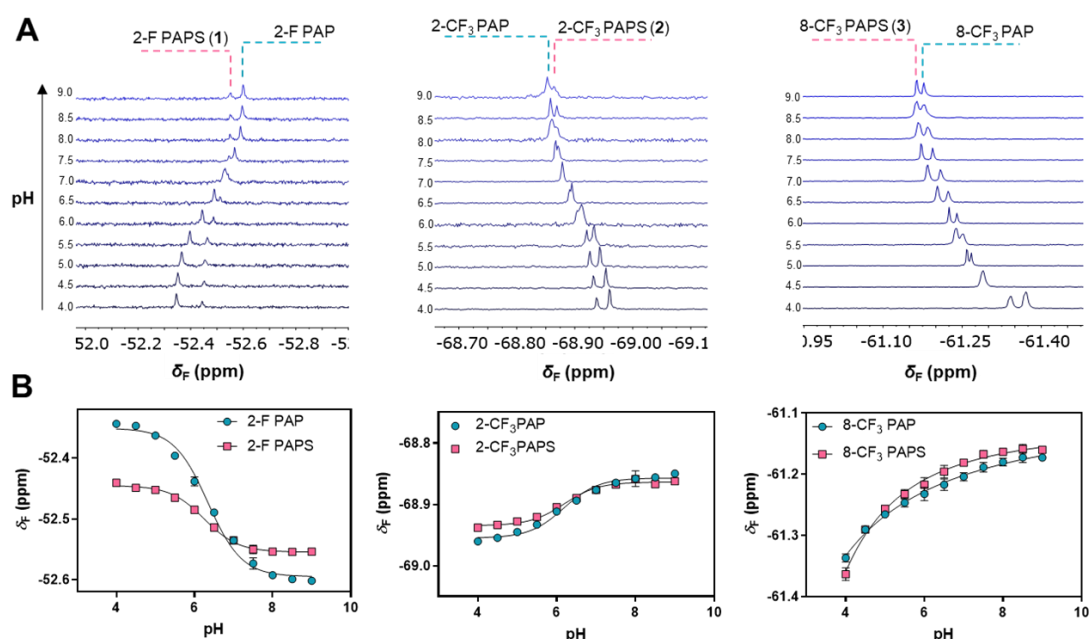
W przeciwieństwie do 2-F-PAPS, widmo ^{19}F NMR 2- CF_3 -PAPS w reakcji z AtSOT18 lub SULT1A3 nie zmieniało się w czasie, co mogło wskazywać, że 2- CF_3 -PAPS nie jest akceptowany jako kosubstrat przez enzym (co zaprzeczałoby wynikom otrzymanym metodą HPLC) lub że sygnały 2- CF_3 -PAPS i 2- CF_3 -PAP nakładają się w warunkach eksperymentu (co jest bardziej prawdopodobne). Widma ^{19}F NMR zostały przedstawione na **Rys. 48.B i F**.

8- CF_3 -PAPS był rozpoznawany w różny sposób przez wyżej wymienione dwa enzymy. W przypadku AtSOT18 nie zaobserwowano powstawania produktu, 8- CF_3 -PAP, natomiast w reakcji z SULT1A3 widoczne są dwa sygnały o intensywności zmieniającej się w czasie co potwierdza, że 8- CF_3 -PAPS jest dobrym substratem dla SULT1A3 ale nie dla AtSOT18 (**Rys. 48.C i G**). Jest to zgodne z wynikami otrzymanymi metodą RP HPLC.

Powyższe badania wykazały, że wszystkie trzy związki są potencjalnymi narzędziami molekularnymi do badań nad sulfotransferazami jednakże każdy z nich posiada pewne ograniczenia. 2-F-PAPS służy jako substrat dla każdego enzymu, a sygnał fluorowanego substratu jest w każdym przypadku dobrze oddzielony od sygnału produktu (2-F-PAP). Jednakże, struktura zawiera tylko jeden atom fluoru co powoduje, że widma uzyskane przy użyciu 2-F-PAPS są niższej jakości (stosunek sygnału do szumu) niż widma uzyskane przy użyciu 2- CF_3 -PAPS lub 8- CF_3 -PAPS w tym samym stężeniu. 2- CF_3 -PAPS jest substratem dla obu enzymów i daje widma dobrej jakości co pozwala przypuszczać, że jest kandydatem na uniwersalny kofaktor sulfotransferaz. Niestety, sygnały ^{19}F dla 2- CF_3 -PAPS i 2- CF_3 -PAP nakładają się w badanych warunkach, stąd monitorowanie postępu reakcji za pomocą spektroskopii ^{19}F NMR jest w tych warunkach niemożliwe. Wreszcie, 8- CF_3 -PAPS zapewnia widma dobrej jakości, oraz dobry rozdział sygnałów, ale związek ten jest akceptowany jako substrat jedynie przez SULT1A3. Fakt ten oznacza, że może on mieć ograniczone zastosowanie w porównaniu z pozostałymi dwoma związkami.

Jako, że najbardziej obiecującym analogiem kofaktora, z trzech zaprojektowanych przeze mnie związków, okazał się być 2- CF_3 -PAPS postanowiłam sprawdzić czy istnieją warunki, w których rozdział sygnałów 2- CF_3 -PAPS i 2- CF_3 -PAP na widmie ^{19}F NMR będzie możliwy. Za brak rozdziału, czyli przesunięcie chemiczne, sygnałów może odpowiadać stan uprotonowania wspomnianych cząsteczek. W pH bliskim 7 PAPS posiada jedną grupę jonizowalną (3'-fosforan), natomiast PAP dwie (3'-fosforan i 5'-fosforan), z tego względu wartość pH może mieć znaczący wpływ na wartości przesunięć chemicznych, które obserwujemy na widmach NMR. W związku z tym

zaprojektowałam eksperyment, który pozwolił zbadać zależność przesunięcia chemicznego od pH roztworu. Wodne roztwory analogów PAPS poddałam hydrolizie w środowisku kwaśnym, aby uzyskać mieszaninę PAPS i PAP a następnie, po rozcieńczeniu odpowiednim buforem, doprowadziłam pH każdej mieszaniny do 4. Tak przygotowane roztwory stopniowo miareczkowałam wodnym roztworem NaOH do pH 9 (w krokach co $\sim 0,5$ jednostki pH). Dla każdej wartości pH zarejestrowałam widmo ^{19}F NMR. Wartości δ_F analogów PAPS i odpowiadających im pochodnych PAP przedstawiłam w funkcji pH. Każda para związków wykazywała unikalne zmiany δ_F zależne od pH, przy czym para 2-F-PAPS/2-F-PAP była najbardziej wrażliwa na zmiany pH (Rys. 49).

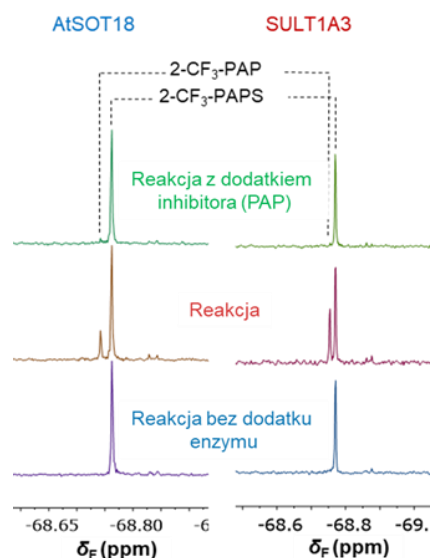


Rys. 49. Zależność zmiany δ_F od pH dla fluorowanych analogów PAPS i odpowiednich analogów PAP. **A)** Widma ^{19}F NMR z eksperymentów miareczkowania mieszanin analogów PAPS/PAP. **B)** Krzywe miareczkowania uzyskane z podwójnych eksperymentów. Punkty danych to średnie $\pm$ odchylenia standardowe. Linie ciągłe to krzywe teoretyczne dopasowane do punktów.¹¹¹

Sygnały dla pary 2-F-PAPS/2-F-PAP dobrze rozdzielały się przy wartościach pH w zakresie 4,0-6,0 ($\Delta\delta_F$ ppm: 0,05-0,1) oraz między 8,0 a 9,0 ($\Delta\delta_F$ 0,05 ppm), natomiast słabszy rozdział obserwowałam w zakresie pH 6,5-7,5. Związki 2-CF₃-PAPS/2-CF₃-PAP były najmniej wrażliwe na zmianę pH i charakteryzowały się najslabszym rozdzieleniem sygnałów. Niemniej jednak, wystarczającą separację sygnałów uzyskano w pH 4,0-5,5 ($\Delta\delta_F$ 0,01-0,02 ppm), natomiast nieco gorszą separację zaobserwowano przy pH 8,5-9,0 ($\Delta\delta_F$ ppm: 0,01). Z kolei sygnały związane 8-CF₃-PAPS/8-CF₃-PAP rozdzielały się podobnie dobrze w szerokim zakresie pH (6,0-9,0; $\Delta\delta_F$ ppm: 0,01-0,03). Biorąc pod

uwagę rolę jaką mają spełniać fluorowane analogi PAPS oraz wiedząc, że większość sulfotransferaz wykazuje aktywność w warunkach obojętnych lub lekko zasadowych, a wiązania fosfosiarczanowe w PAPS są podatne na hydrolizę kwasową, wnioskuję, że 2--F-PAPS jest jedynym, uniwersalnym narzędziem dla badanych ST. Jego odpowiednik 8-CF₃-PAPS również może posłużyć do badania aktywności ST w czasie rzeczywistym ale tylko dla wybranych enzymów. Powyższy eksperyment wyjaśnił przyczynę braku separacji sygnału dla reakcji enzymatycznych prowadzonych w obecności 2-CF₃-PAPS w pH 7,4 (reakcja z SULT1A3). Tym, co jednak zwróciło moją uwagę w trakcie analizy wyników była dobra separacja sygnałów 2-CF₃-PAPS w pH 9,0 podczas gdy w trakcie właściwego eksperymentu, z dodatkiem białka AtSOT18, tej separacji nie obserwowałam. Przyczyna tego może być poszerzenie sygnału pod wpływem obecności białka, które utrudnia rozdzielenie sygnałów.

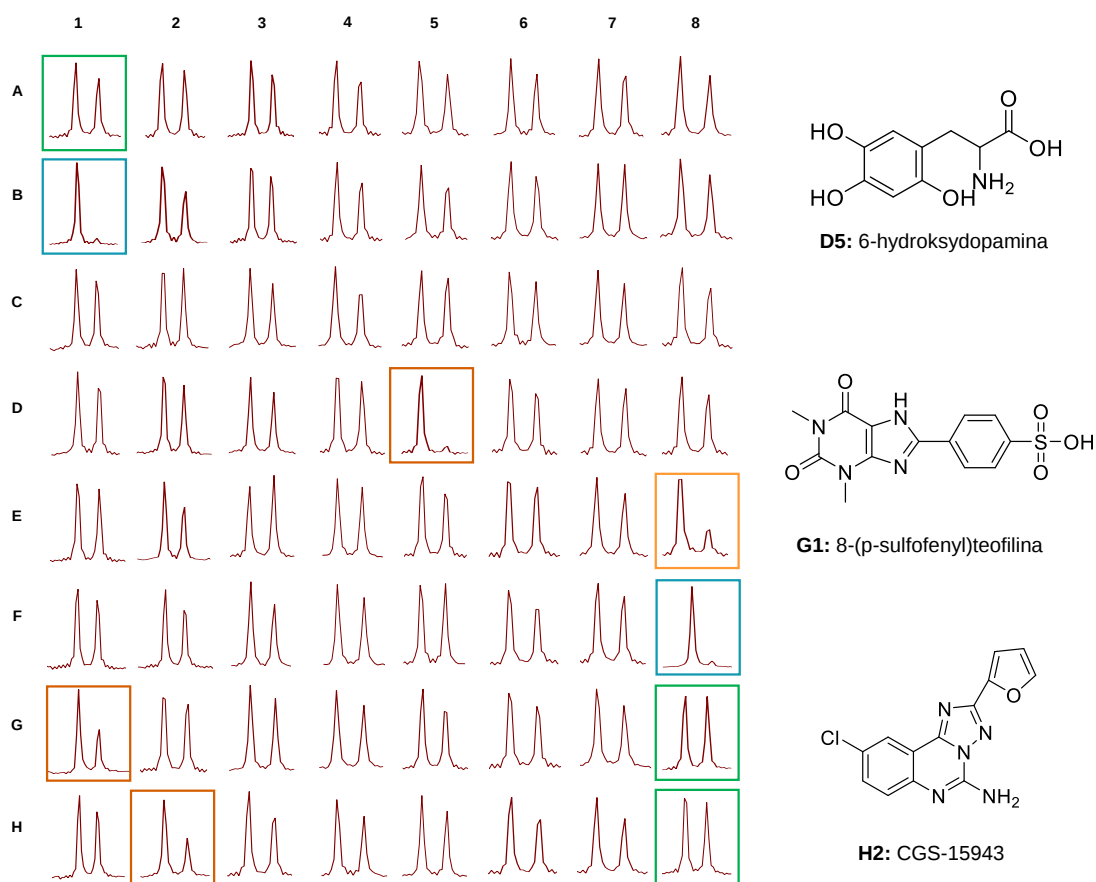
Badania zależności przesunięcia chemicznego od pH pokazały, że tylko dwa związki mogą zostać użyte do badania aktywności ST w czasie rzeczywistym. Jednakże, dla każdego analogu PAPS można znaleźć zakres pH, w którym dany związek będzie użytecznym narzędziem. W celu potwierdzenia tej tezy zaprojektowałam eksperyment polegający na analizie reakcji enzymatycznej z udziałem 2-CF₃-PAPS w punkcie końcowym. Reakcja zatrzymywana była dodatkiem acetonitrylu do stężenia 50% (co ustalono jako optymalny sposób na drodze optymalizacji, której nie będę tu szczegółowo omawiać). Na **Rys. 50** przedstawiłam wynik eksperymentu z białkiem AtSOT18 oraz SULT1A3, z których wynika, że analog 2-CF₃-PAPS jest rozpoznawany przez oba enzymy (dwa sygnały na widmie ¹⁹F NMR). Zostało to potwierdzone wynikiem reakcji kontrolnej (bez dodatku enzymu), gdzie zarejestrowane widma przedstawiają tylko jeden sygnał od 2-CF₃-PAPS. Okazało się, że dodatek ACN do mieszaniny reakcyjnej powodował denaturację białka i w konsekwencji poprawiał również kształt sygnałów na widmie NMR i ich separację.



Rys. 50. Widma ^{19}F NMR reakcji katalizowanych przez ST uzyskane w zoptymalizowanych warunkach w punkcie czasowym 40 min z 2- CF_3 -PAPS.

Dzięki temu, mimo że związek 2- CF_3 -PAPS ma ograniczone zastosowanie do monitorowania aktywności ST w czasie rzeczywistym, może być nadal przydatny w różnych eksperymentach, takich jak analizy punktów końcowych i testy przesiewowe oparte na aktywności.

Aby wykazać użyteczność fluorowanych analogów oraz opracowanej metody ^{19}F NMR wykonałam test przesiewowy aktywności SULT1A3. Celem eksperymentu było zbadanie potencjalnych właściwości inhibitorowych wybranych związków z biblioteki LOPAC®1280 (związki wyselekcjonowałam na podstawie strukturalnego podobieństwa do adenozyiny lub dopaminy). Reakcję prowadziłam na płytce 96-dołkowej w obecności 8- CF_3 -PAPS oraz sulfotransferazy SULT1A3. Reakcje kontrolne stanowiły próbki bez inhibitora, bez enzymu oraz z dodatkiem naturalnego inhibitora ST (PAP). Wszystkie reakcje zostały zakończone po 40 min poprzez dodatek ACN (1:1 v/v) (czas, po którym reakcja bez dodatku inhibitora zachodzi w ok. 50%), przeniesione do probówek NMR, po czym zmierzono ich widma metodą ^{19}F NMR. Wśród 59 przebadanych związków zidentyfikowałam trzy potencjalne inhibitory SULT1A3: 6-hydroksydopamina, co jest potwierdzone literaturowo¹¹², 8-(p-sulfofenyl)teofilina oraz CGS-15943. Ostatni z tych związków nie był wcześniej badany w kontekście ST, ale został zidentyfikowany jako antagonist receptoru adenozynowego¹¹³ (**Rys. 51**).



Rys. 51. Wyniki eksperymentu przesiewowego wybranych związków z biblioteki LOPAC®1280. Zielonymi ramkami zostały oznaczone reakcje kontrolne bez inhibitora; niebieską ramką reakcje kontrolne bez enzymu, pomarańczową ramką reakcja z dodatkiem PAP jako inhibitora; czerwoną ramką oznaczono związki które wykazywały właściwości inhibitorowe. Ich struktury przedstawiono na rysunku.

Podsumowując tę część moich badań, fluorowane analogi PAPS, 2-F-PAPS, 2-CF₃ PAPS i 8-CF₃-PAPS zostały przebadane w reakcjach katalizowanych przez ST. Związki te zostały zsyntetyzowane z niezabezpieczonych nukleozydów w prosty sposób, który umożliwia również syntezę na dużą skalę. Właściwości substratowe związków zostały przebadane z dwoma modelowymi enzymami, AtSOT18 i SULT1A3. Badania te pokazały, że wszystkie trzy związki są obiecującymi narzędziami molekularnymi do badania sulfotransferaz. Dwa z nich, 2-F-PAPS i 2-CF₃-PAPS były substratami dla obu badanych ST, co oznacza, że mogą mieć szerokie zastosowanie w przypadku badań nad ST. Trzeci związek, 8-CF₃-PAPS był akceptowany jako substrat jedynie przez ludzką SULT1A3, co sugeruje, że może być użyteczny w bardziej ograniczonym zakresie (Tabela 4).

Efektywnie zweryfikowałam również możliwość monitorowania reakcji katalizowanych przez tę grupę enzymów za pomocą spektroskopii ¹⁹F NMR (zarówno

w czasie rzeczywistym jak i punkcie końcowym reakcji). Przeprowadzone badania wykazały, że fluorowane analogi PAPS są obiecującymi narzędziami molekularnymi do badania aktywności sulfotransferaz za pomocą spektroskopii ^{19}F NMR. Opracowana metoda wykorzystująca jądrowy rezonans magnetyczny jest również pierwszą uniwersalną metodą do określania aktywności enzymów z grupy ST, która nie opiera się na znakowaniu radioizotopowym. Metoda ta może z powodzeniem znaleźć zastosowanie w różnych dziedzinach badań związanych z ST, w tym w profilowaniu specyficzności substratowej ST, porównywaniu aktywności izoform ST, badaniu aktywności inhibitorów terapeutycznie istotnych sulfotransferaz lub badaniu aktywności ST w złożonych mieszaninach biologicznych (np. lizatach komórkowych lub homogenatach tkankowych).

Tabela 4. Podsumowanie i zalecane warunki eksperymentalne dla każdego z fluorowanych analogów PAPS w reakcjach z udziałem AtSOT18 oraz SULT1A3.

Związek	Zalecany typ testu i zakres pH ^[b]	AtSOT18				SULT1A3			
		Typ eksperymentu	Bufor	δ_F PAPS ^a (ppm)	δ_F PAP ^a (ppm)	Typ eksperymentu	Bufor	δ_F PAPS ^a (ppm)	δ_F PAP ^a (ppm)
(2-F-PAPS)	Czas rzeczywisty, Punkt końcowy, pH 7,5-9,0	W czasie rzeczywistym	83 mM Tris pH 9,0, 9,2 mM MgCl ₂ 10% D ₂ O	-52.47	-52.45	W czasie rzeczywistym	6,7 mM K ₂ HPO ₄ , pH 6,5	-52.53	-52.50
(2-CF ₃ -PAPS)	Punkt końcowy, 8,5-9,0	Punkt końcowy	Reakcja: 83 mM Tris, pH 8,5, 10% D ₂ O Odczyt: Mieszanina 1:1 (v/v) buforu reakcyjnego i ACN	-68.76	-68.74	Punkt końcowy	Reakcja: 6,7 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4 Odczyt: 1:1:1 mieszanina buforu reakcyjnego, ACN i 30 mM K ₂ HPO ₄ , pH 9,5, 10% D ₂ O (końcowe pH 8,5)	-68.77	-68.75
(8-CF ₃ -PAPS)	Czas rzeczywisty, Punkt końcowy, pH 6,5-9,0	W czasie rzeczywistym	-	-61.01	-	W czasie rzeczywistym	6,7 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4, 10% D ₂ O	-61.18	-61.20

^aanalog PAPS lub PAP

5.5. EWALUACJA ANALOGÓW PAP I PAPS METODĄ TERMOFOREZY MIKROSKALOWEJ

W poprzednich rozdziałach starałam się przedstawić zarówno kluczowe znaczenie sulfotransferaz i ich rolę w komórce jak również deficyt narzędzi, które pomogłyby w prowadzeniu badań nad tymi enzymami. Powyżej opisałam metodę ^{19}F NMR, która stanowi nowe, cenne narzędzie do badania m.in. aktywności ST. Jednakże wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej tą metodą jest nie tyle niemożliwe co trudne i czasochłonne. Co więcej, dotychczas nie została opracowana metoda, która pozwalałaby w dokładny i szybki sposób badać kinetykę reakcji z udziałem sulfotransferaz lub określać powinowactwo małych cząsteczkowych ligandów sulfotransferaz. W swoich badaniach doktorskich postanowiłam podjąć próbę rozwiązania tego problemu w pierwszej kolejności syntezując obszerną grupę ligandów, analogów PAP i PAPS, a następnie opracowując metodę wyznaczania stałej dysocjacji kompleksu białko–ligand przy użyciu techniki termoforezy mikroskalowej. Wyniki tych badań przedstawiam w poniższym rozdziale.

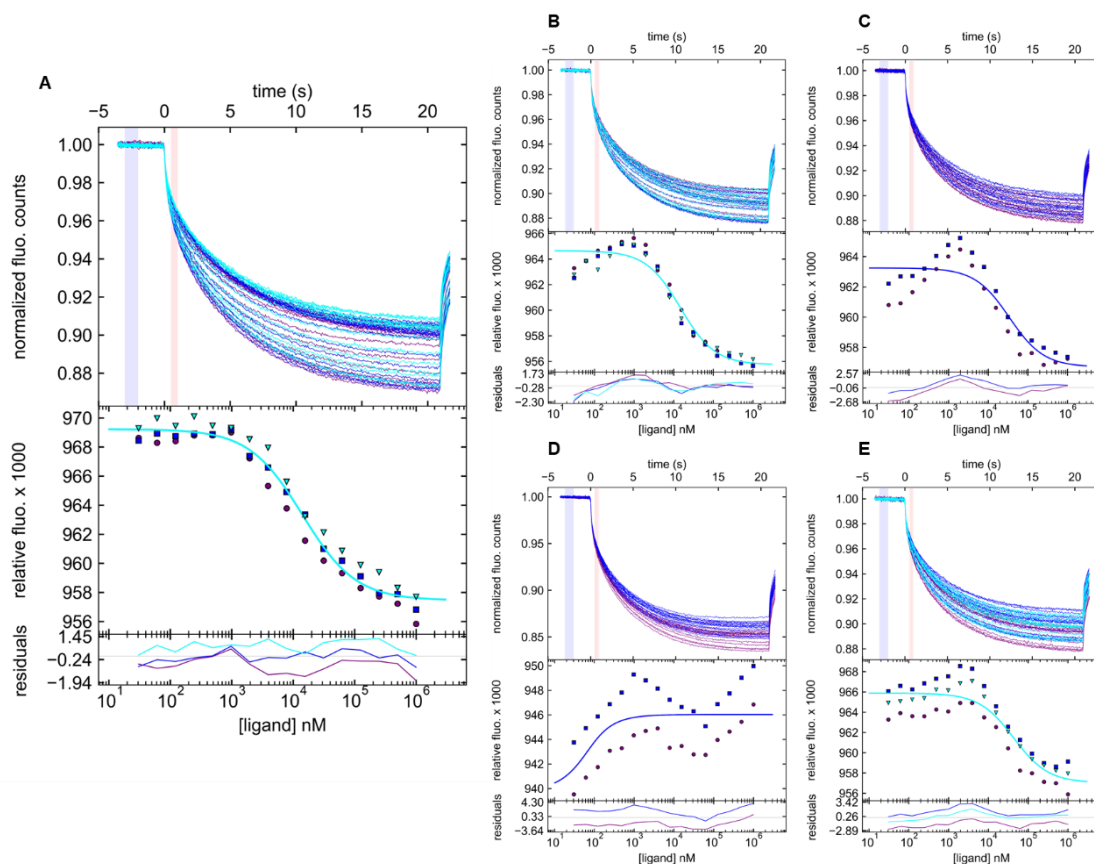
5.4.3. BADANIA BIOFIZYCZNE Z WYKORZYSTANIEM METODY TERMOFOREZY MIKROSKALOWEJ

Jak wspomniano w części literaturowej dotyczącej metodyki (rozdział 4.2.2.), MST to stosunkowo niedawno opracowana metoda biofizyczna, pozwalająca wyznaczyć stałą dysocjacji białko–ligand na podstawie zmiany migracji cząsteczek wyznakowanych fluorescencyjnie w gradiencie temperaturowym. Postanowiłam zweryfikować, czy metoda MST umożliwia badanie ligandów dla sulfotransferaz, co wymagało opracowania odpowiednich reagentów i optymalizacji warunków pomiarowych. Ponieważ modelową sulfotransferazę roślinną AtSOT18 cechuje wysoka stabilność, opracowanie metody MST rozpoczęłam właśnie od tego enzymu. Ważnym elementem w kontekście planowania eksperymentu MST jest wybór cząsteczki znakowanej. Do wyznaczenia K_D jedna z badanych molekuł musi występować w stałym stężeniu i być wyznakowana fluorescencyjnie. W przypadku znakowania liganda, konieczne jest wprowadzenie odpowiednich grup, które umożliwią reakcję typu klik (np. *ang. Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) lub bezpośrednie wprowadzenie chromoforu do struktury. Podejście to niesie ze sobą ryzyko zaburzenia oddziaływać białko–ligand (duży objętościowo znacznik ze względów sterycznych może utrudniać wiązanie do miejsca

aktywnego enzymu), a także uniemożliwić badanie wpływu małych modyfikacji w strukturze liganda na jego powinowactwo do białka. Dodatkowo część otrzymanych przeze mnie analogów PAP i PAPS nie posiadała w swojej strukturze grup funkcyjnych umożliwiających znakowanie a jedynie subtelne zmiany, które niosły ze sobą niezwykle ważne informacje. Z tego względu w opracowanej przeze mnie metodzie cząsteczką znakowaną fluorescencyjnie była badana sulfotransferaza. Znakowanie białka, które polega na silnym koordynacyjnym wiązaniu znacznika do ogona sześciu histydyn w obecności jonów Ni^{2+} , przeprowadziłam zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta (Nanotemper). Znacznik RED-tris-NTA Dye (nr kat. MO-L008) rozpuściłam w buforze 1-PBS-T (0,05%) a następnie przygotowałam 100 μl roztworu o stężeniu 100 nM. Analogicznie przygotowałam 100 μl AtSOT18 o stężeniu 200 nM. Roztwory zmieszałam ze sobą i pozostawiłam w temperaturze pokojowej przez 30 min a następnie zwirowałam. Tak wyznakowane białko jest gotowe do przeprowadzenia eksperymentów. Stabilność białka potwierdzałam każdorazowo metodą DSF tuż przed znakowaniem. Ocena stabilności białka po znakowaniu była niemożliwa ze względu na niskie stężenie białka (poniżej limitu detekcji metody).

Kolejnym krokiem była optymalizacja warunków eksperymentu. Wstępne eksperymenty przeprowadziłam w buforze PBS-T (który jest często rekomendowany do tego typu eksperymentów), bez dodatku soli z niemodyfikowanym PAP, będącym znanym inhibitorem ST. Krzywa będąca wynikiem tego eksperymentu miała dwa punkty przegięcia co może sugerować obecność dwóch miejsc aktywnych, dimeryzację białka w danym pH lub inne niespecyficzne oddziaływania. Sulfotransferazy występują w formie homodimerów co oznacza, że składają się z dwóch identycznych podjednostek. Każda z nich posiada miejsce wiązania substratu i kofaktora, dlatego też odpowiednim modelem do analizy interakcji jest model 1:1, gdzie jedna cząsteczka ligandu oddziałuje z jedną podjednostką enzymu, a wiązanie jest niezależne i jednakowe dla wszystkich miejsc wiązania^{114, 115}. Krzywa wiązania wzrasta wykładniczo do momentu osiągnięcia stanu równowagi (plateau). Obserwowane przegięcie krzywej jest więc sygnałem, że w danych warunkach dostępne jest również drugie miejsce wiązania. Z tego względu podjęłam próbę znalezienia takich warunków eksperymentu w których enzym będzie wiązał tylko jedną cząsteczkę liganda. Przeprowadziłam eksperymenty w kilku innych buforach, przy różnych wartościach pH i siły jonowej. Na tym etapie warto zwrócić uwagę, że znakowanie białka prowadzone jest w buforze PBS-T (pH 7,4), bufor ten stanowi więc 50% próbki użytej do pomiarów. Dlatego też w przypadku eksperymentów

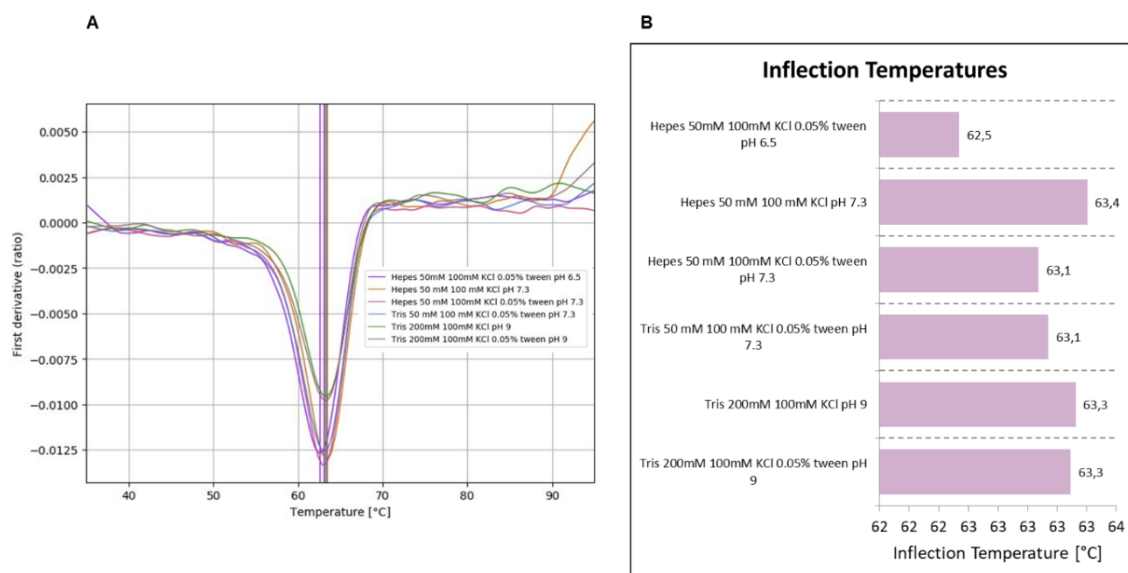
prorowadzonych w pH innym niż 7,4 konieczna była wymiana buforu po znakowaniu białka w celu uzyskania zamierzonych warunków eksperymentu (**Rys. 52**).



Rys. 52. Optimalizacja warunków MST dla białka AtSOT18 w różnych pH. **A.** bufor 50 mM HEPES, pH 6,5, 100 mM KCl, 0,05% Tween-20, warunki wybrane do dalszych eksperymentów; **B.** 50 mM HEPES, pH 7,5, 100mM KCl, 0,05% Tween-20; **C.** 50 mM HEPES, pH 8,0, 100mM KCl, 0,05% Tween-20; **D.** 50 mM HEPES, pH 8,5, 100mM KCl, 0,05% Tween-20; **E.** 50 mM HEPES, pH 9,0, 100 mM KCl, 0,05% Tween-20.

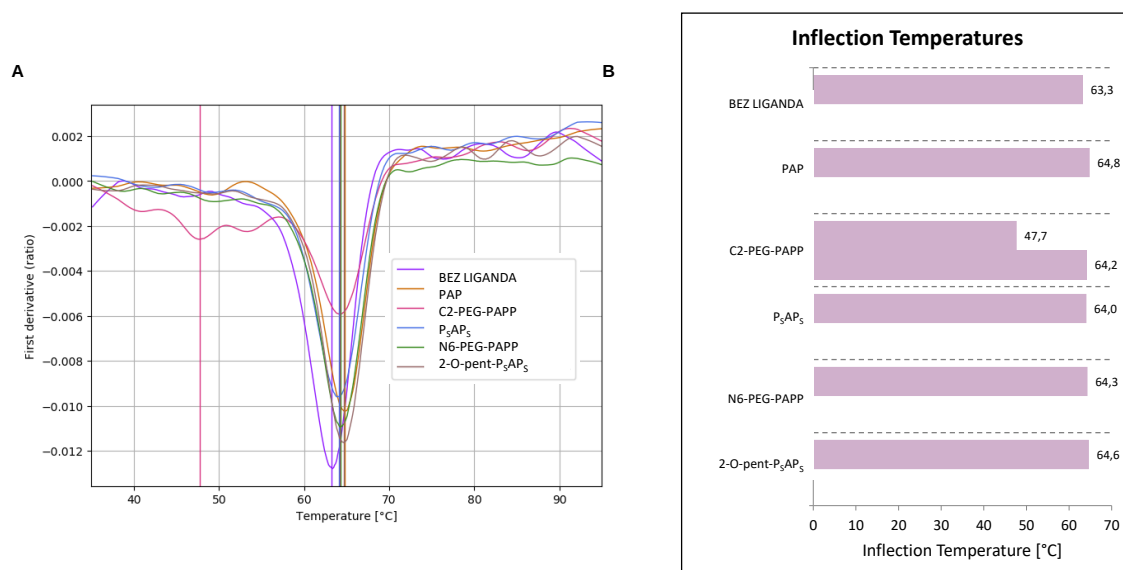
Najwyższą stabilność białko AtSOT18 wykazywało w buforze 50 mM HEPES, pH 6,5, 100 mM KCl, 0,05% Tween-20 co potwierdziłam wyznaczając tzw. temperaturę przejścia (*inflection temperature*, T_i) białka za pomocą skaningowej fluorymetrii różnicowej (DSF). Metoda ta wykorzystuje właściwości spektroskopowe tryptofanów obecnych w białku, które w zależności od otoczenia mają różne maksimum emisji tj. w otoczeniu hydrofobowym, charakterystycznym dla białka zwiniętego, maksimum emisji tryptofanu wynosi 330 nm, natomiast w otoczeniu hydrofilowym (białko zdenaturowane) wynosi 350 nm. W stanie równowagi termodynamicznej białko znajduje się w równowadze między formą rozwiniętą oraz zwiniętą. Parametr, który pozwala określić tą równowagę jest nazwany temperaturą topnienia (lub mięknięcia) i jest to temperatura, w której w stanie równowagi białko w 50% jest w formie natywnej oraz

w 50% w formie zdenaturowanej. Zastosowana przeze mnie metoda DSF pozwala na wyznaczenie temperatury przejścia, która jest niemal tożsama z temperaturą topnienia, jednakże ze względu na to, że warunki pomiaru nie są równowagowe, czas potrzebny do wykonania analizy tą metodą jest nieporównywalnie krótszy. Na **Rys. 53** przedstawione są wybrane wyniki otrzymane metodą DSF.



Rys. 53. Zestawienie wyników stabilności białka AtSOT18 w wybranych buforach wyznaczona metodą DSF; **A.** Wykres zależności pierwszej pochodnej stosunku 350/330 nm od temperatury. **B.** Wykres słupkowy przedstawiający wartości T_i w wybranych buforach.

Co ciekawe, pomiary prowadzone tą metodą w obecności liganda (**Rys. 54**) wykazały, że wiązanie liganda stabilizuje białko.



Rys. 54. Zestawienie wyników stabilności białka AtSOT18 z wybranymi ligandami wyznaczona metodą DSF; **A.** Wykres zależności pierwszej pochodnej stosunku 350/330 nm od temperatury. **B.** Wykres słupkowy przedstawiający wartości T_i w wybranych buforach.

Następnie przeprowadziłam wstępne eksperymenty mające na celu ocenę powinowactwa AtSOT18 do ligandów modelowych, PAP i PAPS. W tym celu dla każdego związku wykonałam 3 niezależne pomiary, stosując serię 16 rozcieńczeń każdego z ligandów⁹². Wartość stałej K_D wyznaczona dla kompleksu z PAP wynosi $19 \pm 3 \mu\text{M}$, co jest porównywalne z wartością stałej inhibicji uzyskaną dla tego enzymu metodą miareczkowania dwuwymiarowego ($K_I = 3,0 \mu\text{M}$)³⁸. Co ciekawe, dodatek substratu, desulfosinigriny (warunki: 50 mM HEPES, pH 6,5, 100 mM KCl, 0,05% Tween-20, 10 mM desulfosinigriny, 1 mM PAP), spowodował ponad 30-krotne obniżenie K_D ($0,5 \pm 0,12 \mu\text{M}$; **Tabela 5**). Może to oznaczać, że po związaniu substratu, kieszeń wiążąca kofaktor zmienia konformację i staje się bardziej dostępna. W przypadku PAPS wyznaczyłam wartość K_D w warunkach bez dodatku substratu i wynosiła ona $13 \pm 2 \mu\text{M}$ (dane literaturowe: $4,2 \pm 2,6 \mu\text{M}$)³⁸. Pomiary z dodatkiem substratu skutkowałyby zajściem reakcji enzymatycznej więc w tym wypadku były niemożliwe.

Tabela 5. Wyznaczone wartości K_D dla kompleksów wybranych ligandów z białkiem AtSOT18 oraz dodatkiem desulfosinigriny (10 mM)

Ligand	$K_D [\mu\text{M}]$	N
PAP	$0,5 \pm 0,12$	4
PAPP	$2,4 \pm 0,9$	3
PAPPF	23 ± 8	3
PAPPCCH	110 ± 6	1
N6-PEG-PPAP	24 ± 9	1
2'-O-pen-P _S AP _S	29 ± 13	2
C8-AE-PAPP	50 ± 40	1

Ponieważ otrzymane wyniki są zbliżone do wartości stałych raportowanych w literaturze (dla AtSOT18 $K_D \text{ PAPS} = 4,2 \mu\text{M}$ $K_I \text{ PAP} = 3,0 \mu\text{M}$ wyznaczone metodą miareczkowania dwuwymiarowego³⁸; porównywalnie dla hSULT1C4 $K_D \text{ PAPS} = 4,8 \mu\text{M}$, $K_D \text{ PAP} = 2,8 \mu\text{M}$ wyznaczone metodą wewnętrznej fluorescencji¹¹⁶) uznałam, że metoda może zostać użyta do wyznaczenia stałej dysocjacji z pozostałymi, nowymi analogami PAP i PAPS. Dodatkowo PAP wykorzystałam jako związek kontrolny do weryfikacji powtarzalności metody MST w zoptymalizowanych przeze mnie warunkach (kontrolny pomiar z PAP był wykonywany każdorazowo przed serią nowych pomiarów). W **Tabela**

6 przedstawiłam wartości K_D wyznaczone dla wszystkich ligandów z AtSOT18, które szczegółowo omawiam poniżej.

Tabela 6. Wyznaczone K_D dla ligandów z białkiem AtSOT18.

Lp	Ligand	K_D [μ M]	n	Lp	Ligand	K_D [μ M]	n
1	PAP	19 $\pm$ 3	3	16	N6-prop-PAPP	8,5 $\pm$ 1,5	2
2	PAPS	13 $\pm$ 2	3	17	N6-AE-PAPP	8,4 $\pm$ 1,6	2
3	AMP	1900 $\pm$ 1300	2	18	N6-PEG-PAPP	22 $\pm$ 9	4
4	ADP	1000 $\pm$ 500	3	19	N6-PEG-PAPS	93 $\pm$ 10	2
5	ATP	68 $\pm$ 13	3	20	C8-AE-PAPP	16 $\pm$ 2	3
6	cPAP	130 $\pm$ 90	1	21	C8-AE-PAPS	20 $\pm$ 6	2
7	PAPP	12 $\pm$ 2	3	22	C2-PEG-cPAPP	210 $\pm$ 40	2
8	cPAPP	120 $\pm$ 2	1	23	C2-PEG-PAP	170 $\pm$ 30	1
9	PCP*	3100	3	24	2-F-PAPS*	43	3
10	PGP*	6700	3	25	2-CF ₃ -PAPS*	390	3
11	PAPPP	7,8 $\pm$ 1,2	3	26	8-CF ₃ -PAPS*	130	3
12	PAPPF	46 $\pm$ 2	2	27	2'-F-PAP	17 $\pm$ 3	3
13	PAPCH ₂ P	280 $\pm$ 140	2	28	2'-O-pen-P _S AP _S	38 $\pm$ 10	3
14	PAPPCCH	90 $\pm$ 40	2	29	P _S AP _S	21 $\pm$ 8	2
15	PAPPprop	180 $\pm$ 60	2				

*pomiar wykonany przez studenta, Ryszarda Kobię

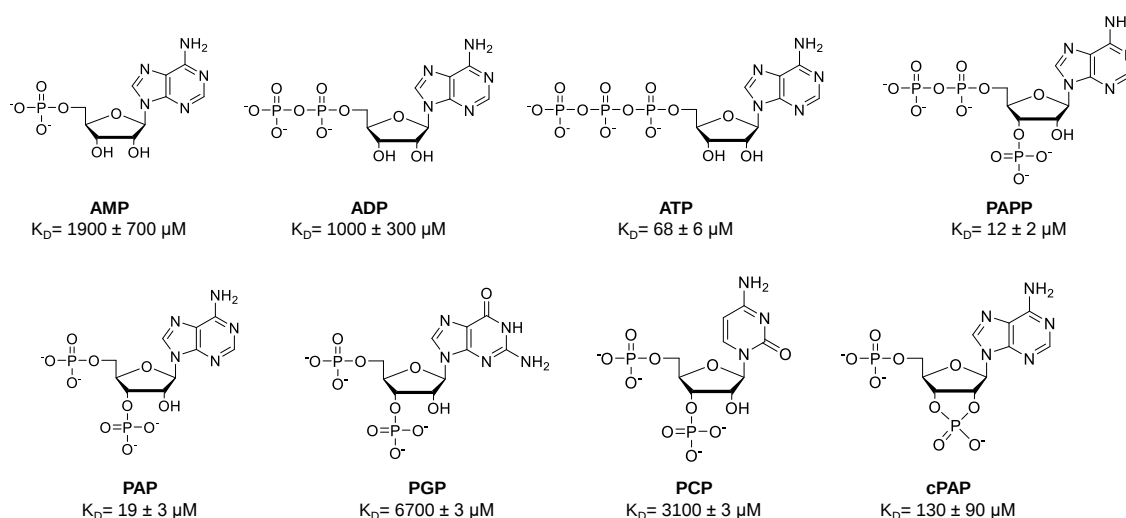
Pytaniem, na które chciałam odpowiedzieć poprzez badanie stabilności kompleksów z enzymami z grupy sulfotransferaz, było sprawdzenie jaki wkład do powinowactwa do sulfotransferaz mają poszczególne elementy struktury PAPS. Porównanie powinowactwa PAPS oraz PAP sugerowało, że sama grupa siarczanowa, ma niewielki wkład w stabilizację kompleksu.

Jednym ciekawych zagadnień, które chciałam wyjaśnić była rola grupy fosforanowej w pozycji 3'. Grupa ta nie bierze bezpośredniego udziału w reakcji enzymatycznej, nie ma więc bezpośredniego znaczenia dla funkcji biologicznej PAPS, jednak jest ona obecna dokładnie w tej pozycji w strukturze kofaktora u wszystkich organizmów

eukariotycznych. Wprowadzenie grupy fosforanowej w pozycję 3' wymaga dodatkowego wydatku energetycznego na szlaku biosyntezy w postaci cząsteczki ATP, jest więc ciekawe, jaka jest rola tego ugrupowania. Wcześniejsze badania kinetyczne, sugerowały, że obecność tej grupy może odgrywać ważną rolę w rozpoznaniu molekularnym przez ST, gdyż wartości K_M wyznaczone dla SULT1A1 i związków PAP, 5'-fosforanu 2'3'--cyklofosfoadenozyny (cPAP), 5',2'-difosforanu adenozy (2'-PAP) oraz AMP wynosiły odpowiednio 0,4 μM ; 2,3 μM ; 67 μM oraz 4300 μM ³⁹. Aby zmierzyć wpływ grupy 3'-fosforanowej na stabilizację kompleksu z modelową sulfotransferazą zaprojektowałam serię analogów PAPS i APS, które posiadały różną liczbę grup fosforanowych w pozycjach 5' i 3' (AMP, ADP, ATP, cPAP oraz PAPP) i porównałam ich powinowactwo z powinowactwem PAPS i PAP. Wyniki przedstawiłam na **Rys. 55** i **Tabela 6** pokazują, że AMP ma ponad 100- krotnie niższe powinowactwo do białka AtSOT18 niż PAP. Powinowactwo to zwiększało się nieznacznie wraz z obecnością dodatkowych fosforanów w pozycji 5' (ADP oraz ATP, powinowactwo większe odpowiednio ok. 2 - i 3,5 -razy). Co ciekawe, pochodna ADP z dodatkową grupą fosforanową w pozycji 3', PAPP, ma bardzo zbliżone powinowactwo do PAPS i PAP. Sugeruje to, że w miejscu wiązania grupy siarczanowej nie tworzą się kontakty stabilizujące kompleks z kofaktorem, a sulfotransferaza nie ma zdolności do „rozróżniania” na poziomie molekularnym reszty 5'-fosfosiarczanowej i 5'--difosforanowej. Biorąc pod uwagę, że w komórce występuje dość wysokie stężenie ADP (ok. 0.5 mM)¹¹⁷, który mógłby kompetycyjnie hamować aktywność komórkowych ST, wydaje się, że grupa fosforanowa w pozycji 3' jest niezbędna w strukturze kofaktora z grupą 5'-fosfosiarczanową, aby obniżyć jego K_D do poziomu, przy którym kompetycja z ADP nie będzie miała zbyt wielkiego wpływu na aktywność enzymatyczną. Uzyskane wyniki wskazują również, że potencjalnie możliwe jest zastąpienie reszty siarczanowej w strukturze PAPS innymi resztami, które mogłyby nadawać nowe właściwości funkcjonalne, co zainspirowało mnie do syntezy serii związków opisanej w dalszej części tego rozdziału. Różnica w powinowactwie pomiędzy ADP i PAPP pozwoliła mi na oszacowanie energii stabilizacji wnoszonej do kompleksu przez 3'-fosforan, która wyniosła 2,60 kcal/mol, co odpowiada energii pojedynczego wiązania wodorowego¹¹⁸.

Kolejnym ważnym analizowanym przeze mnie zagadnieniem była rola reszty adeninowej i specyficzność sulfotransferaz względem adeniny. Niektóre kofaktory adeninowe, np. NAD bywają aktywne w pewnych układach biologicznych również po

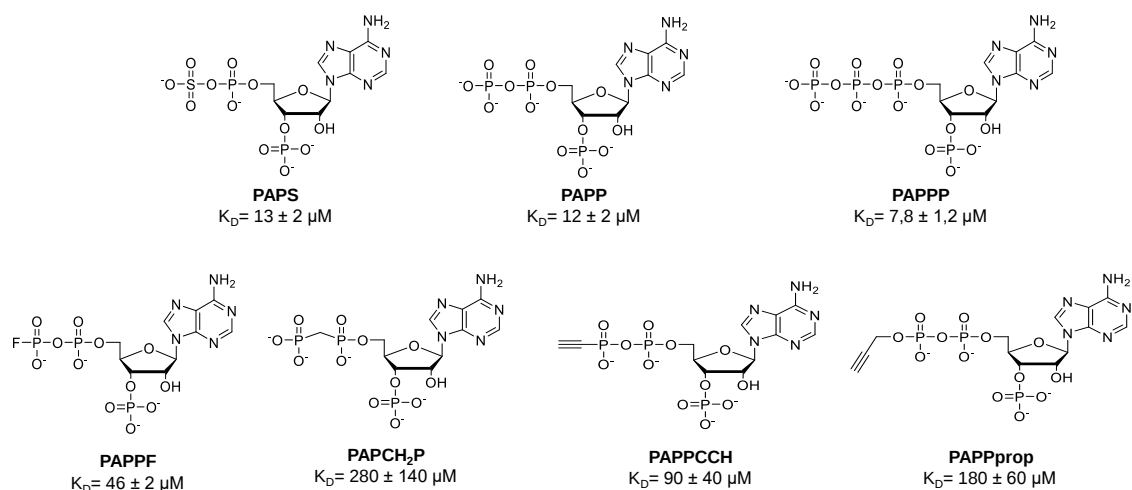
zastąpieniu adeniny innymi zasadami azotowymi, co znajduje zastosowanie w projektowaniu ciekawych narzędzi molekularnych i układów biortogonalnych^{119, 120}. Wiadomo, że reszta adeniny zaangażowana jest w oddziaływania warstwowe z aminokwasami w kieszeni wiążącej sulfotransferaz i stabilizuje PAPS w kompleksie przed etapem przeniesienia grupy siarczanowej. Postanowiłam zweryfikować jak zamiana adeniny na inną zasadę azotową np. guaninę, cytozynę czy uracyl wpłynie na oddziaływanie z enzymem. W tym celu zastosowałam guaninowe i cytozynowe analogi PAP, 5'3'-difosfoguanozynę (PGP) oraz 5'3'-difosfocytydynę (PCP; w przypadku 5'3'--difosfourydyny próba syntezy zakończyła się niepowodzeniem). Następnie wyznaczyłam wartości K_D dla kompleksów tych związków z AtSOT18, które wyniosły odpowiednio 6,7 mM oraz 3,1 mM. Powinowactwo do AtSOT18 tych związków jest więc o ponad 2 rzędy wielkości słabsze niż PAP, co wskazuje na bardzo silną preferencję względem adeniny w strukturze kofaktora. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że konformacja kieszeni wiążącej wymusza ułożenie zasady adeninowej (i całego liganda) w określony sposób. Mniejsza objętościowo zasada (cytozyna) w pewnym stopniu (znacznie słabiej) oddziałuje z enzymem w przeciwieństwie do guaniny, której gęstość elektronowa na tyle różni się od adeniny, że można uznać ją za praktycznie nierozpoznawaną przez AtSOT18. Ogólnie, wskazuje to, że zasada azotowa odgrywa dużą rolę w stabilizacji kompleksu enzymu z kofaktorem i wprowadzanie modyfikacji chemicznych w tym obrębie może skutkować znaczącym zaburzeniem oddziaływań. Dlatego też, w dalszych swoich badaniach skupiłam się na analogach będących pochodną adeniny i jej sterycznie niewymagających modyfikacjach.



Rys. 55. Struktury oraz K_D związków wykorzystanych do badania wpływu obecności 3' fosforanu i adeniny na powinowactwo do AtSOT18.

Posiadając zestaw wartości K_D dla różnorodnie fosforylowanych naturalnych nukleotydów, który dawał ogólny pogląd na powinowactwo badanej modelowej sulfotransferazy do naturalnego substratu i potencjalnych naturalnych inhibitorów, w następnej kolejności przystąpiłam do ewaluacji zestawu chemicznie modyfikowanych analogów PAPS i PAP.

Pierwszą grupą zaproponowanych analogów były związki, w których grupa siarczanowa została zastąpiona resztami fosforanowymi o zbliżonej objętości lub ładunku. Struktury i wartości K_D od tej grupy związków zebrałam na **Rys. 56**. Jak już wspomniałam wyżej, analog PAPS, w którym w miejsce siarczanu, został wprowadzony fosforan, PAPP, wiąże się z sulfotransferazą AtSOT18 tak samo silnie jak PAPS (K_D PAPS = 13 μ M, K_D PAPP = 12 μ M). Stała dysocjacji związku, z dodatkowym pirofosforanem, PAPPP, była nieznacznie niższa niż naturalnego kofaktora (wynosi 7,8 μ M) co oznacza, że wprowadzenie dodatkowego fosforanu zwiększa powinowactwo do kieszeni wiążącej białka. Co zaskakujące, zamiana siarczanu na grupę fluorofosforanową, która jest izosterycznym i izoelektronowym analogiem siarczanu, skutkowała 4-krotnym obniżeniem powinowactwa w stosunku do PAPS (K_D PAPPF 46 μ M). Z kolei zastąpienie grupy fosfosiarczanowej resztą metylenobisfosfonianową, będącą analogiem difosforanu z grupą CH_2 w miejscu mostkowego atomu tlenu, skutkowało ponad 20-krotnym osłabieniem oddziaływania z AtSOT18 w stosunku do PAPS czy PAPP (K_D PAPCH₂P 280 μ M). Co ciekawe, w przypadku przeprowadzenia eksperymentu w obecności wysycającego stężenia naturalnego substratu AtSOT18, desulfosinigriny, K_D dla dwóch związków z tej grupy, PAPP i PAPPF, znacznie zmalało w stosunku do pomiarów bez substratu i wynosiło odpowiednio 2,4 μ M oraz 23,8 μ M. Może to wynikać z faktu, że po związaniu substratu enzym zmienia konformację powodując stabilizację fosforanu (lub fluorofosforanu). Związki zawierające grupy funkcyjne umożliwiające późniejszą funkcjonalizację (grupy alkinowe) wykazywały niskie powinowactwo do białka AtSOT18 wynoszące 90 μ M dla związku PAPPCCH oraz 180 μ M dla PAPPPprop. Dodatkowo K_D wyznaczone dla związku PAPPCCH w obecności desulfosinigriny wynosi 110 μ M czyli nieznacznie się zmniejsza (w przeciwieństwie do wyników jakie obserwowałam dla PAPP oraz PAPPF) co sugeruje, że nawet zmiana konformacji białka nie umożliwia wnikięcia tak obszernej grupy do kieszeni wiążącej.



Rys. 56. Struktury związków modyfikowanych w obrębie grupy siarczanowej oraz K_D wyznaczane dla białka AtSOT18.

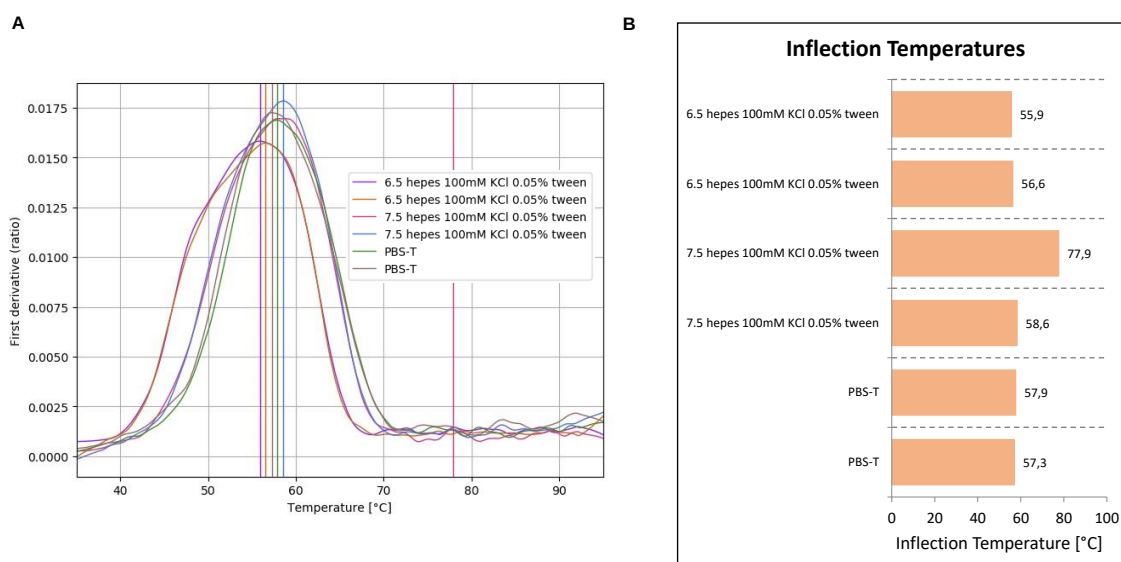
Kolejną grupę badanych związków stanowiły analogi modyfikowane w obrębie zasady azotowej. Podstawniki o różnej wielkości/długości wprowadziłam w trzy pozycje - C2, N6 oraz C8 adeniny. Związki modyfikowane w pozycji N6 były w dużym stopniu akceptowane przez enzym. Związki N6-propa-PAPP oraz N6-AE-PAPP, wykazywały powinowactwo do białka AtSOT18 (K_D odpowiednio 8,5 i 8,4 μM) porównywalne do naturalnego kofaktora. Wprowadzenie dłuższego linkera, 8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-aminy, skutkowało 2-krotnym obniżeniem powinowactwa (K_D 22 μM) w stosunku do wyżej wymienionych związków. Interesujące jest też porównanie tego analogu z jego odpowiednikiem posiadającym grupę siarczanową, N6-PEG-PAPS. Okazuje się, że zamiana grupy fosforanowej na naturalnie występującą grupę siarczanową skutkowałą zwiększeniem K_D z 22 μM do 93 μM . Pozwala to wysnuć wniosek, że w przypadku związków, modyfikowanych w pozycji N6, które mają być w późniejszym etapie funkcjonalizowane korzystne jest wprowadzenie grupy fosforanowej, co poprawia powinowactwo do białka AtSOT18. Potwierdza to eksperyment przeprowadzony w obecności desulfosinigriny (**Tabela 5**; K_D 24 μM). Analogiczne eksperymenty zostały przeprowadzone dla związków modyfikowanych w pozycji C8 resztą azydoetylową, C8-AE-PAPP oraz C8-AE-PAPS. W tym wypadku oba związki posiadały zbliżone powinowactwo do AtSOT18, które wynosiło odpowiednio 16 μM oraz 20 μM (K_D), było zatem porównywalne do PAP i PAPS. Obecność desulfosinigriny spowodowała ponad 2-krotne zwiększenie K_D dla C8-AE-PAPP (50 μM). Wynik ten potwierdza wcześniej wysuniętą hipotezę, że mimo iż C8-AE-PAPP wykazuje powinowactwo do sulfotransferazy to po związaniu konformacja miejsca aktywnego ulega zmianie w taki

sposób, że utrudnione jest wiązanie substratu. Najmniej korzystną pozycją do wprowadzania sterycznie wymagających modyfikacji adeniny okazała się być pozycja C2 (K_D związku C2-PEG-cPAPP wyniosło 210 μM). Ważnych informacji dostarczyło również wyznaczenie K_D fluorowanych analogów PAPS. K_D wyznaczone dla tych związków metodą termoforezy mikroskalowej, (bez dodatku desulfosinigriny) wynosiły odpowiednio 43 μM , 390 μM , 130 μM dla 2-F-PAPS, 2-CF₃-PAPS, oraz 8-CF₃-PAPS. Wynik ten sugeruje, że wprowadzenie małej modyfikacji (np. atom fluoru) w pozycji C2 nie wpływa znacząco na powinowactwo do białka AtSOT18 (w warunkach umożliwiających przebieg reakcji enzymatycznej czyli z dodatkiem substratu) natomiast większe modyfikacje (np. grupa CF₃) powodują drastyczne obniżenie wartości K_D . Dodatkowo w kontekście tych wyników modyfikacje wprowadzane w pozycjach C8 lub C2 są bardzo wrażliwe i zależne od np. długości linkera czy objętości podstawnika a także w zależności od konformacji jaką przybiera enzym (po związaniu substratu lub w przypadku jego absencji) zmieniają swoje ułożenie w kieszeni wiążącej.

Otrzymałam również 2 analogi PAP posiadające modyfikacje w pozycji 2', 2'-F-PAP oraz 2'-O-pen-PsAPs, które mogą potencjalnie zwiększyć powinowactwo do białka, umożliwić analizę innymi technikami np. ¹⁹F NMR (wprowadzenie fluoru) oraz znakowanie lub immobilizację cząsteczek (wprowadzenie ugrupowania alkinowego). Planowałam również otrzymanie innych związków z podobnymi modyfikacjami (np. 2'-O-pen-PAP), jednak próby ich syntezy okazały się nieskuteczne. Sulfotransferaza roślinna rozpoznaje 2'-F-PAP na poziomie zbliżonym do naturalnego PAP co oznacza, że fluor w tej pozycji nie zaburza wiązania. Związek posiadający w tej samej pozycji większą modyfikację, czyli podstawnik pentynylowy, wykazuje niższe powinowactwo do AtSOT18. Mamy tu jednak do czynienia również z dwoma atomami siarki wprowadzonymi w 5' i 3' fosforan i nie sposób tu rozróżnić, która z tych modyfikacji wywiera rzeczywisty wpływ na obniżenie powinowactwa liganda do kieszeni wiążącej. Odpowiedzi na te pytania miał dostarczyć otrzymany analog PsAPs, jednakże występował on w formie dwóch izomerów 2' oraz 3' (stosunek wyznaczony na podstawie widma ¹H NMR wynosił odpowiednio 0,4:1). Zmierzone dla tego związku K_D wynosi 21 μM zaś przebieg krzywej termoforetycznej wskazuje na jedno miejsce wiązania.

W następnym etapie realizacji projektu, podobne badania przeprowadziłam dla ludzkiej sulfotransferazy, SULT1A3. Badania te miały na celu (i) weryfikację, czy opisane metoda MST może zostać zastosowana do badania innych białek o aktywności ST, (ii) porównanie wyników otrzymanych dla różnych enzymów i próbę wyciągnięcia

ogólnych wniosków na temat specyficzności i uniwersalności wpływu poszczególnych modyfikacji na oddziaływania z ST. Eksperymenty prowadziłam analogicznie jak w przypadku AtSOT18. W pierwszej kolejności wykonałam pomiary metodą DSF w celu określenia stabilności enzymu w warunkach eksperymentu. Mimo, że najwyższą T_i białko wykazywało w buforze hepes, pH 7,5, na wykresie zależności pierwszej pochodnej stosunku 350/330 nm od temperatury widać przegięcie w temperaturze ok. 50°C (**Rys. 57**). Analizując wyniki otrzymane metodą DSF jako warunki najwyższej stabilności białka wybrałam bufor PBS-T, dlatego też w tym buforze prowadziłam znakowanie oraz pomiary. Na tym etapie warto wspomnieć, że dodatkowych informacji o stabilności białka w trakcie trwania eksperymentu może dostarczyć również przebieg krzywej termoforetycznej. Ponieważ enzym SULT1A3 jest znacznie bardziej wrażliwy na drobne zmiany warunków eksperymentu często obserwowałam występowanie licznych agregatów. Przykładowe krzywe przedstawiam na rys.



Rys. 57. Zestawienie wyników stabilności białka SULT1A3 w wybranych buforach wyznaczona metodą DSF; **A.** Wykres zależności pierwszej pochodnej stosunku 350/330 nm od temperatury. **B.** Wykres słupkowy przedstawiający wartości T_i w wybranych buforach.

W celu weryfikacji metody wyznaczyłam K_D PAP, które wynosiło 0,7 μ M (jest porównywalne dla danych literaturowych zmierzonych dla SULT1A2, ludzkiej sulfotransferazy cytozolowej)³⁸. K_D wyznaczone dla pozostałych ligandów zebrałam w tabeli poniżej (**Tabela 7**).

Tabela 7. Wyznaczone K_D dla ligandów z białkiem SULT1A3.

Lp	Ligand	K_D [μ M]	n	Lp	Ligand	K_D [μ M]	n
1	PAPS	30±16	3	12	ATP	>3 mM	1
2	PAPP	3±3	1	13	2'-F-PAP	1±1,1 mM	2
3	PAPPF	14±11	3	14	2'-O-pent P ₅ AP ₅	20±5	3
4	PAPCH ₂ P	40±30	3	15	N6-PEG-PAPS	390±150	3
5	PAPPP	28±12	2	16	N6-PEG-PAPP	>3 mM	1
6	PAPPCCH	70±20	2	17	N6-AE-PAPP	300±300	2
7	PAPPprop	260±60	1	18	C2-PEG-cPAPP	600±200	1
8	PAP	0,7±0,2	6	19	C2-PEG-PAP	1,3±1,3 mM	1
9	cPAP	8±3	1	20	C8-AE-PAPP	>3 mM	1
10	AMP	200±400	1	21	C8-AE-PAPS	70±40	3
11	ADP	13±14	1				

Stała dysocjacji kompleksu białko-PAPS wynosi 30 μ M. Co ciekawe zastąpienie ugrupowania siarczanowego fosforanem czy fluorofosforanem (czyli strukturalnie najbliższe PAPS) wiązały się silniej niż naturalny PAPS, co sugerują odpowiednie wartości K_D : PAPP - 3 μ M, PAPPF - 14 μ M. Analog posiadający mostek metylenobisfosfonianowy (PAPCH₂P) oraz trifosforan w pozycji 5' (PAPPP) wykazywał porównywalne powinowactwo do PAPS (K_D PAPCH₂P 40 μ M; K_D PAPPP 28 μ M), natomiast wprowadzenie większych modyfikacji wpłynęło na znaczne obniżenie stałej dysocjacji, proporcjonalnie do objętości modyfikacji (w przypadku PAPPCCH wyniosła ona 70 μ M, zaś dla PAPPprop 260 μ M). Na podstawie tych wyników można wysnuć tezę, że miejsce wiązania fosfosiarczanu jest stosunkowo wrażliwe na zmiany nawet tak drobne jak wymiana jednego atomu. Zestawiając te wyniki z tymi otrzymanymi dla AtSOT18 można zauważyć, że zamiana siarczanu na fosforan lub pirofosforan jest korzystną modyfikacją, która zwiększa bądź też nie zaburza oddziaływania z sulfotransferazami. Z tego względu związki PAPP oraz PAPPP wydają się być obiecującymi uniwersalnymi narzędziami do badania sulfotransferaz. Dwa analogi, PAPPCCH oraz PAPPprop wykazują podobne właściwości względem AtSOT18 oraz SULT1A3. Mimo, że powinowactwo tych związków jest niższe niż naturalnego PAPS, posiadają one w strukturze grupy funkcyjne umożliwiające znakowanie w celu lokalizacji

komórkowej oraz umożliwiające użycie ich jako złóż powinowactwa (oczyszczanie z lizatów komórkowych lub oznaczenie poziomu ST w komórkach). Jeden ze związków, PAPPF, silnie wiąże się z SULT1A3 natomiast wykazuje słabe wiązanie z AtSOT18.

SULT1A3 silnie wiąże się z naturalnym inhibitorem, PAP (K_D 0,7 μ M) natomiast jakiegokolwiek zmiany wprowadzone w tej strukturze skutkują co najmniej 10–krotnym osłabieniem tego wiązania. Obserwacja ta wynika z porównania wartości K_D PAP oraz cPAP (cykliczny fosforan w pozycji 2'3' rybozy spowodował obniżenie K_D ; **Tabela 7**). Brak fosforanu w pozycji 3' znacznie obniżył stabilność białka (przebieg krzywej termoforetycznej wskazuje na powstawanie agregatów) a także powinowactwo nukleotydów AMP, ADP oraz ATP względem PAP (K_D kolejno 200 μ M, 13 μ M, 3 mM). Ciekawych informacji dostarczają dwa związki posiadające modyfikacje w pozycji 2' rybozy, 2'-F-PAP oraz 2'-O-pen-PsAPs. Wprowadzenie fluoru w pozycję 2' poskutkowało obniżeniem powinowactwa liganda ponad 1000- krotnie (w porównaniu do PAP). Może to wynikać z faktu, że za stabilizację pozycji 2' odpowiadają wiązania wodorowe tworzone między tlenem a azotem argininy. Można przypuszczać, że wprowadzenie silnie elektroujemnego atomu fluoru zaburza te oddziaływania i powoduje słabe powinowactwo liganda do białka. Co zaskakujące, K_D drugiego ze wspomnianych związków, 2'-O-pen-PsAPs wynosi 20 μ M, co jest zbliżone do powinowactwa PAPS. Dodatkowo związek ten wykazuje podobne powinowactwo dla obu sulfotransferaz modelowych. Porównując wyniki dla dwóch badanych ST: roślinnej AtSOT18 oraz ludzkiej SULT1A3 można zauważyć w tym kontekście podobieństwo tj. wprowadzenie jakiegokolwiek modyfikacji obejmujących naruszenie wiązań stabilizujących 3' fosforan, czyli cPAP, AMP, ADP, ATP, skutkuje znacznym obniżeniem powinowactwa tych ligandów do ST. Wyniki te potwierdzają kluczowe znaczenie 3'-fosforanu względem powinowactwa do sulfotransferaz i dodatkowo wyjaśnia dlaczego ADP nie wykazuje właściwości inhibitorowych względem tej grupy enzymów. Dodatkowo, wśród omawianych analogów wyróżnił się jeden związek, 2'-F-PAP, który wykazuje selektywne właściwości względem jednej z sulfotransferaz (AtSOT18). Można więc postawić tezę, że wpływ modyfikacji w pozycji 2' jest zależny od enzymu a tym samym nie jest to dobre miejsce wprowadzania modyfikacji w kontekście poszukiwania uniwersalnych narzędzi dla ST. Jednakże pozycja ta może być bardzo korzystna, w przypadku projektowania analogów PAPS skrojonych dla konkretnego enzymu, umożliwiające selektywne monitorowanie jego aktywności w mieszaninach biologicznych.

Ostatnia grupę związków stanowiły analogi PAPS modyfikowane na adeninie w trzech pozycjach: N6, C2 oraz C8. Analogicznie jak w przypadku sulfotransferazy AtSOT18 modyfikacje obejmowały wprowadzenie różnej długości linkerów zakończonych azydkiem w celu umożliwienia znakowania z użyciem reakcji klik. Samo wprowadzenie 8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-aminy w pozycję N6 (N6-PEG-PAPS) skutkowało 13-krotnym obniżeniem powinowactwa w porównaniu do PAPS (K_D 390 μ M). Co zaskakujące analogiczny związek zawierający fosforan w miejscu siarczanu wykazywał bardzo słabe wiązanie z SULT1A3 ($K_D > 3$ mM). Dla porównania, w związku, w którym wprowadzono krótszy linker, 1-(2-azydoetylowy), wprowadzenie fosforanu nieznacznie zwiększyło powinowactwo liganda do sulfotransferazy (K_D N6-AE-PAPP = 300 μ M). Związki C2-PEG-cPAPP oraz C2-PEG-PAP, modyfikowane w pozycji C2, wiązały się bardzo słabo. Wartości K_D wyniosły odpowiednio 600 μ M oraz 1,3 mM. Analogi C8-AE-PAPP oraz C8-AE-PAPS. Wyniki te sugerują, że pozycja C2 zasady azotowej jest niekorzystnym miejscem wprowadzania modyfikacji. Zarówno AtSOT18 jak i SULT1A3 wykazywały słabe powinowactwo do analogów niosących tą modyfikację. Odmierna sytuacja ma miejsce w przypadku analogów modyfikowanych w pozycjach C8 oraz N6 adeniny. Wykazywały one wysokie powinowactwo do AtSOT18 będąc jednocześnie słabym ligandem dla SULT1A3.

Podsumowując, w ramach realizacji tej części projektu doktorskiego, zaprojektowałam i zsyntezowałam 28 związków będących analogami naturalnego kofaktora (PAPS) lub inhibitora (PAP) sulfotransferaz. Związki te posiadały modyfikacje w trzech „fragmentach” struktury mających kluczowe znaczenie na wiązanie liganda w kieszeni katalitycznej enzymów z grupy ST. Miejsca wprowadzenia modyfikacji obejmowały grupę fosfosiarczanową na końcu 5', pozycje 2' rybozy oraz zasadę azotową. Aby porównać właściwości otrzymanych analogów opracowałam i zoptymalizowałam metodę wyznaczania stałej dysocjacji kompleksów z AtSOT18 oraz SULT1A3 z użyciem techniki termoforezy mikroskalowej. Na podstawie wartości K_D wyselekcjonowałam dwa związki, PAPP oraz PAPPP, która wykazuje większe lub równe powinowactwo do obu sulfotransferaz (w porównaniu do PAPS). Związki te mogą zostać użyte jako uniwersalne narzędzia do badania sulfotransferaz. Jednocześnie siedem spośród badanych analogów wykazywało selektywne właściwości względem AtSOT18 tj. N6-PEG-PAPP, N6-PEG-PAPS, N6-prop-PAPP, N6-AE-PAPP, C2-PEG-PAP, C8-AE-PAPP oraz C8-AE-PAPS. Jeden związek, PAPPF, wykazywał selektywne, silne powinowactwo do SULT1A3.

Opracowana metoda do badania sulfotransferaz bazująca na zjawisku termoforezy jest pierwszą metodą pozwalającą w szybki i precyzyjny sposób wyznaczyć stałe dysocjacji kompleksów ligand - sulfotransferaza. Wyłonione w toku badań związki mogą posłużyć zarówno jako uniwersalne narzędzia do lepszego poznania całej grupy enzymów jaką stanowią sulfotransferazy ale również jako selektywne narzędzia do badania właściwości wybranych ST.

Kontynuację projektu dotyczącego sulfotransferaz mogłaby stanowić weryfikacja opracowanej metody MST metodą ^{19}F NMR tzn. wybrane ligandy dla obu ST mogłyby zostać zweryfikowane jako inhibitory metodą ^{19}F NMR. Badania te dałyby odpowiedź na nurtujące mnie pytanie jak (i czy w ogóle) dane z MST korelują z aktywnością inhibitorową. Dodatkowo tym, czego nie udało mi się zrealizować, a co jednocześnie uważam za niezmiernie ciekawe, jest otrzymanie struktury krystalograficznej z wybranymi analogami PAPS i PAP. Badania takie dałyby odpowiedź na wiele pytań pojawiających się podczas analizy danych przedstawionych w niniejszej rozprawie. W kontekście planów, których nie udało mi się zrealizować z powodu ograniczenia czasowego, jest również użycie wybranych analogów do stworzenia złożeń powinowactwa dla sulfotransferaz. W trakcie prowadzenia badań będących przedmiotem niniejszej pracy podjęłam próbę realizacji tego projektu jednakże wyniki wstępnych eksperymentów pokazały, że mogłoby to stanowić temat odrębnej pracy doktorskiej. W kontekście przeprowadzonych badań interesujące wydaje mi się również przeprowadzenie badań w modelach komórkowych. W tym celu wykorzystałabym analogi PAPS z wprowadzonymi linkerami na zasadzie azotowej, które następnie po wyznakowaniu fluorescencyjnym i skwantyfikowaniu pozwoliłyby zarówno na określenie lokalizacji ST w wybranych liniach komórkowych jak i ich poziomu. Mimo pracy którą włożyłam w pogłębienie wiedzy na temat sulfotransferaz pole to uważam za wciąż otwarte do eksploracji na wielu płaszczyznach.

5.5. PODSUMOWANIE BADAŃ WŁASNYCH

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z dwóch zasadniczych części, z których każda obejmowała syntezę i ewaluację nowych analogów kofaktorów adeninowych.

Pierwsza część projektu dotyczyła analogów kofaktora NAD oraz badania z wybranymi enzymami, DXO oraz Nudt12, rozpoznającymi tą strukturę na końcu

5'-RNA. Poniżej, w punktach chciałabym posumować osiągnięcia wynikające z realizacji tej części badań:

- Zaprojektowałam trzyetapową ścieżkę syntezy polegającą na chemicznej hydrolizie handlowo dostępnego NAD, aktywacji nukleotydu nikotynoamidowego oraz reakcji sprzęgania dwóch podjednostek fosforanowych. Stosując to podejście otrzymałam 8 analogów NAD (z czego 6 we współpracy z dr Anaïs Depaix), które posiadały modyfikacje w obrębie grupy 5' OH, fosforanu α oraz 3' a także grupę metylową w pozycji 2'.
- Analogi NAD zostały pomyślnie wbudowane na końcu 5' RNA w procesie IVT. Dodatkowo trinukleotydowe analogi NAD wbudowywały się z wyższą wydajnością niż dinukleotydy.
- W toku badań zidentyfikowano jeden związek (NppsA) odporny na aktywność pirofosfataz Nudt12 oraz NudC, jeden związek, NppA_{mpG}, odporny na działanie egzonukleazy DXO oraz cztery związki (dwa izomery NppsA oraz dwa izomery NppsA_{mpG}) wykazujące zwiększoną odporność na aktywność trzech enzymów.

Drugą część badań doktorskich stanowiło zaprojektowanie oraz synteza fluorowanych analogów kofaktora PAPS oraz ich ewaluacja jako narzędzi molekularnych do badania sulfotransferaz. Badania zostały przeprowadzone z użyciem dwóch modelowych sulfotransferaz cytozolowych, roślinnej AtSOT18 oraz ludzkiej SULT1A3. W wyniku przeprowadzonych badań:

- Opracowałam i zoptymalizowałam ścieżkę syntezy fluorowanych analogów PAPS przy użyciu metody fosforylacji Yoshikawy. Dzięki zaproponowanym przeze mnie zmianom możliwe było wprowadzenie modyfikacji w obrębie zasady azotowej z wysoką wydajnością oraz selektywne otrzymanie 3 (z 4 zaprojektowanych) fluorowanych analogów PAPS (2-F-PAPS, 2-CF₃-PAPS i 8-CF₃-PAPS).
- Opracowałam metodę RP-HPLC, która pozwoliła na określenie właściwości substratowych otrzymanych związków względem modelowych ST. Sulfotransferaza roślinna wykazała aktywność względem dwóch analogów 2-F-PAPS oraz 2-CF₃-PAPS. Trzeci analog, 8-CF₃-PAPS nie wykazywał właściwości substratowych względem tej

ST. Ludzka sulfotransferaza, SULT1A3 wykazywała aktywność względem wszystkich otrzymanych fluorowanych analogów PAPS, niestety w przypadku 2-CF₃-PAPS oraz 8-CF₃-PAPS sygnały od substratu i produktu nakładały się, co uniemożliwiało ocenę kinetyki reakcji w pomiarach w czasie rzeczywistym.

- Posiadając informacje o właściwościach substratowych względem badanych ST opracowałam pierwszą znaną metodę bezpośredniego określania aktywności ST, która nie wymaga znakowania izotopowego. Zaproponowałam warunki dwóch rodzajów eksperymentów ¹⁹F NMR: bieżący w czasie rzeczywistym oraz test punktu końcowego. Stabilność badanych analogów została potwierdzona poprzez prowadzenie pomiarów w warunkach eksperymentu bez dodatku enzymu (wszystkie analogi wykazywały stabilność przez min. 19 h). Wyniki pomiarów potwierdziły zależności obserwowane podczas analizy metodą RP-HPLC, a tym samym pozwoliły stwierdzić, że dwa fluorowane analogi PAPS (2-F-PAPS oraz 2-CF₃-PAPS) mogą posłużyć jako uniwersalne narzędzia do badania ST natomiast analog 8-CF₃-PAPS może być narzędziem dla węższej grupy sulfotransferaz.

Ostatnia część moich badań dotyczyła opracowania pierwszej znanej metody pozwalającej na wyznaczenie stałej dysocjacji dla analogów PAPS oraz modelowych ST. W tym celu:

- Zaprojektowałam i zsyntezowałam 28 analogów PAPS, posiadających modyfikacje w obrębie zasady azotowej, reszty fosforanowej oraz rybozy.
- Opracowałam metodę wyznaczania stałej dysocjacji kompleksu białko-ligand wykorzystującą zjawisko termoforezy (termoforeza mikroskalowa) dla dwóch modelowych sulfotransferaz, AtSOT18 oraz SULT1A3. Metoda ta posłużyła mi do określenia powinowactwa otrzymanych analogów względem wspomnianych enzymów. W grupie badanych związków znalazły się dwa, PAPP oraz PAPPP, które wykazywały silne wiązanie do AtSOT18 oraz SULT1A3 (w porównaniu do PAPS), siedem, które wykazywały silne wiązanie z AtSOT18, zaś słabe z SULT1A3 (N6-PEG-PAPP, N6-PEG-PAPS, N6-prop-PAPP, N6-AE-PAPP, C2-PEG-PAP, C8-AE-PAPP oraz C8-AE-PAPP) oraz jeden związek, który selektywnie wiązał się z SULT1A3 (PAPPF). Związki te mogą posłużyć

zarówno jako uniwersalne narzędzia do badania enzymów z grupy sulfotransferaz jak i selektywne narzędzia względem wybranych ST.

6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

6.1. SYNTEZA CHEMICZNA

6.1.1. INFORMACJE OGÓLNE DOTYCZĄCE SYNTEZY CHEMICZNEJ:

Materiały wyjściowe, rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne pozyskano ze źródeł komercyjnych (Merck, POCh). NAD zakupiono w postaci soli sodowej z firmy Merck. Nukleozydy (A, C,U,G oraz 2'-F-A) oraz sinigrinę zakupiono z firmy Sigma – Aldrich. Chlorowodorek dopaminy zakupiono z firmy Alfa Aesar. RNazę T2 zakupiono z firmy Mobitech. C-fosfonian etynyłu oraz imidazolowa pochodna fluorofosforanu zostały zsyntezowane odpowiednio przez dr Przemysława Wanata (opisane w pracy¹²¹) oraz dr Marka Baranowskiego. Fosforan propargilu oraz 2'-O-(1-pent-5-yn) adenozyne otrzymano na podstawie protokołów opisanych w pracach Walczak i wsp.¹²²; Jawalekar i wsp.¹⁰⁵. PAPS używany jako kontrola reakcji prowadzonych z sulfotransferazami został zsyntezowany zgodnie z procedurą opisaną przez Kowalska i wsp.⁸⁵ Fluorowane nukleozydy (2-F-A, 2-CF₃-A oraz 8-CF₃-A) zostały zsyntezowane przez dr. Mikołaja Chromińskiego w Laboratorium Chemii Biologicznej w CeNT UW.

Chromatografia jonowymienna: Izolację nukleotydów przeprowadzono metodą chromatografii jonowymiennej na kolumnie DEAE Sephadex A-25 (forma HCO₃⁻). W tym celu na kolumnę nanoszono mieszaninę reakcyjną i przemywano dokładnie wodą do momentu, gdy eluat nie wytrącał soli srebra (próba z 0.1 M roztworem AgNO₃). Procedura ta miała na celu usunięcie rozpuszczalników i związków niejonowych. Następnie nukleotydy eluowano za pomocą liniowego gradientu wodorowęglanu trietyloamoniowego (TEAB) w wodzie dejonizowanej (0 – 1.2 M). Zebrane frakcje analizowano spektrofotometrycznie przy $\lambda=260$ nm i w razie potrzeby metodą RP-HPLC. Frakcje zawierające pożądany produkt połączono a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywając w trakcie etanolem (96%), w celu rozłożenia pozostałości TEAB. Produkt wytrącono acetonitrylem. Otrzymane związki były izolowane jako sole trietyloamoniowe.

Obliczanie wydajności, współczynniki ekstynkcji: Wydajności obliczono ze wzoru na gęstość optyczną, gdzie mODs, mODp i W oznaczają odpowiednio jednostki optyczne substratu, jednostki optyczne produktu oraz wydajność :

$$W = \frac{mOD_p}{mOD_s} \times 100\%$$

Absorbencję zmierzono w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,0) przy długości fali 260 nm. Współczynniki absorpcji (ϵ , ml/mmol/cm) wynosiły odpowiednio: 17400 dla NAD i analogów dinukleotydów NAD¹²³; 29480 (suma ϵ NAD i ϵ G) dla NADpG i analogów trinukleotydów NADpG; 15020 dla analogów PAP i PAPS (przyjęto współczynnik taki jak dla niemodyfikowanej adenozyiny¹²⁴). W przypadku analogów 2-CF₃-PAPS i 8-CF₃-PAPS wyznaczono współczynnik absorpcji poprzez rozpuszczenie określonej masy związku w DMSO i pomiar absorbancji roztworu przy długości fali 260 nm w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,0, w temperaturze pokojowej. Współczynniki ekstynkcji (ϵ_{260}) wyznaczone dla tych związków wynosiły odpowiednio 10660 i 11392 (ϵ , mL/mmol/cm).

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC): Postęp reakcji chemicznych i oznaczenia enzymatyczne monitorowano metodą HPLC. Analizy analogów NAD, PAP i PAPS prowadzono przy użyciu kolumny SUPELCO Supelcosil LC-18-T HPLC (4,6×250 mm, 5 μ m, przepływ: 1,3 ml/min). Analizy analogów PAP modyfikowanych fluorem przeprowadzono przy użyciu kolumny Gemini 3 μ m NX-C18 LC 110 Å (150×4,6 mm, przepływ: 1 ml/min). Zastosowano gradienty przedstawione w **Tabela 8:**

Tabela 8. Szczegółowy opis programów stosowanych do analiz metodą RP-HPLC (analityczne i półpreparatywne).

Programy analityczne			
Program	Bufor A	Bufor B	Gradient
1.	octanu amonu, pH 5,9, 0,05 M	-	Izokratyczny
2.	octanu amonu, pH 5,9, 0,05 M	Bufor A/MeOH 1/1 v/v	0-50% buforu B w czasie 15 min
3.	octanu amonu, pH 5,9, 0,05 M	Bufor A/MeOH 1/1 v/v	0-100% buforu B w czasie 15 min
Programy półpreparatywne			
4.	octanu amonu, pH 5,9, 0,05 M	-	Izokratyczny
5.	octanu amonu, pH 5,9, 0,05 M	Bufor A/ACN 1/1 v/v	0-50% buforu B

6.	octanu trietyloaminy, pH 7,0, 0,05 M	-	Izokratyczny
7.	octanu trietyloaminy, pH 7,0, 0,05 M	Bufor A/ACN 1/1 v/v	0-50% buforu B
8.	ACN	H ₂ O	0-2 min 6% buforu A 2-12 min 24% buforu A 12-15 min 32% buforu A

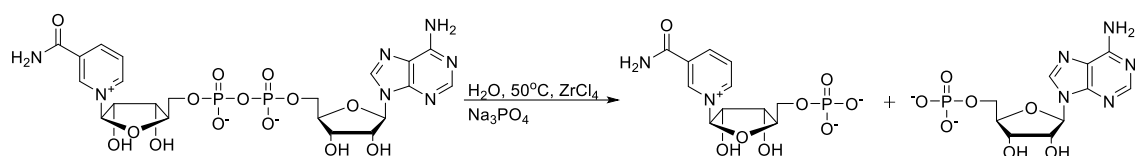
Wszystkie analogi NAD, PAP i PAPS zostały oczyszczone, a diastereoizomery rozdzielono metodą RP HPLC przy użyciu kolumny Discovery RP Amide C-16 HPLC (25 cm×21,2 mm, 5 µm, przepływ 5,0 ml/min) z detekcją UV przy 254 nm. Po wielokrotnym liofilizowaniu zebranych frakcji, wyizolowano związki w postaci soli amonowych.

Półpreparatywne oczyszczanie RP HPLC analogów PAP i PAPS przeprowadzono przy użyciu kolumny Clarity 5 µm Oligo-RP LC (150×10 mm, przepływ 5,0 mL min⁻¹) z detekcją UV przy 254 nm. Po oczyszczaniu związki wielokrotnie liofilizowano i wyizolowano w postaci soli trietyloamoniowych lub amonowych.

Metody spektroskopowe: Struktury i homogeniczność wszystkich finalnych związków potwierdzono za pomocą RP HPLC, wysokorozdzielczej spektrometrii mas z zastosowaniem jonizacji elektro sprayem ujemnym (HRMS-ESI) oraz spektroskopii ¹H, ³¹P, ¹⁹F NMR. Widma masowe rejestrowano za pomocą spektrometru LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Widma NMR zostały zarejestrowane w temperaturze 25 °C za pomocą spektrometru BRUKER AVANCE III HD przy częstotliwości 500 MHz (¹H NMR), 202 MHz (³¹P NMR) i 471 MHz (¹⁹F NMR). Przesunięcia chemiczne ¹H NMR zostały skalibrowane do 3-trimetylosilil-[2,2,3,3-D₄]propionianu sodu (TSP) w D₂O (δ_H = 0 ppm), dla ³¹P NMR do 20% kwasu fosforowego w D₂O (δ_H δ_P = 0 ppm) i dla ¹⁹F NMR do 0,1 M NaF w D₂O (δ_F = -121.5 ppm) jako zewnętrznych standardów. Przypisanie sygnałów i identyfikacja były oparte na analizie widm COSY. Widma NMR były analizowane przy użyciu programu MestReNova 12.0.1.

6.1.2 SYNTEZA ANALOGÓW NAD

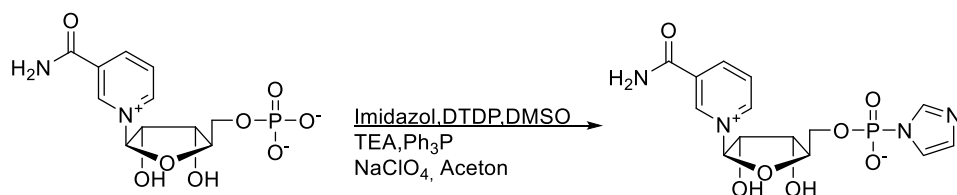
6.1.2.1. Hydroliza chemiczna NAD (NMP)



Syntezę wykonano zgodnie z procedurą opisaną w pracy Liu i wsp.⁹⁶ W kolbie okrągłodennej umieszczono dinukleotyd nikotynamidowo-adeninowy (1,0 g, 1,5 mmol) rozpuszczono w wodzie (150 ml) i mieszając, podgrzano do 50°C (łaźnia olejowa). Następnie dodano chlorek cyrkonu (1,8 g, 7,5 mmol, 5 ekwiw.) i mieszano przez 30 min, aż do całkowitej konwersji do produktów (NMN i AMP), monitorowanej za pomocą RP HPLC. Reakcję zahamowano przez dodanie 70 ml 0,5 M Na_3PO_4 w wyniku czego powstał biały osad. Mieszaninę doprowadzono do pH 7 za pomocą 1 M NaOH, odwirowano i zdekantowano supernatant. Osad przemyto dwukrotnie wodą, zwirowano a roztwór z nad osadu połączono. Odparowano do jednej trzeciej objętości i oczyszczono za pomocą DEAE-Sephadex stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0,6 M), aby otrzymać produkt jako sól trietyloamoniową (113 mg, 0,45 mmol, 30% wydajności).

^1H NMR (500 MHz, D_2O , 25°C): δ 9,57 (bs, 1H), 9,31 (d, $J_{\text{H,H}}$ 6,3 Hz, 1H), 9,02 – 8,98 (m, 1H), 8,31 (dd, $J_{\text{H,H}}$ 6,3, 8,2 Hz, 1H), 6,22 (d, $J_{\text{H,H}}$ 5,5 Hz, 1H), 4,66 – 4,64 (m, 1H), 4,61 (t, $J_{\text{H,H}}$ 5,5 Hz, 1H), 4,47 (dd, $J_{\text{H,H}}$ 5,5, 2,6 Hz, 1H), 4,29 (ddd, $J_{\text{H,H}}$ 12,0, 4,3, 2,6, 1H), 4,12 (ddd, $J_{\text{H,H}}$ 12,0, 4,8, 2,1, 1H) ppm; **^{31}P NMR** (202 MHz, D_2O , 25°C): δ 1,84 (s, 1P) ppm.

6.1.2.2. Imidazolowa pochodna monofosforanu nikotynamidu (NMN-IM)

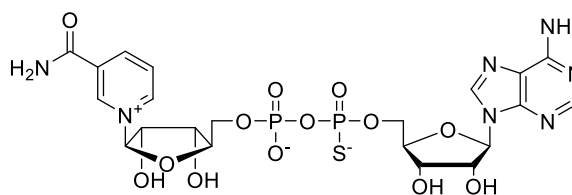


5'-monofosforan nikotynoamidu (319 mg, 0,730 mmol) zawieszono w DMSO (6 ml) i dodano imidazol (499 mg, 0,733 mmol, 10 ekwiw.), 2,2'-ditiopirydynę (484 mg, 2,20 mmol, 3 ekwiw.), trietyloaminę (309 μL , 2,20 mmol, 3 ekwiw.) oraz trifenylofosfinę (576 mg, 2,20 mmol, 3 ekwiw.). Reakcję mieszało w temperaturze pokojowej przez 1 h a następnie zahamowano przez dodanie zimnego roztworu nadchloranu sodu

(3 ekwiw.) w acetonie (60 ml). Powstały osad odwirowano i przemyto acetonem. Czynność powtarzano do momentu otrzymania klarownego supernatantu. Osad suszono nad P_2O_5 przez noc pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując oczekiwany produkt jako bładożółty proszek (180 mg, 0,220 mmol, 30% wydajności). Czystość produktu sprawdzono za pomocą RP HPLC (program 2) użyto w kolejnych reakcjach bez dalszej obróbki.

6.1.2.3. Synteza S_P i R_P 5'-[(P1-tio)difosfo-(nikotynamid β -d-rybofur-1'-an)] adenozyne (**NppsA**)

5'-tiofosforan adenozyne otrzymano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą⁹⁷ z pewnymi modyfikacjami. Adenozyne (100 mg, 370 μ mol) zawieszono w



fosforanie trimetylu (2 mL) w temperaturze 0 °C, dodano 2,6-dimetylopirydynę (73 μ l, 1,1 mmol, 3 ekwiw.). Po 5 min mieszania dodano $PSCl_3$ (127 mg, 0,83 mmol, 2 ekwiw.). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0 °C przez 3 h. Konwersję substratu w produkt monitorowano za pomocą analizy RP-HPLC (program 2.). Roztwór ogrzano do temperatury pokojowej i przelano do zimnego eteru dietylowego. Powstały osad wyizolowano przez dekantację i rozpuszczono w 20 ml wody. Mieszaninę oczyszczono za pomocą DEAE Sephadex (0 – 0,7 M TEAB), co pozwoliło wyizolować produkt w formie soli trietyloamoniowej (30 μ mol, 9% wydajności).

¹H NMR (500 MHz, D_2O , 25°C): δ 8,64 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 6,15 (d, $J_{H,H}$ 6,0 Hz, 1H), 4,86 – 4,76 (m, 1H), 4,54 (dd, $J_{H,H}$ 5,1, 3,5 Hz 1H), 4,42 – 4,39 (m, 1H), 4,16 – 4,12 (m, 2H) ppm; ³¹P NMR (202 MHz, D_2O , 25°C): δ 48,95 (s, 1P).

5'-tiofosforan adenozyne (48 mg, 94 μ mol, 1,1 ekwiw.), imidazolową pochodną monofosforanu nikotynoamidego (42 mg, 87 μ mol, 0,9 ekwiw.) oraz chlorek cynku (95 mg, 699 μ mol, 7,4 ekwiw.) zawieszono w DMF (1 ml). Reakcję mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 h. Postęp reakcji monitorowano za pomocą RP HPLC. Powstałe diastereoizomery, D1 i D2, oczyszczono i rozdzielono za pomocą półpreparatywnego RP HPLC (program 5).

Diastereoizomer 1 (D1): 99 mOD, 0,006 mmol, 6% wydajności,

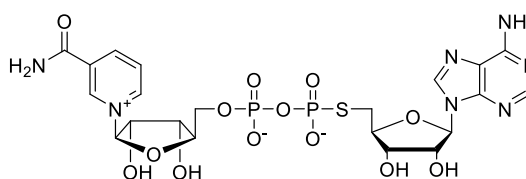
Diastereoizomer 2 (D2): 142 mOD, 0,008 mmol, 8% wydajności.

D1: ¹H NMR (500 MHz, D₂O, 25°C): δ 9,37 (bs, 1H), 9,21 (d, *J*_{H,H} 6,7 Hz, 1H), 8,89 – 8,84 (m, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,27 – 8,23 (m, 1H), 8,22 (s, 1H), 6,12 (d, *J*_{H,H} 5,7 Hz, 1H), 6,09 (d, *J*_{H,H} 5,8 Hz, 1H), 4,8 – 4,78 (bs, 1H), 4,61 – 4,57 (m, 2H), 4,53 (dd, *J*_{H,H} 5,2, 3,5 Hz, 1H), 4,51 (dd, *J*_{H,H} 5,1, 2,6 Hz, 1H), 4,42 – 4,37 (m, 2H), 4,29 – 4,23 (m, 3H) ppm;³¹ **P** NMR (202 MHz, D₂O, 25°C): δ 44,15 (dt, *J*_{P,P} 26,8, 6,3 Hz, 1P), -11,44 (dt, *J*_{P,P} 26,8, 4,4 Hz, 1P) ppm; **HR-MS (ESI, m/z)**: 678,07981 (obliczone dla C₂₁H₂₆N₇O₁₃P₂S⁻: 678,07900).

D2: ¹H NMR (500 MHz, D₂O, 25°C): δ 9,37 (bs, 1H), 9,23 (d, *J*_{H,H} 6,3 Hz, 1H), 8,86 (dt, *J*_{H,H} 8,1, 1,4 Hz, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,26 – 8,23 (m, 1H), 8,22 (s, 1H), 6,12 (d, *J*_{H,H} 5,7 Hz, 1H), 6,09 (d, *J*_{H,H} 5,9 Hz, 1H), 4,80 – 4,79 (bs, 1H), 4,60 – 4,56 (m, 2H), 4,53 (dd, *J*_{H,H} 5,0, 3,5 Hz, 1H), 4,49 (dd, *J*_{H,H} 5,0, 2,6 Hz, 1H), 4,47 – 4,39 (m, 2H), 4,32 – 4,23 (m, 3H) ppm;³¹ **P** NMR (202 MHz, D₂O, 25°C): δ 44,32 (dt, *J*_{P,P} 28,4, 6,3 Hz, 1P), -11,26 - -11,56 (m, 1P) ppm; **HR-MS (ESI, m/z)**: 678,07979 (obliczone dla C₂₁H₂₆N₇O₁₃P₂S⁻: 678,07900)

6.1.2.4. Synteza 5'-tio- 5'-[difosfo-(nikotynamid β-D-ribofuranos-1'-yl)] 5'-deoksyadenozyny (**Npp-5'S-A**)

Związek otrzymano zgodnie z procedurą opisaną w literaturze⁹⁸. Tiofosforan trietyloamoniowy (odparowany z acetonitrylu) (332,8 mg, 0,8 mmol, 2 ekwiw.)



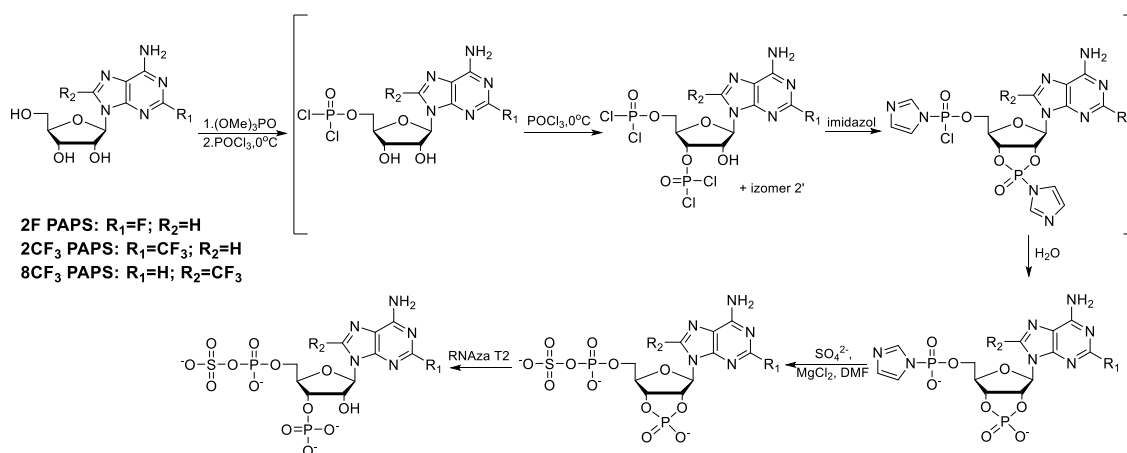
rozpuszczono w DMF (8 ml), a następnie dodano DBU (119,4 μl, 0,8 mmol, 2 ekwiw.). Po 5 min mieszania dodano 5'-deoksy-5'-jodoadenozynę¹²⁴ (422 mg, 0,4 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 h i oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej DEAE-Sephadex. Otrzymano 0,3 mmol produktu końcowego (65% wydajności).

Reakcję sprzęgania przeprowadzono według procedury ogólnej z użyciem 5'-deoksy-5'-monofosforanu 5'-tioadenozyny (21,3 mg, 50 μmol), imidazolowej pochodnej nukleotydu nikotynamidowego (37,5 mg, 50 μmol, 1 ekwiw.) i chlorku cynku (45,8 mg, 340 μmol, 7,4 ekwiw.) w DMF (1 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 h. Reakcję monitorowano za pomocą RP HPLC i zakończono przez dodanie roztworu równomolowej ilości EDTA w 10 ml wody i doprowadzono do pH 7 za pomocą wodorowęglanu sodu. Oczyszczanie

przeprowadzono kolejno za pomocą DEAE Sephadex stosując liniowy gradient 0-0,4 M TEAB, a następnie półpreparatywnego RP HPLC (3,9 μ mol, 8% wydajności).

^1H NMR (500 MHz, D_2O , 25°C): δ 9,37 (bs, 1H), 9,24 (d, $J_{\text{H,H}}$ 6,3 Hz, 1H), 8,86 (bd, $J_{\text{H,H}}$ 8,1 Hz, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,24 (dd, $J_{\text{H,H}}$ 8,1, 6,3 Hz, 1H), 8,22 (s, 1H), 6,14 (d, $J_{\text{H,H}}$ 5,5 Hz, 1H), 6,02 (d, $J_{\text{H,H}}$ 5,8 Hz, 1H), 4,84 – 4,81 (bs, 1H), 4,62 – 4,59 (m, 1H), 4,54 (dd, $J_{\text{H,H}}$ 5,2, 5,4 Hz, 1H), 4,49 – 4,45 (m, 2H), 4,43 – 4,38 (m, 2H), 4,30 – 4,25 (m, 1H), 3,36 – 3,27 (m, 1H), 3,27 – 3,18 (m, 1H) ppm;³¹ **P NMR** (202 MHz, D_2O , 25°C): δ 8,49 (dt, $J_{\text{P,P}}$ 28,7, 12,8 Hz, 1P), -11,29 (d, $J_{\text{P,P}}$ 28,7, 1P) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 678,07961 (obliczone dla $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}^-$: 678,07900)

6.1.3. OTRZYMYWANIE ANALOGÓW PAPS

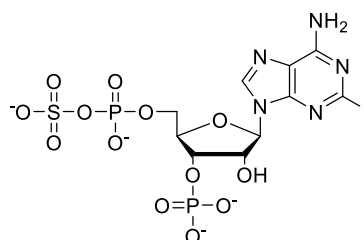


Procedura ogólna: Do roztworu nukleozydu (1 ekwiw.) w fosforanie trimetylu (0,2 – 0,5 M) dodano POCl_3 (3 ekwiw.). Reakcję prowadzono w temperaturze 0°C (łaznia lodowa) i mieszano przez 1-3 h. Postęp reakcji analizowano za pomocą RP HPLC. Po stwierdzeniu całkowitej konwersji w produkt dodano drugą porcję POCl_3 (6 ekwiw.). Mieszaninę pozostawiono na noc w 0°C i pozwolono ogrzać się do 24°C , a następnie przelano do zimnego eteru dietylowego, w celu wytrącenia nukleotydu i odwirowano. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w fosforanie trimetylu. Następnie dodano imidazol (54 ekwiw.). Po 1 h reakcję zahamowano dodając wodę (10 x obj.) i oczyszczono za pomocą DEAE-Sephadex stosując liniowy gradient TEAB, aby otrzymać produkt w postaci roztworu soli trietyloamoniowej. Tak otrzymaną imidazolową pochodną nukleotydu przechowywano w temp -20°C . W celu użycia w reakcji sprzęgania produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (1 ml). Do rozpuszczonego w DMF (lub DMSO) produktu dodawano siarczanu bis(tributyloamoniowego) (4 ekwiw.) (lub podjednostki fosforanowej (3 ekwiw.)) oraz

MgCl₂ (8 ekwiw.) (lub ZnCl₂ (4 ekwiw.)). Produkt reakcji sprzęgania oczyszczano za pomocą złoża DEAE-Sephadex a następnie metodą RP HPLC. Ostatni etap syntezy stanowiło rozcinanie enzymatyczne (10 mg/ml) z użyciem RNAzy T2 (750 U, 5 µL/10 mg, MoBiTec) w 50 mM buforze octanu amonu, pH 7.3. Mieszaninę reakcyjną umieszczano w termomiksie w temperaturze 37°C, 300 rpm. Postęp reakcji monitorowano za pomocą RP HPLC. Po 24 h reakcję przefiltrowano przez 10 K Amicon Ultra-0,5 mL Centrifugal Filters. Pozostały na filtrze roztwór białka odrzucono, a przesącz wykorzystano jako roztwór podstawowy do eksperymentów NMR (odzysk większy niż 90%).

6.1.3.1. Synteza 5'-fosfosiarczan-3'-fosfo-2-(fluoro) adenozyiny (**2-F-PAPS**).

Do roztworu 2-fluoroadenozyiny (110 mg, 0,39 mmol) w fosforanie trimetylu (2 ml) dodano POCl₃ (177 mg, 1,16 mmol, 3 ekwiw.). Po 3 h dodano drugą porcję POCl₃ (354 mg, 2,31 mmol, 6 ekwiw.). Mieszaninę pozostawiono na noc w 0°C i pozwolono ogrzać się do 24°C, a następnie



przelano do zimnego eteru dietylowego i odwirowano. Supernatant odrzucono, a osad rozcieńczono w fosforanie trimetylu (2 ml). Po tym czasie dodano imidazol (1414 mg, 20,80 mmol, 54 ekwiw.). Produkt oczyszczono za pomocą DEAE-Sephadex stosując liniowy gradient TEAB (0-0,8 M). Wydajność końcowa: 28%.

Następnie 5'-fosfoimidazolid 2',3'-cyklofosfo-2-fluoro adenozyiny (63 mg, 0,11 mmol) i siarczan bis(tributyloamoniowy) (204 mg, 0,43 mmol, 4 ekwiw.) zawieszono w DMF (2 ml) i dodano MgCl₂ (86 mg, 0,90 mmol, 8 ekwiw.). 5'-fosfosiarczan-2',3'-cyklofosfo-2-(fluoro) adenozyiny został oczyszczony za pomocą DEAE-Sephadex (wydajność: 1189 mOD, 0,08 mmol, 72%), a następnie za pomocą półpreparatywnego RP HPLC (program 6). Wydajność końcowa: 28 mg, 0,01 mmol, 37%. Oczyszczony produkt poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-fosfosiarczan 2',3'-cyklofosfo-2-fluoro adenozyiny:

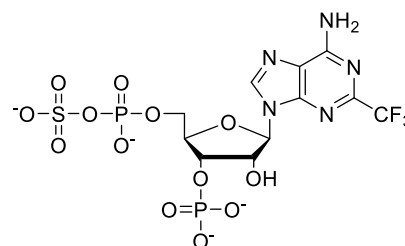
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,36 (s, 1H), 6,23 (d, *J*_{H,H} 4,2 Hz, 1H), 5,41 (ddd, *J*_{H,H} 4,3, 6,7, 11,0 Hz, 1H), 5,27 – 5,20 (m, 1H), 4,66- 4,61 (m, 1H), 4,31 – 4,23 (m, 2H) ppm,
³¹P NMR (202 MHz, D₂O): δ 20,50 (d, *J*_{P,H} 7,4, 11,0 Hz, 1P), -9,98 - -10,15 (m, 1P) ppm,
¹⁹F NMR (471 MHz, D₂O): δ – 52,46 (s, 1F) ppm.

5'-fosfosiarczan 3'-fosfo-2-fluoro adenozyne:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,49 (s, 1H), 6,05 (d, $J_{H,H}$ 6,9 Hz, 1H), 4,85 – 4,72 (m, nakładanie się z D₂O, 2H), 4,60 – 4,57 (m, 1H), 4,29 – 4,20 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 3,64 – 3,29 (m, 1H), -9,57 - -9,82 (m, 1P) ppm, **¹⁹F NMR** (471 MHz, D₂O): δ – 52,95 (s, 1F) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 523,96991 (obliczone dla C₁₀H₁₃FN₅O₁₃P₂S⁻ [M-H]⁻: 523,96953).

6.1.3.2. Synteza 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfo-2-(trifluorometylo)adenozyne (2-CF₃-PAPS).

Do roztworu 2-(trifluorometylo)adenozyne (49 mg, 0,15 mmol) w fosforanie trimetylu (1 ml), zawierającego 2,6-lutydynę (47 mg, 0,44 mmol, 3 ekwiw.), dodano POCl₃ (67 mg, 0,44 mmol, 3 ekwiw.)



w temperaturze -5°C i mieszano przez 4 h. Po tym czasie dodano drugą porcję POCl₃ (134 mg, 0,87 mmol, 6 ekwiw.). Mieszaninę pozostawiono na noc w - 5°C, a następnie przelano do zimnego eteru dietylowego i odwirowano. Do osadu rozcieńczonego w fosforanie trimetylu (2 ml), dodano nadmiar imidazolu (534 mg, 7,85 mmol, 54 ekwiw.). Reakcję zakończono 10 objętościami wody po 1 h i oczyszczono za pomocą DEAE-Sephadex stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0,8 M). Wydajność końcowa: 163 mOD, 0,02 mmol, 11%.

W następnym etapie do 2',3'-cyklofosfo-2-trifluorometylo adenozyne 5'-fosfoimidazolidu (10 mg, 0,02 mmol) rozpuszczonym w DMF (0,5 ml) dodano siarczanu bis(tributyloamoniowego) (17 mg, 0,04 mmol, 2 ekwiw.) oraz MgCl₂ (16 mg, 0,17 mmol, 11 ekwiw.). 5'-fosfosiarczanu 2',3'-cyklofosfo-2-(trifluorometylo) adenozyne oczyszczono przez DEAE-Sephadex (wydajność: 68 mOD, 6,4 μmol, 42%), a następnie przez półpreparatywną RP HPLC (program 7). Wydajność końcowa: 1,2 mg, 1,7 μmol, 27%. Oczyszczony produkt poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-fosfosiarczanu 2',3'-cyklofosfo-2-(trifluorometylo) adenozyne:

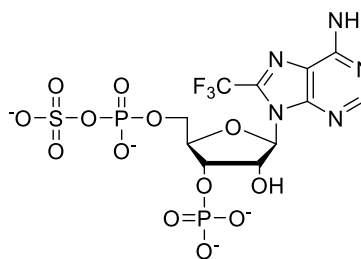
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,56 (s, 1H), 6,44 (d, $J_{H,H}$ 3,9 Hz, 1H), 5,49 (ddd, $J_{H,H}$ 3,9, 6,6, 10,4 Hz, 1H), 5,31 (ddd, $J_{H,H}$ 3,6, 6,6, 8,0 Hz, 1H), 4,71 – 4,64 (m, 1H), 4,30 – 4,25 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 20,55 (dd, $J_{P,P}$ 8,0, 10,4 Hz, 1P), -9,85 - -10,14 (m, 1P) ppm, **¹⁹F NMR** (471 MHz, D₂O): δ – 69,28 (s, 3F) ppm.

5'-fosfosiarczanu 3'-fosfo-2-(trifluorometylo)adenozyny:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,68 (s, 1H), 6,27 (d, *J*_{H,H} 6,7 Hz, 1H), 4,89 – 4,82 (m, 2H), 4,64 – 4,60 (m, 1H), 4,29 – 4,25 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 1,87 – 1,16 (m, 1P), -9,61 - -10,17 (m, 1P) ppm, **¹⁹F NMR** (471 MHz, D₂O): δ - 69,24 (s, 3F) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 573,96687 (obliczone dla C₁₁H₁₃F₃N₅O₁₃P₂S⁻ [M-H]⁻: 573,96634).

6.1.3.3. Synteza 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfo-8-(trifluorometylo) adenozy (8-CF₃-PAPS).

Do roztworu 8-(trifluorometylo) adenozy (101 mg, 0,30 mmol) w fosforanie trimetylu (2 ml) i 2,6-lutydyny (96 mg, 0,90 mmol, 3 ekwiw.) dodano POCl₃ (138 mg, 0,90 mmol, 3 ekwiw.) w 0°C i mieszano przez 3 h. Po tym czasie dodano drugą porcję POCl₃ (276 mg, 1,80 mmol, 6 ekwiw.). Mieszaninę pozostawiono na noc w 0°C i pozwolono ogrzać się do 24°C, a następnie przelano do zimnego eteru dietylowego i odwirowano. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w fosforanie trimetylu (2 ml), po czym dodano imidazol (1101 mg, 16,20 mmol, 54 ekwiw.). Po 1 h reakcję zahamowano 10 objętościami wody i oczyszczono przez DEAE-Sephadex stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0.8 M), aby otrzymać produkt jako sól trietyloamoniową (495 mOD, 0,04 mmol, 14% wydajności). Otrzymany produkt odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem w obecności DMF (1ml). Następnie do roztworu 2',3'-cyklofosfo-8-trifluorometylo adenozy 5'-fosfoimidazolidu (27 mg, 0,04 mmol) w DMF (2 ml) dodano siarczan bis(tributyloamoniowy) (83 mg, 0,18 mmol, 4 ekwiw.) oraz MgCl₂ (33 mg, 0,35 mmol, 8 ekwiw.). 2'3'-cyklofosfo-8-(trifluorometylo) adenozy-5'-fosforan został oczyszczony przez DEAE-Sephadex (wydajność: 278 mOD, 0,02 mmol, 56%), a następnie za pomocą półpreparatywnej RP HPLC (program 7). Wydajność końcowa: 7 mg, 0,01 mmol, 43%. Oczyszczony produkt poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.



5'-fosfosiarczan 2',3'-cyklofosfo-8-(trifluorometylo) adenozy:

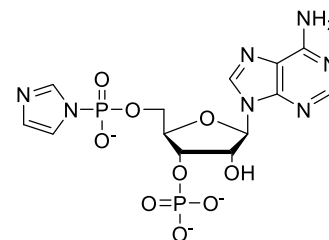
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,37 (s, 1H), 6,41 (d, *J*_{H,H} 3,0 Hz, 1H), 5,81 – 5,75 (m, 1H), 5,39 (ddd, *J*_{H,H} 5,3, 7,1, 12,1 Hz, 1H), 4,57 – 4,53 (m, 1H), 4,34 – 4,18 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 21,18 (dd, *J*_{P,H} 7,1, 12,1 Hz, 1P), -9,89 (t, *J*_{P,H} 6,2 Hz, 12,5, 1P) ppm, **¹⁹F NMR** (471 MHz, D₂O): δ - 61,74 (s, 3F) ppm.

5'-fosfosiarczan 3'-fosfo-8-(trifluorometylo)adenozyny:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,38 (s, 1H), 6,13 (d, $J_{H,H}$ 6,1 Hz, 1H), 5,50 (t, $J_{H,H}$ 6,1 Hz, 1H), 5,01 – 4,95 (m, 1H), 4,56 – 4,51 (m, 1H), 4,42 – 4,28 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 1,04 (d, $J_{P,H}$ 8,8 Hz, 1P), -9,89 (t, $J_{P,H}$ 6,2 Hz, 12,5, 1P) ppm, **¹⁹F NMR** (471 MHz, D₂O): δ -61,24 (s, 3F) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 573,96678 (obliczone dla C₁₁H₁₃F₃N₅O₁₃P₂S⁻ [M-H]⁻: 573,96634).

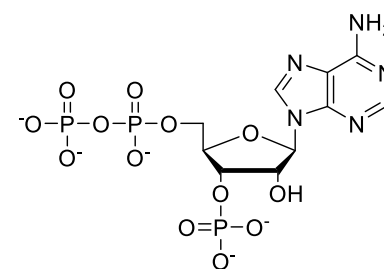
6.1.3.4. Synteza imidazolidu 5'-fosforanu -2', 3'-cyklofosfo adenozyne (**cPAP-Im**)

Adenozyne (324 mg; 1,2 mmol) zawieszono w fosforanie trimetylu (6 ml), następnie dodano pierwszą porcję POCl₃ (558 mg; 3,64 mmol; 3 ekwiw.). Reakcję prowadzono temperaturze 0°C (łaznia lodowa) przez 1 h. Po tym czasie dodano kolejną porcję POCl₃ (1116 mg; 7,28 mmol; 6 ekwiw.). Postęp reakcji badano za pomocą RP HPLC (program 2). Po 24 h i stwierdzeniu całkowitej konwersji substratu mieszaninę reakcyjną wylano na zimny eter dietylowy. Zaobserwowano powstawanie białego osadu, który następnie, po odwirowaniu, rozpuszczono w fosforanie trimetylu (7 ml) i dodano nadmiar imidazolu (4461,0 mg; 65,53 mmol; 54 ekwiw.). Reakcję zakończono dodając 10 – krotny nadmiar wody a następnie oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,6 M bufor TEAB). Produkt otrzymano w formie roztworu soli trietyloamoniowej z wydajnością 3325 mOD, 0,22 mmol, W=18%. Przechowywano w - 20°C.



6.1.3.5. Synteza 5'-difosforanu -3'-fosfoadenozyne (**PAPP**)

Roztwór cPAP-Im (167 μmol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (2 ml). Do roztworu dodano fosforan trietyloaminy (124,5 mg, 502 μmol, 3 ekwiw.) oraz ZnCl₂ (182,0 mg, 1,34 mmol, 8 ekwiw.). Reakcję zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem ZnCl₂) i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,2 M bufor TEAB). Wydajność: 79 mg, 80 μmol, 48%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 4) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.



5'-difosforan -2' 3'-cyklofosfo adenozyne:

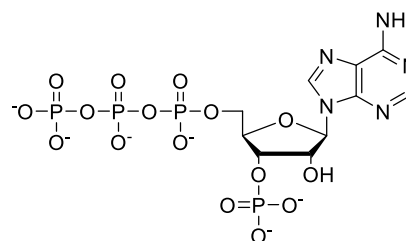
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,49 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 6,36 (d, $J_{H,H}$ 4,0 Hz, 1H), 5,44 (ddd, $J_{H,H}$ 10,9, 6,7, 4,1 Hz, 1H), 5,30 – 5,23 (m, 1H), 4,69 – 4,64 (m, 1H), 4,28 – 4,23 (m, 2H)ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 20,63 (dd, $J_{P,H}$ 11,1, 7,3 Hz, 1P), -7,86 - - 11,13 (m, 2P) ppm; **HR-MS (ESI, m/z)**: 487,97835 (obliczone dla C₁₀H₁₃N₅O₁₂P₃⁻ [M-H]⁻: 487,97790).

5'-difosforan -3'-fosfo adenozyiny:

HR-MS (ESI, m/z): 505,98894 (obliczone dla C₁₀H₁₄N₅O₁₀P₂⁻ [M-H]⁻: 505,98847).

6.1.3.6. Synteza 5'-trifosforanu -3'-fosfoadenozyiny (PAPPP)

cPAP-Im (130 μ mol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (2 ml). Do roztworu dodano pirofosforan trietyloaminy (144 mg, 378 μ mol, 3 ekwiw.) oraz ZnCl₂ (138,2 mg, 1,0 mmol, 8 ekwiw.).



Reakcję prowadzono przez 20 h a następnie zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem ZnCl₂) i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,2 M bufor TEAB). Wydajność końcowa: 82 μ mol, 63%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (wydajność: 38,1 mg, 51 μ mol, 39%) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-trifosforan -2' 3'-cyklofosfo adenozyiny:

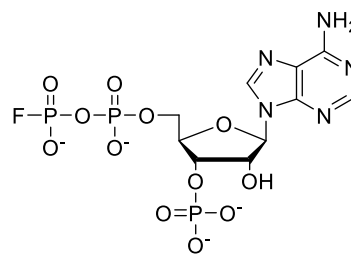
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,38 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,29 (d, $J_{H,H}$ 4,3 Hz, 1H), 5,43 (ddd, $J_{H,H}$ 4,3, 6,7, 11,0 Hz, 1H), 5,27 – 5,22 (m, 1H), 4,65 – 4,59 (m, 1H), 4,31 – 4,25 (m, 2H)ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 20,76 (dd, $J_{P,P}$ 7,5, 11,0 Hz, 1P), -7,07 (d, $J_{P,P}$ 19,7 Hz, 1P), -10,40 (d, $J_{P,P}$ 19,3, 5,7 Hz, 1P), -21,33 (dd, $J_{P,P}$ 19,7, 19,3 Hz, 1P) ppm; **HR-MS (ESI, m/z)**: 567,94488 (obliczone dla C₁₀H₁₄N₅O₁₅P₄⁻ [M-H]⁻: 567,94423).

5'-trifosforan -3'-fosfo adenozyiny:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,58 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 6,18 (d, $J_{H,H}$ 5,9 Hz, 1H), 4,90 – 4,85 (m, 1H), 4,82 – 4,78 (m, nakładanie się z D₂O, 1H), 4,64 – 4,58 (m, 1H), 4,34 – 4,22 (m, 2H), 4,31 – 4,25 (m, 2H)ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 1,09 – 0,92 (m, 1P), -8,63 (d, $J_{P,P}$ 17,3 Hz, 1P), -10,27 (d, $J_{P,P}$ 18,6, 1P), -21,00 - -21,37 (m, 1P)ppm; **HR-MS (ESI, m/z)**: 585,95546 (obliczone dla C₁₀H₁₆N₅O₁₆P₄⁻ [M-H]⁻: 585,95480).

6.1.3.7. Synteza 5'-fluoro difosforanu -3'-fosfoadenozyny (**PAPPF**)

cPAP-Im (0,17 mmol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (2 ml). Do roztworu dodano sól trietyloamonową fluorofosforanu (126,0 mg, 0,50 mmol, 3 ekwiw.) oraz ZnCl_2 (182,0 mg, 1,34 mmol, 8 ekwiw.). Reakcję prowadzono przez 18 h a następnie



zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem ZnCl_2) i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO_3 . Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 0,10 mmol, 60%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 4) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-fluoro difosforan – 3', 2'-cyklofosfo adenozyne:

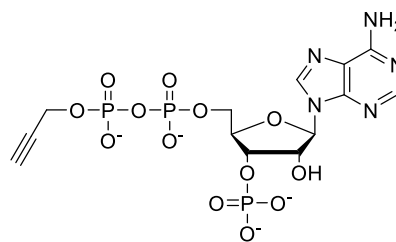
^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 8,42 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 6,37 (d, $J_{\text{H,H}}$ 4,1 Hz, 1H), 5,50 – 5,42 (m, 1H), 5,28 – 5,21 (m, 1H), 4,68 – 4,64 (m, 1H), 4,30 – 4,22 (m, 2H) ppm, **^{31}P NMR** (162 MHz, D_2O): δ 20,62 (dd, $J_{\text{P,P}}$ 7,4, 11,0 Hz, 1P), -10,65 – -10,92 (m, 1P), -17,04 (dd, $J_{\text{P,P}}$ 19,7, 934,4 Hz, 1P) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 489,97393 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{O}_{11}\text{P}_3^-$ $[\text{M-H}]^-$: 489,97357).

5'-fluoro difosforan - 3'-fosfo adenozyne:

^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 8,55 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 6,21 (d, $J_{\text{H,H}}$ 6,6 Hz, 1H), 4,91 – 4,82 (m, 2H), 4,64 – 4,59 (m, 1H), 4,28 – 4,23 (m, 2H) ppm, **^{31}P NMR** (202 MHz, D_2O): δ 1,17 – 0,48 (m, 1P), -10,39 – -10,74 (m, 1P), -14,45 – 19,43 (m, 1P) ppm, **^{19}F NMR** (471 MHz, D_2O): δ -73,61 (d, $J_{\text{F,P}}$ 933,9 Hz, 1F) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 507,98449 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{O}_{12}\text{P}_3^-$ $[\text{M-H}]^-$: 507,98413).

6.1.3.8. Synteza 5'-difosforanu propargilu, 3'-fosfoadenozyny (**PAPP-prop**)

Roztwór cPAP-Im (60 μmol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (2 ml). Do roztworu dodano fosforan propargilu (41,6 mg, 177 μmol , 3 ekwiw.) oraz MgCl_2 (44,8 mg, 472 μmol , 8 ekwiw.). Reakcję prowadzono przez 20 h a następnie



zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem ZnCl_2) i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO_3 . Otrzymany produkt

oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 30 μmol , 52%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 5) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-difosforan propargilu – 3', 2'-cyklofosfo adenozyne:

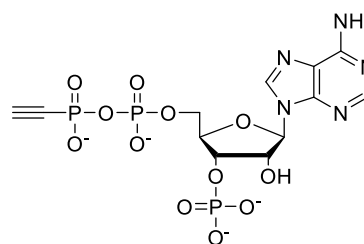
^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 8,43 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 6,37 (d, $J_{\text{H,H}}$ 4,1 Hz, 1H), 5,51 – 5,44 (m, 1H), 5,29 – 5,23 (m, 1H), 4,66 – 4,61 (m, 1H), 4,49 – 4,44 (m, 2H), 4,28 – 4,23 (m, 2H)ppm, **^{31}P NMR** (162 MHz, D_2O): δ 20,70 (dd, $J_{\text{P,P}}$ 10,8, 7,7 Hz, 1P), -10,53 – -10,79 (m, 2P) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 525,99406 (obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}_3^-$ $[\text{M-H}]^-$: 525,99355).

5'-difosforan propargilu – 3'-fosfo adenozyne:

HR-MS (ESI, m/z): 544,00474 (obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3^-$ $[\text{M-H}]^-$: 544,00412).

6.1.3.9. Synteza 5'-fosforanu-C-fosfonianu etynyłu, 3'-fosfoadenozyne (**PAPPCCH**)

Do kolby z rozpuszczonym w DMF (1 ml) C-fosfonianem etynyłu (11,7 mg, 563 μmol , 4 ekwiw.) oraz MgCl_2 (53,5 mg, 563 μmol , 4 ekwiw.) dodano uprzednio



odparowany pod zmniejszonym ciśnieniem (z dodatkiem 1 ml DMF) cPAP-Im (141 μmol). Reakcję prowadzono przez 24 h a następnie zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem ZnCl_2) i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO_3 . Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 60 μmol , 36%. Cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 5) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-fosforan-C-fosfonian etynyłu, 2, 3'-cyklofosfoadenozyne:

^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 8,44 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 6,37 (d, $J_{\text{H,H}}$ 4,2 Hz, 1H), 5,46 (ddd, $J_{\text{H,H}}$ 11,1, 6,7, 4,1 Hz, 1H), 5,30 – 5,24 (m, 1H), 4,69 – 4,64 (m, 1H), 4,31 – 4,24 (m, 2H)ppm, **^{31}P NMR** (202 MHz, D_2O): δ 20,67 (dd, $J_{\text{P,H}}$ 11,2, 7,4 Hz, 1P), -11,08 – -11,35 (m, 1P), -20,98 (dd, $J_{\text{P,P}}$ 22,2, 12,4 Hz, 1P) ppm. **HR-MS (ESI, m/z)**: 495,98262 (obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_3^-$ $[\text{M-H}]^-$: 495,98299).

5'-fosforan-C-fosfonian etynyłu, 3'-fosfoadenozyne:

HR-MS (ESI, m/z): 513,99379 (obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}_3^-$ $[\text{M-H}]^-$: 513,99355).

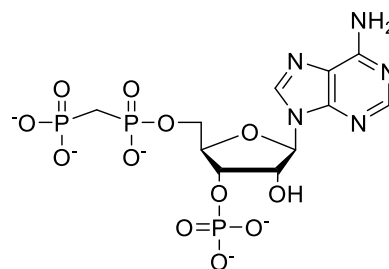
6.1.3.10. Synteza 5'-metyleno bis-fosfonian 3'-fosfoadenozyny(PAPCH₂P)

Adenozyne (214 mg, 0,8 mmol) rozpuszczono w formamidzie (40 ml) i dodano KH₂PO₄ (0,1M).

Reakcję prowadzono w łaźni olejowej w 140°C przez 12 h a następnie w temperaturze pokojowej przez 12 h.

Reakcję oczyszczono metodą chromatografii

jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,6 M bufor TEAB). Produkt odparowano a następnie zliofilizowano. Wydajność końcowa: 160,0 mg, 0,33 mmol, 28%.



2,3'-cyklofosfoadenozyna:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,30 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 6,27 (d, J_{H,H} 4,3 Hz, 1H), 5,46 (ddd, J_{H,H} 10,7, 6,8, 4,3 Hz, 1H), 5,18 – 5,11 (m, 1H), 4,49 (q, J_{H,H} 3,9 Hz, 1H), 3,94 (dd, J_{H,H} 12,7, 3,9 Hz, 1H), 3,88 (dd, J_{H,H} 12,7, 4,3 Hz, 1H)ppm, ³¹P NMR (202 MHz, D₂O): δ 20,98 – 20,83 (m, 1P) ppm.

2,3'-cyklofosfo adenozyne (250 mg, 0,58 mmol) zawieszono w PO(OCH₃)₃ (5 ml) a następnie dodano 5 μl TEA. Reakcję umieszczono w łaźni lodowej (temp. 0°C). Po całkowitym rozpuszczeniu substratu dodano bis-dichlorofosforan metylu (1,75 mmol, 3 ekwiw.). Reakcję prowadzono przez 20 h a następnie zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem ZnCl₂)i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,5 M bufor TEAB). Wydajność: 32 μmol, 6%.

5'-metyleno bis-fosfonian 2,3'-cyklofosfoadenozyny:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,60 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 6,41 (d, J_{H,H} 3,7 Hz, 1H), 5,50 (ddd, J_{H,H} 10,4, 6,6, 3,7 Hz, 1H), 5,32 – 5,25 (m, 1 H), 4,70 – 4,66 (m, 1 H), 4,27 – 4,17 (m, 2 H)ppm, ³¹P NMR (202 MHz, D₂O): δ 20,59 (dd, J_{P,P} 10,7, 8,2 Hz, 1P), 19,22 – 18,81 (m, 1 P), 16,45 – 15,95 (m, 1 P)ppm. HR-MS (ESI, m/z): 485,99932 (obliczone dla C₁₁H₁₅N₅O₁₁P₃⁻[M-H]⁻: 485,99864).

5'-metyleno bis-fosfonian 3'-fosfoadenozyny:

HR-MS (ESI, m/z): 504,00951 (obliczone dla C₁₁H₁₇N₅O₁₂P₃⁻[M-H]⁻: 504,00920).

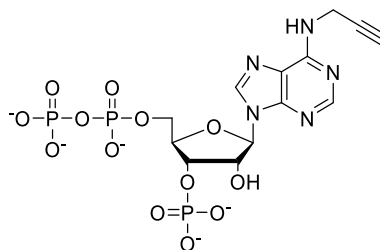
Procedura ogólna otrzymywania nukleotydów modyfikowanych na zasadach:

6- lub 2- chloropurynorybozyd (1 ekwiw.) zawieszono w H₂O (lub DMSO w przypadku modyfikacji C2), następnie dodano linker (propargiloaminę, 1-amino-2-azydo etyl lub 8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) (10 ekwiw.). Reakcję prowadzono odpowiednio przez 1 h lub 48 h . Postęp reakcji badano za pomocą RP HPLC. Produkt oczyszczono

metodą chromatografii żelowej (DCM : MeOH 9:1). Dalsze etapy reakcji prowadzono zgodnie z procedurą otrzymywania analogów PAPS (6.1.3. Otrzymywanie analogów PAPS) lub PAP (6.1.4. Synteza analogów PAP).

6.1.3.11. Synteza 5'-difosforanu -3'-fosfo-6-(propargilamino) adenozyne (N6-prop-PAPP)

Reakcję prowadzono w 0°C. 6-(propargilamino) adenozyne (12 mg, 40 µmol) zawieszono w PO(OMe)₃ (2 ml) a następnie dodano destylowany POCl₃ (18 mg, 121 µmol, 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 3). Po zaobserwowaniu całkowitej



konwersji do monofosforanu (ok. 3 h) dodano kolejną porcję POCl₃ (37 mg, 242 µmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w PO(OMe)₃ i dodano imidazol (148 mg, 2,178 mmol, 54 ekwiw.), mieszano przez 1 h a następnie zakończono 10 – krotnym nadmiarem wody. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,8 M bufor TEAB). Wydajność: 20 µmol, W=50%.

Roztwór N6-propargilo cPAP-Im (20 µmol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (1 ml). Do roztworu dodano fosforan trietyloaminy (15 mg, 60 µmol, 3 ekwiw.) oraz ZnCl₂ (11 mg, 80 µmol, 4 ekwiw.). Reakcję analizowano metodą RP HPLC (program 3). Po stwierdzeniu konwersji w produkt zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem ZnCl₂) i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 13 µmol, 63%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 5) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-difosforan -2',3'-cyklofosfo-6-(propargilamino) adenozyne:

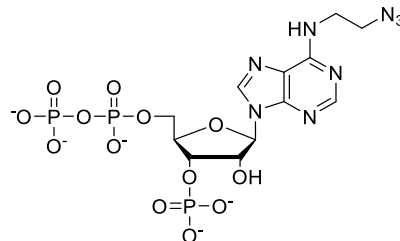
¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 8,47 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 6,38 (d, J_{H,H} 4,1 Hz, 1H), 5,46 (ddd, J_{H,H} 11,1, 6,7, 4,2 Hz, 1H), 5,31– 5,22 (m, 1H), 4,70 – 4,62 (m, 1H), 4,40 (bs, 1H), 4,25 (dd, J_{H,H} 5,2, 3,5 Hz, 2H), 2,63 (t, J_{H,H} 2,5 Hz, 1H) ppm, ³¹P NMR (162 MHz, D₂O): δ 19,63 (dd, J_{P,P} 11,5, 7,0 Hz, 1P), -10,89 (d, J_{P,P} 20,9 Hz, 1P), -11,49– -11,74 (m, 1P) ppm; HR-MS (ESI, m/z): 525,99407 (obliczone dla C₁₃H₁₆N₈O₁₂P₃⁻ [M-H]⁻: 525,99355).

5'-difosforan -3'-fosfo-6-(propargilamino) adenozyne:

MS (ESI, m/z): 544,1 (obliczone dla $C_{13}H_{17}N_5O_{13}P_3^-$ [M-H]⁻: 544,0).

6.1.3.12. Synteza 5'-difosforanu -3'-fosfo-6-(1-amino-2-azydo etyl) adenozynty
(N6-AE-PAPP)

Związek otrzymany przez studentkę Oktawię Wawrzyniec pod moją opieką. Reakcję prowadzono w 0°C. 6-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (100 mg, 0,3 mmol) zawieszono w PO(OMe)₃ (2 ml) a następnie dodano destylowany POCl₃ (138 mg, 0,9



mmol, 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 3). Po zaobserwowaniu całkowitej konwersji do monofosforanu (ok. 3 h) dodano kolejną porcję POCl₃ (276 mg, 1,8 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w PO(OMe)₃ i dodano imidazol (1103 mg, 16,2 mmol, 54 ekwiw.), mieszano przez 1 h a następnie zakończono 10 – krotnym nadmiarem wody. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,8 M bufor TEAB). Wydajność: 102 μmol, W=34%. Roztwór N6-AE-cPAP-Im (73 μmol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (2 ml). Do roztworu dodano fosforan trietyloaminy (58 mg, 292 μmol, 4 ekwiw.) oraz ZnCl₂ (40 mg, 292 μmol, 4 ekwiw.). Reakcję analizowano metodą RP HPLC (program 3). Po stwierdzeniu konwersji w produkt zakończono równo molowym, wodnym roztworem EDTA (10-krotny nadmiar) i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 23 mg, 30 μmol, 41%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 5) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-difosforan -2',3'-cyklofosfo-6-(1-amino-2-azydo etyl) adenozynta:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,46 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 6,38 (d, *J*_{H,H} 4,2 Hz, 1H), 5,46 (ddd, *J*_{H,H} 11,5, 6,6, 4,2 Hz, 1H), 5,30– 5,23 (m, 1H), 4,69 – 4,64 (m, 1H), 4,26 (dd, *J*_{H,H} 5,2, 3,4 Hz, 2H), 3,85 (bs, 2H), 3,66 (dd, *J*_{H,H} 6,2, 5,0 Hz, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 19,71 (dd, *J*_{P,P} 11,5, 7,0 Hz, 1P), -10,79 (d, *J*_{P,P} 20,9 Hz, 1P), -11,51 (d, *J*_{P,P} 20,9 Hz, 1P) ppm; **HR-MS (ESI, m/z):** 557,00977 (obliczone dla $C_{12}H_{16}N_8O_{12}P_3^-$ [M-H]⁻: 557,01060).

5'-difosforan -3'-fosfo-6-(1-amino-2-azydo etyl) adenozynta:

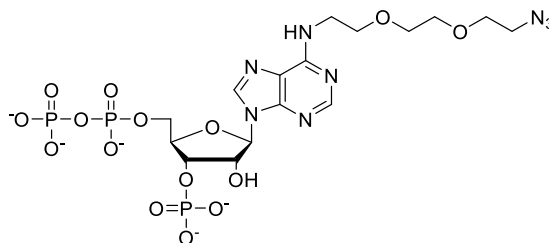
HR-MS (ESI, m/z): 575,02126 (obliczone dla $C_{12}H_{18}N_8O_{13}P_3^-$ $[M-H]^-$: 575,02117).

6.1.3.13. Synteza 5'-difosforanu -3'-fosfo-6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny (**N6-PEG-PAPP**)

Związek otrzymany przez studentkę Oktawię Wawrzyniec pod moją opieką.

Reakcję prowadzono w 0°C. 6-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyinę (150 mg, 0,4 mmol)

zawieszono w $PO(OMe)_3$ (3 ml) a



następnie dodano destylowany $POCl_3$ (161 mg, 1,2 mmol, 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 3). Po zaobserwowaniu całkowitej konwersji do monofosforanu (ok. 3 h) dodano kolejną porcję $POCl_3$ (322 mg, 2,4 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w $PO(OMe)_3$ i dodano imidazol (1287 mg, 18,9 mmol, 54 ekwiw.), mieszano przez 1 h a następnie zakończono 10 – krotnym nadmiarem wody. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,8 M bufor TEAB). Wydajność: 122 μ mol, W=35%.

Roztwór N6-PEG-cPAP-Im (122 μ mol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (2 ml). Do roztworu dodano fosforan trietyloaminy (97 mg, 488 μ mol, 4 ekwiw.) oraz $ZnCl_2$ (66 mg, 488 μ mol, 4 ekwiw.). Reakcję analizowano metodą RP HPLC (program 3). Po stwierdzeniu konwersji w produkt zakończono równo molowym, wodnym roztworem EDTA (10-krotny nadmiar) i doprowadzono do pH 7 za pomocą $NaHCO_3$. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 38 mg, 45 μ mol, 37%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 5) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-difosforan -2',3'-cyklofosfo-6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny:

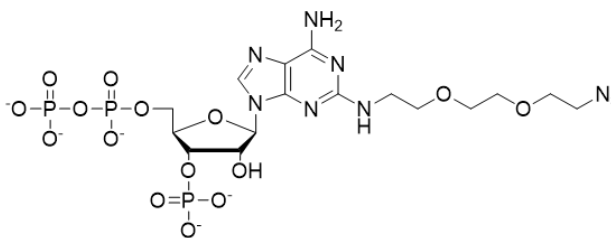
1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 8,47 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 6,38 (d, $J_{H,H}$ 4,2 Hz, 1H), 5,46 (ddd, $J_{H,H}$ 11,1, 6,6, 4,2 Hz, 1H), 5,30– 5,23 (m, 1H), 4,69 – 4,64 (m, 1H), 4,25 (dd, $J_{H,H}$ 5,2, 3,4 Hz, 2H), 3,87 – 3,82 (m, 4H), 3,76 – 3,71 (m, 2H), 3,71 – 3,66 (m, 2H), 3,66 – 3,60 (m, 2H), 3,41 – 3,35 (m, 2H) ppm, **^{31}P NMR** (202 MHz, D_2O): δ 19,69 (dd, $J_{P,P}$ 11,5, 7,0 Hz, 1P), -10,80 (d, $J_{P,P}$ 20,9 Hz, 1P), -11,53 (d, $J_{P,P}$ 20,9 Hz, 1P) ppm; **HR-MS (ESI, m/z):** 645,06232 (obliczone dla $C_{16}H_{24}N_8O_{14}P_3^-$ $[M-H]^-$: 645,06303).

5'-difosforan -3'-fosfo-6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyne:

HR-MS (ESI, m/z): 663,07353 (obliczone dla $C_{16}H_{26}N_8O_{15}P_3^-$ [M-H] $^-$: 663,07360).

6.1.3.14. Synteza 5'-difosforanu -2',3'-cyklofosfo-2-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyne (**N2-PEG-cPAPP**)

Reakcję prowadzono w 0°C. 2-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (50 mg, 0,1 mmol) zawieszono w $PO(OMe)_3$ (1 ml) a następnie dodano destylowany $POCl_3$ (48 mg, 0,3

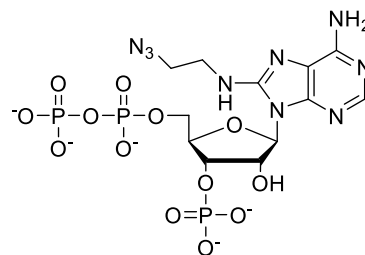


mmol, 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 3). Po zaobserwowaniu całkowitej konwersji do monofosforanu (ok. 7 h) dodano kolejną porcję $POCl_3$ (97 mg, 0,6 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w $PO(OMe)_3$ i dodano imidazol (386 mg, 5,7 mmol, 54 ekwiw.), mieszano przez 1 h a następnie zakończono 10 – krotnym nadmiarem wody. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,8 M bufor TEAB). Wydajność: 15 μ mol, W=14%. Roztwór C2-PEG-cPAP-Im (15 μ mol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z dodatkiem DMF (1 ml). Do roztworu dodano fosforan trietyloaminy (11 mg, 45 μ mol, 3 ekwiw.) oraz $ZnCl_2$ (16 mg, 119 μ mol, 8 ekwiw.). Reakcję analizowano metodą RP HPLC (program 3). Po stwierdzeniu konwersji w produkt zakończono dodając 10-krotnie rozcieńczony wodny roztwór EDTA (równo molowy względem $ZnCl_2$) i doprowadzono do pH 7 za pomocą $NaHCO_3$. Otrzymany produkt oczyszczono metodą RP-HPLC (program 5; wydajność: 1 mg, 1,5 μ mol, 10%)

HR-MS (ESI, m/z): 660,07460 (obliczone dla $C_{16}H_{25}N_9O_{14}P_3^-$ [M-H] $^-$: 660,07393).

6.1.3.15. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfo-8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (**C8-AE-PAPP**)

C8-bromoadenozyne (120 mg, 348 μ mol) zawieszono w etanolu (2 ml) i dodano 1-amino-2-azydo etyl (299 mg, 3,48 mmol, 10 ekwiw.). Reakcję mieszano i poddano działaniu mikrofal przez 1.5 h w 160 °C, 50W. Postęp reakcji analizowano metodą RP HPLC (program 3).



Produkt oczyszczono metodą chromatografii NP Flash (Faza A: DCM, Faza B:

DCM:MeOH 8:2, gradient liniowy 0-100% fazy B w 20 min). Wydajność: 223 μ mol, 64%. Otrzymany produkt był zanieczyszczony 8-(1-amino-2-azydo-etyl)adeniną.

C8-(1-amino-2-azydo-etyl) adenozyne (86 mg, 0,15 mmol) rozpuszczono w fosforanie trimetylu (1 ml) a następnie dodano destylowany POCl₃ (68 mg, 0,44 mmol, 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 3). Po zaobserwowaniu całkowitej konwersji do monofosforanu (ok. 3 h) dodano kolejną porcję POCl₃ (136 mg, 0,89 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w fosforanie trimetylu, dodano imidazol (543 mg, 8,0 mmol, 54 ekwiw.) i mieszano przez 1 h. Reakcję zakończono poprzez dodanie 10- krotnego nadmiaru wody i wyizolowano metodą chromatografii jonowymiennej DEAE-Sephadex stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0,8 M). Otrzymano produkt w formie soli trietyloamoniowej (wydajność: 498 mOD, 33 μ mol, 22%).

Roztwór C8-AE-cPAP-Im (12 μ mol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem w obecności DMF (2ml). Następnie do roztworu dodano fosforan trietyloaminy (9 mg, 35 μ mol, 2 ekwiw.) oraz ZnCl₂ (15 mg, 94 μ mol, 8 ekwiw.). Reakcję prowadzono przez 24 h a następnie zakończono równo molowym (względem Zn), wodnym roztworem EDTA i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO₃. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,6 M bufor TEAB). Wydajność: 10 μ mol, 84%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 5) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną (Wydajność: 5 μ mol, 43%).

5'-fosforan -2',3'-cyklofosfo-8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne:

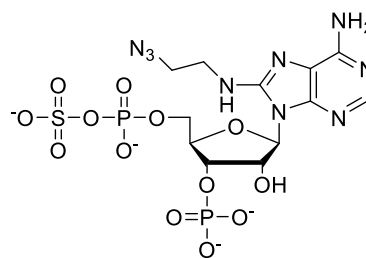
HR-MS (ESI, m/z): 572,02205 (obliczone dla C₁₂H₁₇N₉O₁₂P₃⁻ [M-H]⁻: 572,02150).

5'-fosforan -3'-fosfo-8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne:

HR-MS (ESI, m/z): 590,03280 (obliczone dla C₁₂H₁₉N₉O₁₃P₃⁻ [M-H]⁻: 590,03206).

6.1.3.16. Synteza 5'-fosfosiarczanu -3'-fosfo-C8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (C8-AE-PAPS)

C8-(1-amino-2-azydo-etyl) adenozyne (86 mg, 0,15 mmol) rozpuszczono w fosforanie trimetylu (1 ml) a następnie dodano destylowany POCl₃ (68 mg, 0,44 mmol, 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 2). Po zaobserwowaniu całkowitej konwersji do



monofosforanu (ok. 3 h) dodano kolejną porcję POCl_3 (136 mg, 0,89 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w fosforanie trimetylu, dodano imidazol (543 mg, 8,0 mmol, 54 ekwiw.) i mieszano przez 1 h. Reakcję zakończono poprzez dodanie 10- krotnego nadmiaru wody i wyizolowano metodą chromatografii jonowymiennej DEAE-Sephadex stosując liniowy gradient TEAB (0 – 0,8 M). Otrzymano produkt w formie soli trietyloamoniowej (wydajność: 498 mOD, 33 μmol , 22%).

Roztwór C8-AE-cPAP-Im (30 μmol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem w obecności DMF (2ml). Następnie do roztworu dodano siarczan bis(tributyloamoniowy) (33 mg, 70 μmol , 2 ekwiw.) oraz MgCl_2 (28 mg, 290 μmol , 9 ekwiw.). Reakcję prowadzono przez 24 h a następnie zakończono równo molowym (względem Zn), wodnym roztworem EDTA i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO_3 . Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB, wydajność: 13 μmol , 43%) a następnie za pomocą półpreparatywnej RP HPLC. Produkt końcowy poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-fosfosiarczanu -2',3'-cyklofosfo-C8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyiny:

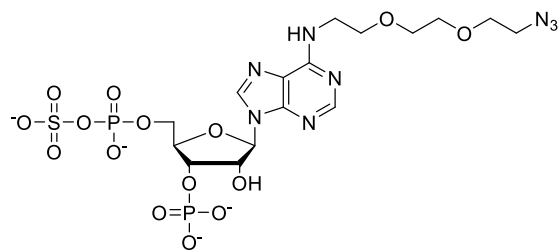
MS-ESI, m/z: 572,9 (obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 572,0).

5'-fosfosiarczanu -3'-fosfo-C8-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyiny:

MS-ESI, m/z: 590,1 (obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 590,0).

6.1.3.17. Synteza 5'-fosfosiarczanu 3'-fosfo-N6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny (**N6-PEG-PAPS**)

6-chloropuryno rybozyd (298 mg, 1,05 mmol) zawieszono w wodzie (2 ml) i dodano 8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-aminę (521 mg, 2,99 mmol, 3 ekwiw.). Reakcję mieszano przez 2 dni



w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji analizowano metodą RP HPLC (program 2). Produkt oczyszczono metodą chromatografii NP Flash (Faza A:DCM, Faza B: DCM : MeOH 9:1, gradient liniowy 0-100% fazy B w 20 min). Wydajność: 844 μmol , 81%.

N6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyinę (99 mg, 264 μmol) rozpuszczono w fosforanie trimetylu (2 ml) a następnie dodano destylowany POCl_3

(121 mg, 792 μmol , 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 2). Po zaobserwowaniu całkowitej konwersji do monofosforanu (ok. 3 h) dodano kolejną porcję POCl_3 (243 mg, 1,58 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w fosforanie trimetylu, dodano imidazol (969 mg, 14,3 mmol 54 ekwiw.) i mieszano przez 1 h. Reakcję zakończono poprzez dodanie 10- krotnego nadmiaru wody i wyizolowano metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE-Sephadex, 0,8 M bufor TEAB, wydajność: 1173 mOD, 78 μmol , 53%).

Roztwór N6-PEG-cPAP-Im (40 μmol) odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem w obecności DMF (1 ml). Następnie do roztworu dodano siarczan bis(tributyloamoniowy) (39 mg, 80 μmol , 2 ekwiw.) oraz MgCl_2 (33 mg, 350 μmol , 9 ekwiw.). Reakcję prowadzono przez 24 h a następnie zakończono równo molowym (względem Zn), wodnym roztworem EDTA i doprowadzono do pH 7 za pomocą NaHCO_3 . Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB, wydajność: 28 μmol , 72%) a następnie za pomocą półpreparatywnej RP HPLC. Produkt końcowy poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-fosforan -2',3'-cyklofosfo N6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny:

MS-ESI, m/z: 645,2 (obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 645,1)

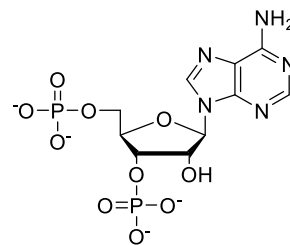
5'-fosforan -3'-fosfo N6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny:

MS-ESI, m/z: 662,8 (obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 663,1)

6.1.4. SYNTEZA ANALOGÓW PAP

6.1.4.1. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfoadenozyny (PAP)

Do adenozyiny (308 mg, 1,15 mmol) zawieszonej w $\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ (6 ml) dodano destylowany POCl_3 (531 mg, 3,46 mmol, 3 ekwiw.). Po 1 h dodano drugą porcję POCl_3 (1061 mg, 6,92 mmol, 6 ekwiw.). Po 24 h mieszaninę reakcyjną wylano na zimny eter dietylowy, powstały osad odwirowano, rozpuszczono w $\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ (6 mL) i dodano 1,2,4-triazol (2390,13 mg, 34,61 mmol, 30 ekwiw.). Reakcję zakończono poprzez dodanie 10- krotnego nadmiaru wody. Produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 0,23 mmol, 20%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 4)



i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną. Wydajność końcowa: 153,5 mg, 0,20 mmol, 17%.

5'-difosforan -2' 3'-cyklofosfo adenozyiny:

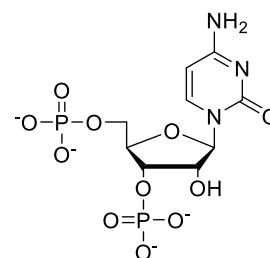
¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 8,41 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 6,33 (d, $J_{H,H}$ 4,2 Hz, 1H), 5,44 (ddd, $J_{H,H}$ 4,2, 6,7, 10,9 Hz, 1H), 5,24 – 5,16 (m, 1H), 4,64 – 4,58 (m, 1H), 4,15 – 4,08 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (162 MHz, D₂O): δ 20,70 (dd, $J_{P,H}$ 7,4, 10,9 Hz, 1P), 2,03 (m, 1P) ppm; **HR-MS (ESI, m/z)**: 408,01191 (obliczone dla C₁₀H₁₂N₅O₉P₂⁻ [M-H]⁻: 408,01157)

5'-difosforan -3'-fosfo adenozyiny:

HR-MS (ESI, m/z): 426,02268 (obliczone dla C₁₀H₁₄N₅O₁₀P₂⁻ [M-H]⁻: 426,02214)

6.1.4.2. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfocytydyny (PCP)

Do cytozyny (50 mg, 0,206 mmol) zawieszonej w PO(OCH₃)₃ (1 ml) dodano destylowany POCl₃ (94,6 mg, 0,617 mmol, 3 ekwiw.). Po 3 h dodano drugą porcję POCl₃ (189,3 mg, 1,24 mmol, 6 ekwiw.). Postęp reakcji analizowano metodą RP HPLC (program 2). Po 24 h mieszaninę reakcyjną wylano na zimny eter dietylowy, powstały osad odwirowano, rozpuszczono w PO(OCH₃)₃ (1 mL) i dodano 1,2,4-triazol (767,25 mg, 11,1 mmol, 54 ekwiw.). Reakcję zakończono poprzez dodanie 10- krotnego nadmiaru wody. Produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,0 M bufor TEAB). Wydajność: 0,08 mmol, 39%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC (program 4) i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.



5'-difosforan -2' 3'-cyklofosfo cytydyny:

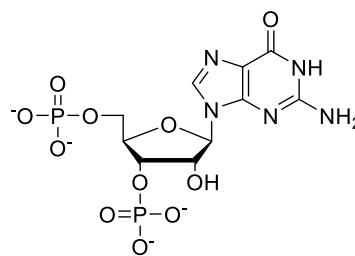
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 7,80 (d, $J_{H,H}$ 7,6 Hz, 1H), 6,08 (d, $J_{H,H}$ 7,6 Hz, 1H), 6,01 (d, $J_{H,H}$ 3,0 Hz, 1H), 5,1 (ddd, $J_{H,H}$ 3,0, 6,7, 8,2 Hz, 1H), 5,07 – 5,00 (m, 1H), 4,53 – 4,49 (m, 1H), 4,22 – 4,07 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 20,86 – 20,51 (m, 1P), 1,34 – 1,02 (m, 1P) ppm; **MS (ESI, m/z)**: 384,0 (obliczone dla C₉H₁₄N₃O₁₁P₂⁻ [M-H]⁻: 384,0)

5'-difosforan -3'-fosfo cytydyny:

HR-MS (ESI, m/z): 402,01125 (obliczone dla C₉H₁₄N₃O₁₁P₂⁻ [M-H]⁻: 402,01090)

6.1.4.3. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfoguanozyny (PGP)

Do guanozyny (50 mg, 0,177 mmol) zawieszanej w $\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ (1 ml) dodano uprzednio destylowany POCl_3 (81 mg, 0,530 mmol, 3 ekwiw.). Po 3 h dodano drugą porcję POCl_3 (163 mg, 1,06 mmol, 6 ekwiw.). Postęp reakcji analizowano metodą RP HPLC (program 2). Po 24



h mieszaninę reakcyjną wylano na zimny eter dietylowy, powstały osad odwirowano, rozpuszczono w $\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ (1 mL) i dodano 1,2,4-triazol (659 mg, 9,54 mmol, 54 ekwiw.). Reakcję zakończono poprzez dodanie 10- krotnego nadmiaru wody. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1 M bufor TEAB). Wydajność: 0,07 mmol, 37%. Następnie cykliczny produkt oczyszczono na półpreparatywnym RP-HPLC i poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-difosforan -2' 3'-cyklofosfo guanozyny:

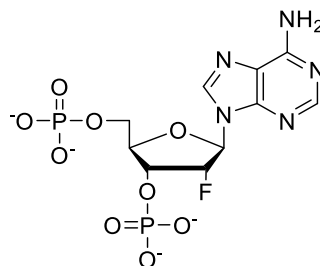
^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 8,02 (s, 1H), 6,16 (d, $J_{\text{H,H}}$ 3,7 Hz, 1H), 5,42 (ddd, $J_{\text{H,H}}$ 3,7, 6,7, 10,1 Hz, 1H), 5,22 (ddd, $J_{\text{H,H}}$ 3,7, 6,7, 8,8 Hz, 1H), 4,59 – 4,53 (m, 1H), 4,21 – 4,09 (m, 2H) ppm, **^{31}P NMR** (202 MHz, D_2O): δ 20,83 – 20,63 (m, 1P), 1,23 – 1,00 (m, 1P) ppm; **MS (ESI, m/z)**: 423,9 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$: 424,0)

5'-difosforan -3'-fosfo guanozyny:

HR-MS (ESI, m/z): 442,01757 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$: 442,01705)

6.1.4.4. Synteza 5'3'-difosforanu 2'- fluoro adenozyne (2'F-PAP)

Reakcję prowadzono w 0°C. 2'F-adenozynę (52 mg, 0,20 mmol) zawieszono w $\text{PO}(\text{OMe})_3$ (1 ml) a następnie dodano destylowany POCl_3 (90 mg, 0,58 mmol, 3 ekwiw.). Postęp reakcji badano metodą RP HPLC (program 1). Po

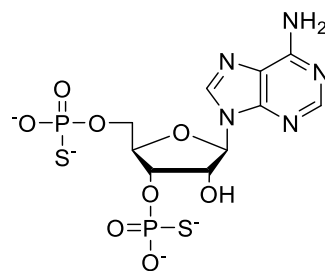


zaobserwowaniu całkowitej konwersji do monofosforanu (ok. 1 h) dodano kolejną porcję POCl_3 (179 mg, 1,17 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie zakończono 10 – krotnym nadmiarem wody. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii RP-HPLC (program 4; wydajność 8mg, 0,02 mmol, 10%).

HR-MS (ESI, m/z): 428,01815 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_9\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$: 428,01780).

6.1.4.5. Synteza 5'3'-ditiofosfonianu adenozy (PsAPs)

Do kolby z adenozą (2,00 g, 7,49 mmol) zawieszoną w pirydynie (37 ml) dodano difenilo fosfonianu (4,30 ml, 22,47 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję zakończono po 2 h mieszaniną 1:1 TEAB:H₂O. Produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0,8 M bufor TEAB). Produkt w postaci dwóch izomerów



(1:0,5 3'-2'-) odparowano a następnie zliofilizowano. Wydajność końcowa: 6,97 mmol, 93%.

5'3'(2')-H-difosfonian -adenozy:

HR-MS (ESI, m/z): 394,03235 (obliczone dla C₁₀H₁₄N₅O₈P₂⁻ [M-H]⁻: 394,03231)

Do roztworu P_HAP_H (100.0 mg, 0,74 mmol, 1 ekwiw.) w acetonitrylu (2 mL) dodano BSA (0,5 ml, 2,02 mmol, 10 equiv.). Po godzinie do mieszaniny dodano S₈ zawieszoną w pirydynie. Reakcję prowadzono przez 24 h a następnie zakończono mieszaniną MeOH/TEA. Produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,2 M bufor TEAB, wydajność: 75,01 mg, 0,09 mmol, 13%) a następnie za pomocą półpreparatywnej RP HPLC. Wydajność końcowa: 11,2 mg, 0,02 mmol, 22%.

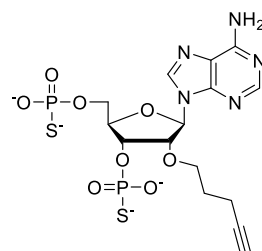
5'3'-ditiofosfonian -adenozy:

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,67 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 6,19 (d, J_{H,H} 6,4 Hz, 1H), 5,00 (d, J_{H,H} 10,6, 5,0, 2,9 Hz, 1H), 4,90 – 4,85 (m, 1H), 4,71 – 4,64 (m, 1H), 4,25 – 4,14 (m, 2H)ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 50,38 (bs, 1P), 49,45 (bs, 1P) ppm;

HR-MS (ESI, m/z): 457,97673 (obliczone dla C₁₀H₁₄N₅O₈P₂S₂⁻ [M-H]⁻: 457,97645).

6.1.4.6. Synteza 5'3'-ditiofosfonianu-2-O-pentynylo adenozy (2-O-pent- PsAPs)

Adenozy (1,00 g, 3,74 mmol) suszono pod próżnią a następnie rozpuszczono w DMF (75 ml) w 50°C. Reakcję schłodzono do temperatury 0°C i dodano NaH (600 mg, 14,96 mmol, 4 ekwiw.). Po 1 h (gdy stwierdzono brak wydzielania H₂) dodano TBAI (0,30 g, 0,82 mmol, 0,2 ekwiw.) oraz 5-chloro-1-pentyn (1,07 g, 10,49 mmol, 2,8 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na 5 dni. Po tym czasie mieszaninę oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (12% MeOH w DCM) i wytrącono etanolem. Wydajność: 219 mg, 657 μmol, 18%.



2-O-pentynylo adenozyne:

HR-MS (ESI, m/z): 334,15068 (obliczone dla $C_{15}H_{20}N_5O_4^+$ $[M-H]^+$: 334,15098).

Do kolby z 2-O-pentynylo adenozyne (50,07 mg, 0,15 mmol) zawieszoną w pirydynie (1 ml) dodano fosfonianu difenylu (210,98 mg, 0,901 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję prowadzono w obecności gazu obojętnego i zakończono po 4 dniach mieszaniną 1:1 TEAB:H₂O. Produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 0.6 M bufor TEAB). Produkt odparowano a następnie zliofilizowano. Wydajność końcowa: 0,12 mmol, 85%.

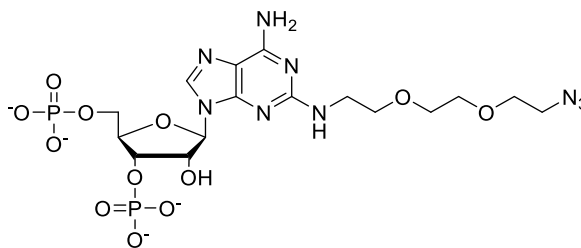
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 8,52 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,58 (d, $J_{H,H}$ 84,8 Hz, 1H), 6,21 (d, $J_{H,H}$ 75,1 Hz, 1H), 6,22 (d, $J_{H,H}$ 7,3 Hz, 1H), 5,00 (ddd, $J_{H,H}$ 10,0, 5,1, 2,1 Hz, 1H), 4,71 – 4,65 (m, 1H), 4,61 – 4,56 (m, 1H), 4,21 – 4,08 (m, 2H) ppm, **³¹P NMR** (202 MHz, D₂O): δ 7,64 (dd, $J_{P,H}$ 650, 6,5 Hz, 1P), 6,48 (dd, $J_{P,H}$ 650,1, 9,9 Hz, 1P) ppm; **MS (ESI, m/z):** 460,1 (obliczone dla $C_{15}H_{20}N_5O_8P_2^-$ $[M-H]^-$: 460,1).

Do roztworu 5'3'-H-difosfonianu-2-O-pentynylo adenozyne (56,36 mg, 0,075 mmol, 1 ekwiw.) w acetonitrylu (1 mL) dodano BSA (563,33 mg, 2,775 mmol, 37 equiv.). Po godzinie do mieszaniny dodano S₈ zawieszoną w pirydynie. Reakcję prowadzono w atmosferze gazu obojętnego przez 24 h, zakończono mieszaniną MeOH/TEA i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1,1 M bufor TEAB, wydajność: 50,31 mg, 0,06 mmol, 78%) a następnie za pomocą półpreparatywnej RP HPLC. Wydajność końcowa: 23,2 mg, 0,02 mmol, 32%.

HR-MS (ESI, m/z): 524,02382 (obliczone dla $C_{15}H_{20}N_5O_8P_2S_2^-$ $[M-H]^-$: 524,02340).

6.1.4.7. Synteza 5'-fosforanu -3'-fosfo-2-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyne (**N2-PEG-PAP**)

Reakcję prowadzono w 0°C. 2-(1-amino-2-azydo etyl) adenozyne (100 mg, 0,2 mmol) zawieszono w PO(OMe)₃ (1 ml) a następnie dodano destylowany POCl₃ (105 mg, 0,7 mmol, 3 ekwiw.). Postęp



reakcji badano metodą RP HPLC (program 3). Po zaobserwowaniu całkowitej konwersji do monofosforanu (ok. 2 h) dodano kolejną porcję POCl₃ (210 mg, 1,4 mmol, 6 ekwiw.). Reakcję pozostawiono na lodzie na noc a następnie wylano na zimny eter dietylowy. Ponownie rozpuszczono w PO(OMe)₃ i dodano 1,2,4-triazol (472 mg, 6,8 mmol, 30

ekwiw.), mieszano przez 1 h a następnie zakończono 10 – krotnym nadmiarem wody. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej (DEAE Sephadex; 1 M bufor TEAB). Wydajność: 20 μ mol, W=9% a następnie za pomocą półpreparatywnego RP HPLC (program 5). Produkt końcowy poddano rozcinaniu enzymatycznemu zgodnie z procedurą ogólną.

5'-difosforan -3'-fosfo-6-(8-azydo-3,6-dioksyoktano-1-amino) adenozyiny:

HR-MS (ESI, m/z): 598,11887 (obliczone dla $C_{16}H_{26}N_9O_{12}P_2^-$ [M-H] $^-$: 598,11816).

6.1.5. OCZYSZCZANIE SULFATAZY

Sulfataza została otrzymano dzięki uprzejmości Prof. Jutty Papenbrocki oczyszczona według zalecanej procedury.

Odważono 350 mg sulfatazy wyizolowanej z bakterii, dodano 15 ml H_2O oraz 15 ml EtOH (99%). Zawiesinę wymieszano a następnie zwirowano (4000 rpm, 3600g, 20 min). Supernatant zdekantowano, zawieszono w 45 ml EtOH i ponownie wymieszano oraz zwirowano (3500 rpm, 3000g, 15 min). Osad rozpuszczono w 12,5 ml H_2O , rozdzielono na 1 ml porcje i przechowywano w temperaturze $-80^\circ C$.

6.1.6. SYNTEZA DESULFOSINIGRINY

Odważono 4 mg sinigriny i rozpuszczono w 1 ml H_2O (1 mM). Pobrano 100 μ l roztworu i dodano 900 μ l 0,02 M kwasu octowego, pH 5 a następnie dodano 400 μ l oczyszczonej sulfatazy. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. $24^\circ C$, 300 rpm i pozostawiono przez noc. Desulfosinigrine oczyszczono metodą RP-HPLC (program 7) i zliofilizowao.

6.2. BADANIA BIOLOGICZNE NAD-KAPOWANYCH RNA.

Transkrypcja in vitro wykonana przez dr. Anaïs Depaix. NAD-kapowane RNA syntezowano na matrycy zawierającej sekwencję promotora T7 A ϕ 2,5 (CAGTAATACGACTCACTATTA), która kodowała 35-nukleotydową sekwencję (GGG AAGCGG GCATGC GGCCAG CCATAG CCGATC A)¹²⁵. Reakcja transkrypcji *in vitro* (80 μ L) była inkubowana w $37^\circ C$ przez 4 h i zawierała bufor RNA Pol, 10 U/ μ L polimerazy T7, 1 U/ μ L inhibitora RNaz RiboLock, 0,5 mM CTP/GTP/UTP, 0,125 mM ATP, 0,75 mM analogu NAD-kapu i 0,1 μ M matrycy. Po 4 h inkubacji matrycę degradowano przy użyciu 1U/ μ L DNazą I przez 30 min w $37^\circ C$. Otrzymane RNA oczyszczano przy użyciu RNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research). Jakość

transkryptów sprawdzano na żelach z 15% akrylamidem/7 M mocznikiem, natomiast stężenie oznaczano spektrofotometrycznie. Uzyskane transkrypty o długości 35-nt (1 μ M) inkubowano z 1 μ M DNazymem 10-23 w 50 mM $MgCl_2$ i 50 mM Tris-HCl pH 8,0 przez 1 h w 37°C, a następnie traktowano DNazą I, co pozwoliło na wytworzenie homogennych 25-nt konstruktów RNA. Jakość i stężenie przygotowanych RNA sprawdzano jak wyżej.

RNA znakowane ^{32}P , zakończone dinukleotydowymi analogami NAD lub analogami trinukleotydów NAD, wykorzystywane w analizach deNADdingu, syntetyzowano przy użyciu oligo ssDNA ϕ 2,5AG-30 nt (5'-CAGTAATACGACTCACTATTAGCCCTCTTCCTTCCTCCT-3') lub ϕ 2,5AG-30 nt (5' -CAGTAATACGACTCACTATTAGCCTCTCGCGTTCGTTCCCGT-3'). IVT prowadzono w temperaturze 37 °C przez 90 min w 50 μ L mieszaniny reakcyjnej zawierającej 400 ng matrycy DNA wytworzonego metodą PCR, 10 μ L buforu transkrypcyjnego 5 $\times$, 5 μ L 10 mM DTT, 5 μ L 10 μ g/ μ L BSA, 5 μ L 5 mM rCTP, 5 μ L 5 mM rUTP, 20 μ Ci [α -32 P]GTP, 2 μ L polimerazy T7 RNA (Promega) i 1 μ L 40 U/ μ L inhibitora rybonukleazy RNasin (Promega).

Rekombinowane białko NudC zostało otrzymano dzięki uprzejmości przez Bryce'a Nickelsa (Waksman Institute of Microbiology, Rutgers University). Rekombinowane białka Nudt12 i DXO uległy ekspresji w komórkach *E.coli* BL21 (DE3) Rosetta z plazmidów pET28a-Nudt12, pET28a- mDom3Z (DXO)^{10, 126}.

Analiza degradacji NAD-kapowanych RNA in vitro wykonana przez dr. Anaïs Depaix.

^{32}P -NAD - RNA były inkubowane zgodnie z wcześniej opisaną procedurą w buforze 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 2 mM DTT, 2 mM $MgCl_2$, i 2 mM $MnCl_2$ w temperaturze 37 °C przez 30 min. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 95% formamidu z dodatkiem 30 mM EDTA, ksylitolu, błękitu bromofenolowego. Substraty i produkty deNADdingu rozdzielano metodą elektroforezy używając żelu poliakrylamidowego. Produkty reakcji wizualizowano za pomocą aparatu Molecular Dynamics PhosphorImager (Storm860).

6.3. METODA RP-HPLC DO OCENY WŁAŚCIWOŚCI SUBSTRATOWYCH ORAZ INHIBITOROWYCH ANALOGÓW PAPS DO SULFOTRANSFERAZ

Enzymy, AtSOT18 i SULT1A3, użyte w eksperymentach zostały zsyntezowane i oczyszczone przez mgr Tomasza Śpiewkę.

Eksperyment z użyciem HPLC wykonano zgodnie z procedurą literaturową dla AtSOT18¹²⁷ analizowano przy użyciu kolumny Supelcosil LC-18-T (4,6 × 250 mm, 5 μM, przepływ 1,3 mL min⁻¹) z liniowym gradientem od buforu A do 50% buforu B w ciągu 15 min (bufory HPLC: A: 0,1 M KH₂ PO₄/ K₂HPO₄, pH 6; B: bufor A: metanol 1:1 v/v).

Warunki dla AtSOT18: 200 μM związku, 83 mM bufor TRIS, pH 9, 9,2 mM MgCl₂, 100 μM desulfosinigriny, 100 nM białka, 37°C, 300 rpm, 1 h. Chromatogram rejestrowano przy długości fali 260 nm i 229 nm (sinigrina).

Warunki dla SULT1A3: 200 μM związku, 6,7 mM K₂ HPO₄ bufor, pH 7,4, 100 μM dopaminy, 100 nM białka, 37°C, 300 rpm, 1 h. Chromatogram rejestrowano przy długości fali 254 nm i 280 nm (dopamina).

6.4. BADANIE FLUOROWANYCH ANALOGÓW PAPS METODĄ ¹⁹F NMR

Enzymy, AtSOT18 i SULT1A3, użyte w eksperymentach zostały zsyntezowane i oczyszczone przez mgr Tomasza Śpiewkę oraz dr Dorotę Kubacką.

W eksperymentach ¹⁹F NMR użyto standardowych parametrów tj. długość pulsu wzbudzenia 15 μs, czas rejestrowania danych 0,57 s; czas relaksacji 1,0 s; liczba skanów 128

Eksperymenty w czasie rzeczywistym wykonane dla 2-F-PAPS oraz 8-CF₃-PAPS: Przed wykonaniem właściwego eksperymentu mieszaninę reakcyjną bez dodatku enzymu inkubowano w środku magnesu w temperaturze 37°C przez 5 min (warunki eksperymentu dla AtSOT18: 200 μM analogu PAPS, 100 μM desulfo sinigriny, 83 mM bufor Tris, pH 9,0, 9,2 mM MgCl₂, 10% D₂O; warunki eksperymentu dla SULT1A3: 200 μM 2-F-PAPS, 100 μM dopaminy, 6,7 mM K₂HPO₄, pH 6,5, 10% D₂O lub 200 μM 8-CF₃-PAPS, 100 μM dopaminy, 6,7 mM K₂HPO₄, pH 7,4, 10% D₂O). Następnie rejestrowano widmo i dodawano enzymu (100 nm). Po tym etapie rejestrowano widmo co 5 min (10 widm).

Eksperymenty w punkcie końcowym wykonane dla 2-CF₃-PAPS: Skład mieszaniny reakcyjnej dla AtSOT18 był następujący: 200 μM 2-CF₃-PAPS, 100 μM desulfosinigriny,

100 nM białka, 83 mM bufor Tris, pH 9,0, 9,2 mM MgCl₂, 10% D₂O (objętość całkowita 275 µl). Skład mieszaniny reakcyjnej dla SULT1A3 był następujący: 200 µM 2-CF₃-PAPS, 100 µM dopaminy, 100 nM białka, 6,7 mM K₂HPO₄, pH 7,4, 10% D₂O (objętość całkowita 200 µl). Mieszaninę reakcyjną umieszczono w termobloku w temperaturze 37°C, 300 rpm, przez 40 min. Po tym czasie reakcja była zahamowana poprzez dodanie acetonitrylu (1:1; v/v), zwirowana i przeniesiona do probówki NMR w celu zarejestrowania widma ¹⁹F NMR.

Badanie stabilności fluorowanych analogów PAPS w warunkach eksperymentu ¹⁹F NMR: Przed każdym eksperymentem 200 µM fluorowanego analogu PAPS umieszczano w buforze (AtSOT18: 100 µM desulfosinigrin, 83 mM bufor Tris, pH 9,0, 9,2 mM MgCl₂, 10% D₂O; SULT1A3: 100 µM dopaminy, 6,7 mM K₂HPO₄, pH 7,4, 10% D₂O), inkubowano w środku magnesu w temp. 37°C przez 5 min a następnie rejestrowano widmo ¹⁹F NMR. Każde kolejne widmo NMR było nagrywane co 30 min. Całkowita liczba eksperymentów wynosiła 35.

Badanie zależności przesunięcia chemicznego od pH roztworu: W celu otrzymania mieszaniny analogu PAPS i jego odpowiednika PAP 10 mM wodny roztwór fluorowanego analogu PAPS doprowadzono do pH 3. Roztwór inkubowano w temperaturze 37 °C przez 20 h. Postęp hydrolizy badano za pomocą RP-HPLC (program 2). Hydrolizę prowadzono do momentu kiedy stosunek ilości PAPS i PAP był różny od 1:1 przy czym ilość PAP wynosiła min 20%. Tak otrzymane mieszaniny rozcieńczono do stężenia 200 µM (całkowite stężenie nukleotydów) w buforze 6,7 mM K₂HPO₄, 10% D₂O, pH 4,0. Roztwór zwirowano, umieszczono w probówce NMR, inkubowano w środku magnesu w temp 37 °C przez 5 min i zarejestrowano widmo ¹⁹F NMR. Następnie roztwór miareczkowano 0,1 M NaOH. Widma ¹⁹F NMR były rejestrowane w zakresie pH od 4,0 do 9,0, w przybliżeniu co 0,5 jednostki (pH było mierzone bezpośrednio w probówce NMR za pomocą elektrody pH o przedłużonej długości z mikrożarówką; Hanna Instruments). Każde miareczkowanie wykonano w dwóch powtórzeniach.

Eksperyment przesiewowy wybranych związków z biblioteki LOPAC®1280 z SULT1A3: Reakcje enzymatyczne prowadzono na płytce 96-dołkowej (BrandTech 701352 Deep Well Plate, 96-well, PS, 1,1 mL, Standard, U-Bottom). Każda studzienka zawierała 200 µM 8-CF₃-PAPS, 100 µM dopaminy, 35 µM badanego związku z biblioteki LOPAC®1280 (0,96 µl roztworu 10 mM) oraz 100 nM białka w buforze 6,7 mM K₂HPO₄, pH 7,4 z dodatkiem 10% D₂O (całkowita objętość mieszaniny wynosiła 275 µl).

W przypadku reakcji kontrolnej bez dodatku inhibitora potencjalny inhibitor został zastąpiony DMSO (0,96 μ l). Reakcja kontrolna bez białka zawierała wodę zamiast enzymu. Każdą reakcję kontrolną wykonano w trzech powtórzeniach. Reakcje prowadzono w temperaturze 37°C przez 40 minut, z wytrząsaniem 300 rpm. Po tym czasie reakcje zostały zahamowane przez dodatek acetonitrylu (275 μ l), a następnie 10 μ L roztworu EDTA (20 mg/ml EDTA, 10 mg/ml NaHCO₃). Płytkę zwirowano a następnie każdą mieszaninę reakcyjną przeniesiono do probówki NMR i analizowano za pomocą ¹⁹F NMR.

6.5. METODA TERMOFOREZY MIKROSKALOWEJ DO WYZNACZENIA K_D ANALOGÓW PAP I PAPS

Enzymy, AtSOT18 i SULT1A3, użyte w eksperymentach zostały zsyntezowane i oczyszczone przez mgr Tomasza Śpiewkę oraz dr Dorotę Kubacką.

Pomiary były wykonywane na aparacie Monolith NT.115 (Nanotemper). Znakowanie białka AtSOT18 oraz SULT1A3 wykonywano wedle poniższej procedury. Znacznik RED-tris-NTA Dye (nr kat. MO-L008) rozpuszczono w 50 μ l buforu 1-PBS-T (0,05% Tween 20). Następnie pobrano 2 μ l i uzupełniono 98 μ l buforu 50 mM HEPES, pH 6.5, 100 mM KCl, 0,05% Tween-20 (roztwór znacznika). Roztwór białka przygotowano rozcieńczając AtSOT18 w buforze aby otrzymać 100 μ l białka o stężeniu 200 nM Tak przygotowane roztwory zmieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po tym czasie mieszaninę zwirowano (10 min, 4°C, 14 000 rpm) i użyto w eksperymentach MST.

Znakowanie SULT1A3 przeprowadzono w analogiczny sposób w buforze PBS-T (0,05% Tween 20)

Do każdego eksperymentu przygotowano 16 probówek o pojemności 0,2 ml. W 15 z nich (oprócz 1) umieszczono 10 μ l buforu (50 mM HEPES, pH 6,5, 100 mM KCl, 0,05% dla AtSOT18 lub PBS-T dla SULT1A3). Następnie do pierwszej probówki dodano 20 μ l liganda (0,5-2 mM) i zastosowano metodę dwukrotnych rozcieńczeń. Do 16 probówek zawierających po 10 μ l roztworu liganda o odpowiednich stężeniach dodawano roztwór znakowanego białka (10 μ l) i wymieszano. Roztworami napełniono kapilary i po umieszczeniu w aparacie wykonano pomiary. Uzyskane krzywe termoforetyczne analizowano za pomocą oprogramowania PALMIST⁹²

7. LITERATURA

1. Mandel, J. A.; Jacobs, W. A.; Levene, P. A. On nucleic acids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1908**, 5, 92-94.
2. Kisselev, L. L.; Justesen, J.; Wolfson, A. D.; Frolova, L. Y. Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules? *Febs Letters* **1998**, 427 (2), 157-163.
3. Leonardi, R.; Zhang, Y. M.; Rock, C. O.; Jackowski, S. Coenzyme A: Back in action. *Progress in Lipid Research* **2005**, 44 (2-3), 125-153.
4. Kara, S.; Schrittwieser, J. H.; Hollmann, F.; Ansorge-Schumacher, M. B. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, 98 (4), 1517-1529.
5. Yeh, J. I.; Claiborne, A.; Hol, W. G. J. Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 angstrom resolution. *Biochemistry* **1996**, 35 (31), 9951-9957.
6. Mewies, M.; McIntire, W. S.; Scrutton, N. S. Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs. *Protein Science* **1998**, 7 (1), 7-20.
7. Vidal, L. S.; Kelly, C. L.; Mordaka, P. M.; Heap, J. T. Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2018**, 1866 (2), 327-347.
8. Stromland, O.; Niere, M.; Nikiforov, A. A.; VanLinden, M. R.; Heiland, I.; Ziegler, M. Keeping the balance in NAD metabolism. *Biochemical Society Transactions* **2019**, 47, 119-130.
9. Chen, Y. G.; Kowtoniuk, W. E.; Agarwal, I.; Shen, Y. H.; Liu, D. R. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nature Chemical Biology* **2009**, 5 (12), 879-881.
10. Jiao, X.; Doamekpor, S. K.; Bird, J. G.; Nickels, B. E.; Tong, L.; Hart, R. P.; Kiledjian, M. 5' End Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cap in Human Cells Promotes RNA Decay through DXO-Mediated deNADding. *Cell* **2017**, 168 (6).
11. Bruce, J. W.; Ahlquist, P.; Young, J. A. T. The Host Cell Sulfonation Pathway Contributes to Retroviral Infection at a Step Coincident with Provirus Establishment. *Plos Pathogens* **2008**, 4 (11).
12. Berger, F.; Ramirez-Hernandez, M. H.; Ziegler, M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends in Biochemical Sciences* **2004**, 29 (3), 111-118.
13. Grudzien-Nogalska, E.; Bird, J. G.; Nickels, B. E.; Kiledjian, M. "NAD-capQ" detection and quantitation of NAD caps. *Rna* **2018**, 24 (10), 1418-1425.
14. Bird, J. G.; Basu, U.; Kuster, D.; Ramachandran, A.; Grudzien-Nogalska, E.; Towheed, A.; Wallace, D. C.; Kiledjian, M.; Temiakov, D.; Patel, S. S.; et al. Highly efficient 5' capping of mitochondrial RNA with NAD(+) and NADH by yeast and human mitochondrial RNA polymerase. *Elife* **2018**, 7.
15. Adams, J. D.; Klaidman, L. K. Sirtuins, nicotinamide and aging: A critical review. *Letters in Drug Design & Discovery* **2007**, 4 (1), 44-48.
16. Hofer, K.; Li, S. S.; Abele, F.; Frindert, J.; Schlotthauer, J.; Grawenhoff, J.; Du, J. M.; Patel, D. J.; Jaschke, A. Structure and function of the bacterial decapping enzyme NudC. *Nature Chemical Biology* **2016**, 12 (9), 730.
17. Zhang, D. L.; Liu, Y. X.; Wang, Q.; Guan, Z. Y.; Wang, J.; Liu, J.; Zou, T. T.; Yin, P. Structural basis of prokaryotic NAD-RNA decapping by NudC. *Cell Research* **2016**, 26 (9), 1062-1066.

18. Mugridge, J. S.; Gross, J. D. Judge, Jury, and Executioner: DXO Functions as a Decapping Enzyme and Exoribonuclease in Pre-mRNA Quality Control. *Molecular Cell* **2013**, *50* (1), 2-4.
19. Grudzien-Nogalska, E.; Wu, Y. X.; Jiao, X. F.; Cui, H. J.; Mateyak, M. K.; Hart, R. P.; Tong, L.; Kiledjian, M. Structural and mechanistic basis of mammalian Nudt12 RNA deNADding. *Nature Chemical Biology* **2019**, *15* (6), 575.
20. Winz, M. L.; Cahova, H.; Nubel, G.; Frindert, J.; Hofer, K.; Jaschke, A. Capture and sequencing of NAD-capped RNA sequences with NAD captureSeq. *Nature Protocols* **2017**, *12* (1).
21. Depaix, A.; Kowalska, J. NAD Analogs in Aid of Chemical Biology and Medicinal Chemistry. *Molecules* **2019**, *24* (22).
22. Pergolizzi, G.; Butt, J. N.; Bowater, R. P.; Wagner, G. K. A novel fluorescent probe for NAD-consuming enzymes. *Chemical Communications* **2011**, *47* (47), 12655-12657.
23. Moreau, C.; Kirchberger, T.; Zhang, B.; Thomas, M. P.; Weber, K.; Guse, A. H.; Potter, B. V. L. Aberrant Cyclization Affords a C-6 Modified Cyclic Adenosine 5'-Diphosphoribose Analogue with Biological Activity in Jurkat T Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (4), 1478-1489.
24. Shrimp, J. H.; Hu, J.; Dong, M.; Wang, B. S.; MacDonald, R.; Jiang, H.; Hao, Q.; Yen, A.; Lin, H. N. Revealing CD38 Cellular Localization Using a Cell Permeable, Mechanism-Based Fluorescent Small-Molecule Probe. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (15), 5656-5663.
25. Robbins, P. W.; Lipmann, F. Identification of enzymatically active sulfate as adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78* (11), 2652-2653.
26. Méndez, E.; Cerdá, M. F. Discovering Reliable Sources of Biochemical Thermodynamic Data To Aid Students' Understanding. *Journal of Chemical Education* **2016**, *93* (3), 555-559.
27. Klaassen, C. D.; Boles, J. W. Sulfation and sulfotransferases .5. The importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *Faseb Journal* **1997**, *11* (6), 404-418.
28. Mueller, J. W.; Shafqat, N. Adenosine-5-phosphosulfate - a multifaceted modulator of bifunctional 3-phospho-adenosine-5-phosphosulfate synthases and related enzymes. *Febs Journal* **2013**, *280* (13), 3050-3057.
29. Lin, C. H.; Shen, G. J.; Garciajunceda, E.; Wong, C. H. Enzymatic synthesis and regeneration of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) for regioselective sulfation of oligosaccharides. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (30), 8031-8032.
30. Wang, T.; Cook, I.; Falany, C. N.; Leyh, T. S. Paradigms of Sulfotransferase Catalysis. The mechanism of SULT2A1. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (38), 26474-26480.
31. Blanchard, R. L.; Freimuth, R. R.; Buck, J.; Weinshilboum, R. M.; Coughtrie, M. W. H. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* **2004**, *14* (3), 199-211.
32. Chapman, E.; Best, M. D.; Hanson, S. R.; Wong, C. H. Sulfotransferases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43* (27), 3526-3548.
33. Suiko, M.; Kurogi, K.; Hashiguchi, T.; Sakakibara, Y.; Liu, M. C. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2017**, *81* (1), 63-72.

34. Her, C.; Wood, T. C.; Eichler, E. E.; Mohrenweiser, H. W.; Ramagli, L. S.; Siciliano, M. J.; Weinshilboum, R. M. Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: Two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics* **1998**, 53 (3), 284-295.
35. Glatt, H.; Boeing, H.; Engelke, C. E. H.; Kuhlow, L. M. A.; Pabel, U.; Pomplun, D.; Teubner, W.; Meinel, W. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2001**, 482 (1-2), 27-40.
36. Negishi, M.; Pedersen, L. G.; Pétrotchenko, E.; Shevtsov, S.; Gorokhov, A.; Kakuta, Y.; Pedersen, L. C. Structure and function of sulfotransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, 390 (2), 149-157.
37. Kakuta, Y.; Pedersen, L. G.; Carter, C. W.; Negishi, M.; Pedersen, L. C. Crystal structure of estrogen sulphotransferase. *Nature Structural Biology* **1997**, 4 (11), 904-908..
38. Hirschmann, F.; Krause, F.; Baruch, P.; Chizhov, I.; Mueller, J. W.; Manstein, D. J.; Papenbrock, J.; Fedorov, R. Structural and biochemical studies of sulphotransferase 18 from *Arabidopsis thaliana* explain its substrate specificity and reaction mechanism. *Scientific Reports* **2017**, 7.
39. Lin, E. S.; Yang, Y. S. Nucleotide binding and sulfation catalyzed by phenol sulfotransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, 271 (3), 818-822..
40. Wang, T.; Cook, I.; Leyh, T. S. 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Allosterically Regulates Sulfotransferase Turnover. *Biochemistry* **2014**, 53 (44), 6893-6900.
41. Marto, N.; Morello, J.; Monteiro, E. C.; Pereira, S. A. Implications of sulfotransferase activity in interindividual variability in drug response: clinical perspective on current knowledge. *Drug Metabolism Reviews* **2017**, 49 (3), 357-371.
42. Richard, K.; Hume, R.; Kaptein, E.; Stanley, E. L.; Visser, T. J.; Coughtrie, M. W. H. Sulfation of thyroid hormone and dopamine during human development: Ontogeny of phenol sulfotransferases and arylsulfatase in liver, lung, and brain. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2001**, 86 (6), 2734-2742.
43. Falany, J. L.; Macrina, N.; Falany, C. N. Regulation of MCF-7 breast cancer cell growth by beta-estradiol sulfation. *Breast Cancer Research and Treatment* **2002**, 74 (2), 167-176.
44. Gamage, N.; Barnett, A.; Hempel, N.; Duggleby, R. G.; Windmill, K. F.; Martin, J. L.; McManus, M. E. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological Sciences* **2006**, 90 (1), 5-22.
45. Cole, C. L.; Rushton, G.; Jayson, G. C.; Avizienyte, E. Ovarian Cancer Cell Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferases Regulate an Angiogenic Program Induced by Heparin-binding Epidermal Growth Factor (EGF)-like Growth Factor/EGF Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, 289 (15), 10488-10501.
46. Vankova, M.; Hill, M.; Velikova, M.; Vcelak, J.; Vacinova, G.; Lukasova, P.; Vejrazkova, D.; Dvorakova, K.; Rusina, R.; Holmerova, I.; et al. Reduced Sulfotransferase SULT2A1 Activity in Patients With Alzheimer's Disease. *Physiological Research* **2015**, 64, S265-S273.
47. di Michele, F.; Luchetti, S.; Bernardi, G.; Romeo, E.; Longone, P. Neurosteroid and neurotransmitter alterations in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* **2013**, 34 (2), 132-142.

48. Sidharthan, N. P.; Minchin, R. F.; Butcher, N. J. Cytosolic Sulfotransferase 1A3 Is Induced by Dopamine and Protects Neuronal Cells from Dopamine Toxicity. Role of D1 receptor-N-methyl-D-aspartate receptor coupling. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288 (48), 34364-34374.
49. Rizner, T. L. The Important Roles of Steroid Sulfatase and Sulfotransferases in Gynecological Diseases. *Frontiers in Pharmacology* **2016**, 7.
50. Moore, K. L. The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (27), 24243-24246.
51. Zhou, W. B.; Wang, Y.; Xie, J. S.; Geraghty, R. J. A fluorescence-based high-throughput assay to identify inhibitors of tyrosylprotein sulfotransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, 482 (4), 1207-1212.
52. Baglia, R. A.; Mills, K. R.; Mitra, K.; Tutol, J. N.; Ball, D.; Page, K. M.; Kallu, J.; Gottipolu, S.; D'Arcy, S.; Nielsen, S. O.; et al. An activity-based fluorescent sensor for the detection of the phenol sulfotransferase SULT1A1 in living cells. *Rsc Chemical Biology* **2021**, 2 (3), 830-834.
53. Li, Y.; Shen, H. X.; Liu, C. H. A General Fluorescence Turn-On Sulfotransferase Assay through the Detection of Free Phosphate Ions by Using A Calcein/Ce3+ System. *Chemistryselect* **2018**, 3 (33), 9753-9758.
54. Kulathunga, S. C.; Morato, N. M.; Zhou, Q.; Cooks, R. G.; Mesecar, A. D. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Assay for Label-Free Characterization of SULT2B1b Enzyme Kinetics. *Chemmedchem* **2022**, 17 (9).
55. Xie, C.; Yan, T. M.; Chen, J. M.; Li, X. Y.; Zou, J.; Zhu, L. J.; Lu, L. L.; Wang, Y.; Zhou, F. Y.; Liu, Z. Q.; et al. LC-MS/MS quantification of sulfotransferases is better than conventional immunogenic methods in determining human liver SULT activities: implication in precision medicine. *Scientific Reports* **2017**, 7.
56. Byrne, D. P.; Li, Y.; Ngamlert, P.; Ramakrishnan, K.; Evers, C. E.; Wells, C.; Drewry, D. H.; Zuercher, W. J.; Berry, N. G.; Fernig, D. G.; et al. New tools for evaluating protein tyrosine sulfation: tyrosylprotein sulfotransferases (TPSTs) are novel targets for RAF protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* **2018**, 475, 2435-2455.
57. Iyer, V. K.; Butler, W. B.; Horwitz, J. P.; Rozhin, J.; Brooks, S. C.; Corombos, J.; Kessel, D. SOME ADENINE AND ADENOSINE METHYLENE-BRIDGED ESTROGENS. *Journal of Medicinal Chemistry* **1983**, 26 (2), 162-166.
58. Rath, V. L.; Verdugo, D.; Hemmerich, S. Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery. *Drug Discovery Today* **2004**, 9 (23), 1003-1011.
59. Horwitz, J. P.; Misra, R. S.; Rozhin, J.; Neenan, J. P.; Huo, A.; Godefroi, V. C.; Philips, K. D.; Chung, H. L.; Butke, G.; Brooks, S. C. Synthesis and assay of analogs of adenosine 3',5'-diphosphate as inhibitors of bovine adrenal estrogen sulfotransferase. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1978**, 525 (2), 364-372.
60. Ng, K.; Dsouza, M.; Callahan, L.; Geller, D. H.; Kearns, A. E.; Lyle, S.; Schwartz, N. B. Synthesis and utilization of a nonhydrolyzable phosphoadenosine phosphosulfate analog. *Analytical Biochemistry* **1991**, 198 (1), 60-67.
61. Armstrong, J. I.; Verdugo, D. E.; Bertozzi, C. R. Synthesis of a bisubstrate analogue targeting estrogen sulfotransferase. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68 (1), 170-173.
62. Kershaw, N. M.; Byrne, D. P.; Parsons, H.; Berry, N. G.; Fernig, D. G.; Evers, P. A.; Cosstick, R. Structure-based design of nucleoside-derived analogues as sulfotransferase inhibitors. *Rsc Advances* **2019**, 9 (55), 32165-32173.

63. Yang, H. P.; Matsubayashi, Y.; Nakamura, K.; Sakagami, Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96* (23), 13560-13565.
64. Rouleau, M.; Marsolais, F.; Richard, M.; Nicolle, L.; Voigt, B.; Adam, G.; Varin, L. Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (30), 20925-20930.
65. Bones, A. M.; Hara, M.; Rossiter, J. T.; Kissen, R. Editorial: Physiology and Cellular Mechanisms of Isothiocyanates and Other Glucosinolate Degradation Products in Plants. *Frontiers in Plant Science* **2015**, *6*.
66. Melim, C.; Lauro, M. R.; Pires, I. M.; Oliveira, P. J.; Cabral, C. The Role of Glucosinolates from Cruciferous Vegetables (Brassicaceae) in Gastrointestinal Cancers: From Prevention to Therapeutics. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (1).
67. Soundararajan, P.; Kim, J. S. Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. *Molecules* **2018**, *23* (11).
68. Klein, M.; Reichelt, M.; Gershenzon, J.; Papenbrock, J. The three desulfoglucosinolate sulfotransferase proteins in *Arabidopsis* have different substrate specificities and are differentially expressed. *Febs Journal* **2006**, *273* (1), 122-136.
69. Falany, C. N. Sulfation and sulfotransferases .3. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *Faseb Journal* **1997**, *11* (4), 206-216.
70. Goldstein, D. S.; Swoboda, K. J.; Miles, J. M.; Coppack, S. W.; Aneman, A.; Holmes, C.; Lamensdorf, I.; Eisenhofer, G. Sources and physiological significance of plasma dopamine sulfate. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **1999**, *84* (7), 2523-2531.
71. Johnson, G. A.; Baker, C. A.; Smith, R. T. Radioenzymatic assay of sulfate conjugates of catecholamines and DOPA in plasma. *Life Sciences* **1980**, *26* (19), 1591-1598.
72. Jones, A. L.; Roberts, R. C.; Colvin, D. W.; Rubin, G. L.; Coughtrie, M. W. H. Reduced platelet phenolsulfotransferase activity towards dopamine and 5-hydroxytryptamine in migraine. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1995**, *49* (1-2), 109-114.
73. Butcher, N. J.; Horne, M. K.; Mellick, G. D.; Fowler, C. J.; Masters, C. L.; Minchin, R. F.; Grp, A. R. Sulfotransferase 1A3/4 copy number variation is associated with neurodegenerative disease. *Pharmacogenomics Journal* **2018**, *18* (2), 209-214.
74. Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. Studies of phosphorylation. 3. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1969**, *42* (12), 3505.
75. Simoncsits, A.; Tomasz, J. Simple one-step synthesis of ribonucleoside 2',3'-cyclic phosphate 5'-phosphates. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1975**, *395* (1), 74-79. DOI:.
76. Roy, B.; Depaix, A.; Perigaud, C.; Peyrottes, S. Recent Trends in Nucleotide Synthesis. *Chemical Reviews* **2016**, *116* (14), 7854-7897.
77. Kore, A. R.; Parmar, G. Convenient synthesis of nucleoside-5' -diphosphates from the corresponding ribonucleoside-5'-phosphoroimidazole. *Synthetic Communications* **2006**, *36* (22), 3393-3399.

78. Mukaiyama, T.; Hashimoto, M. Phosphorylation of alcohols and phosphates by oxidation-reduction condensation. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1971**, *44* (1), 196.
79. Bandurski, R.; Wilson, L.; Squires, C. The mechanism of active sulfate. *Journal of American Chemical Society*, 1956; Vol. 78, pp 6408-6409.
80. Burkart, M.; Izumi, M.; Wong, C. Enzymatic regeneration of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate using aryl sulfotransferase for the preparative enzymatic synthesis of sulfated carbohydrates. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1999; Vol. 38, pp 2747-2750.
81. Cherniak, R.; Davidson, E. Synthesis of adenylyl sulfate and adenylyl sulfate 3'-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 1964; Vol. 239, pp 2986.
82. Horwitz, J. P.; Neenan, J. P.; Misra, R. S.; Rozhin, J.; Huo, A.; Philips, K. D. Studies on bovine adrenal estrogen sulfotransferase. Facile synthesis of 3'-phosphoadenosine and 2'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1977**, *480* (2), 376-381.
83. Smith, M.; Moffatt, J.; Khorana, H. Carbodiimides. 8. Observations on the reactions of carbodiimides with acids and some new applications in the synthesis of phosphoric acid esters. *Journal of the American Chemical Society*, 1958; Vol. 80, pp 6204-6212.
84. Simoncsits, A.; Tomasz, J. Simple one-step synthesis of ribonucleoside 2',3'-cyclic phosphate 5'-phosphates. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1975; Vol. 395, pp 74-79.
85. Kowalska, J.; Osowniak, A.; Zuberek, J.; Jemielity, J. Synthesis of nucleoside phosphosulfates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22* (11), 3661-3664.
86. Haas, T.; Qiu, D.; Häner, M.; Angebauer, L.; Ripp, A.; Singh, J.; Koch, H.; Jessen-Trefzer, C.; Jessen, H. Four Phosphates at One Blow: Access to Pentaphosphorylated Magic Spot Nucleotides and Their Analysis by Capillary Electrophoresis. *Journal of Organic Chemistry* **2020**, *85*, 14496-14506.
87. Baranowski, M.; Warminski, M.; Jemielity, J.; Kowalska, J. 5'-fluoro(di)phosphate-labeled oligonucleotides are versatile molecular probes for studying nucleic acid secondary structure and interactions by ¹⁹F NMR. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48*, 8209-8224.
88. Chen, H.; Viel, S.; Ziarelli, F.; Peng, L. ¹⁹F NMR: a valuable tool for studying biological events. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 7971-7982.
89. Jerabek-Willemsen, M.; Andre, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* **2014**, *1077*, 101-113.
90. Duhr, S.; Braun, D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (52), 19678-19682.
91. Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J.; Schafer, F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A Review. *Guide to Protein Purification, Second Edition* **2009**, *463*, 439-473.
92. Scheuermann, T. H.; Padrick, S. B.; Gardner, K. H.; Brautigam, C. A. On the acquisition and analysis of microscale thermophoresis data. *Analytical Biochemistry* **2016**, *496*, 79-93.
93. 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.

94. Picard-Jean, F.; Brand, C.; Tremblay-Letourneau, M.; Allaire, A.; Beaudoin, M. C.; Boudreault, S.; Duval, C.; Rainville-Sirois, J.; Robert, F.; Pelletier, J.; et al. 2'-O-methylation of the mRNA cap protects RNAs from decapping and degradation by DXO. *Plos One* **2018**, *13* (3).
95. Lee, J.; Churchil, H.; Choi, W.; Lynch, J.; Roberts, F.; Volante, R.; Reider, P. A chemical synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). *Chemical Communications* **1999**, 729-730.
96. Liu, R. H.; Visscher, J. A Novel preparation of nicotinamide mononucleotide. *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, *13* (5), 1215-1216.
97. Moran, J. R.; Whitesides, G. M. A practical enzymatic-synthesis of (SP)-adenosine 5'-O-(1-thiotriphosphate) ((SP)-ATP- α -S). *Journal of Organic Chemistry* **1984**, *49* (4), 704-706.
98. Patel, B. K.; Eckstein, F. 5'-Deoxy-5'-thioribonucleoside-5'-triphosphates. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38* (6), 1021-1024.
99. Huang, F. Q. Efficient incorporation of CoA, NAD and FAD into RNA by in vitro transcription. *Nucleic Acids Research* **2003**, *31* (3).
100. Hofer, K.; Abele, F.; Schlotthauer, J.; Jaschke, A. Synthesis of 5'-NAD-Capped RNA. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (4), 874-877.
101. Doamekpor, S.; Grudzien-Nogalska, E.; Mlynarska-Cieslak, A.; Kowalska, J.; Kiledjian, M.; Tong, L. DXO/Rai1 enzymes remove 5'-end FAD and dephospho-CoA caps on RNAs. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48*, 6136-6148.
102. 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.
103. Chrominski, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Efficient Synthesis of Trifluoromethylated Purine Ribonucleosides and Ribonucleotides. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2020**, *83*, 1934-9270.
104. Kalek, M.; Jemielity, J.; Stepinski, J.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E. A direct method for the synthesis of nucleoside 5'-methylenebis(phosphonate)s from nucleosides. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 2417-2421.
105. 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.
106. Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. Studies on aryl H-phosphonates. 1. An Efficient method for the preparation of deoxyribonucleoside and ribonucleoside 3'-H-phosphonate monoesters by transesterification of diphenyl H-phosphonate. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 3355-3358.
107. Kalcic, I.; Zorc, B.; Butula, I. Macromolecular prodrugs .7. Polymer-dopamine conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, *136* (1-2), 31-36.
108. Klein, M.; Papenbrock, J. Kinetics and substrate specificities of desulfo-glucosinolate sulfotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **2009**, *135* (2), 140-149.
109. Dajani, R.; Sharp, S.; Graham, S.; Bethell, S. S.; Cooke, R. M.; Jamieson, D. J.; Coughtrie, M. W. H. Kinetic properties of human dopamine sulfotransferase (SULT1A3) expressed in prokaryotic and eukaryotic systems: Comparison with the recombinant enzyme purified from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **1999**, *16* (1), 11-18.
110. Itaaho, K.; Alakurtti, S.; Yli-Kauhaluoma, J.; Taskinen, J.; Coughtrie, M. W. H.; Kostianen, R. Regioselective sulfonation of dopamine by SULT1A3 in vitro

- provides a molecular explanation for the preponderance of dopamine-3-O-sulfate in human blood circulation. *Biochemical Pharmacology* **2007**, *74* (3), 504-510.
111. Mlynarska-Cieslak, A.; Chrominski, M.; Spiewla, T.; Baranowski, M. R.; Bednarczyk, M.; Jemielity, J.; Kowalska, J. Fluorinated Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Analogues for Continuous Sulfotransferase Activity Monitoring and Inhibitor Screening by F-19 NMR Spectroscopy. *Acs Chemical Biology* **2022**, *17* (3), 661-669.
 112. Yasuda, S.; Liu, M. Y.; Suiko, M.; Sakakibara, Y.; Liu, M. C. Hydroxylated serotonin and dopamine as substrates and inhibitors for human cytosolic SULT1A3. *Journal of Neurochemistry* **2007**, *103* (6), 2679-2689.
 113. Jacobson, K. A.; Vangalen, P. J. M.; Williams, M. Adenosine receptors – pharmacology, structure-activity-relationships and therapeutic potential. *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, *35* (3), 407-422.
 114. Petrotchenko, E.; Pedersen, L.; Borchers, C.; Tomer, K.; Negishi, M. The dimerization motif of cytosolic sulfotransferases. *FEBS Letters* **2001**, *490*, 39-43.
 115. Tibbs, Z.; Rohn-Glowacki, K.; Crittenden, F.; Guidry, A.; Falany, C. Structural plasticity in the human cytosolic sulfotransferase dimer and its role in substrate selectivity and catalysis. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2015**, *30*, 3-20.
 116. Guidry, A. L.; Tibbs, Z. E.; Runge-Morris, M.; Falany, C. N. Expression, purification and characterization of human cytosolic sulfotransferase (SULT) 1C4. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **2017**, *29* (1), 27-36.
 117. Bennett, B.; Kimball, E.; Gao, M.; Osterhout, R.; Van Dien, S.; Rabinowitz, J. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* **2009**, *5*, 593-599.
 118. Fersht, A.; Shi, J.; Knilljones, J.; Lowe, D.; Wilkinson, A.; Blow, D.; Brick, P.; Carter, P.; Waye, M.; Winter, G. Hydrogen-bonding and biological specificity analyzed by protein engineering. *Nature* **1985**, *314*, 235-238.
 119. Ji, D.; Wang, L.; Hou, S.; Liu, W.; Wang, J.; Wang, Q.; Zhao, Z. Creation of Bioorthogonal Redox Systems Depending on Nicotinamide Flucytosine Dinucleotide. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 20857-20862.
 120. Liu, Y.; Feng, Y.; Wang, L.; Guo, X.; Liu, W.; Li, Q.; Wang, X.; Xue, S.; Zhao, Z. Structural Insights into Phosphite Dehydrogenase Variants Favoring a Non-natural Redox Cofactor. *ACS CATALYSIS* **2019**, *9*, 1883-1887.
 121. 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.
 122. 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.
 123. Haid, E.; Lehmann, P.; Ziegenhorn, J. Molar absorptivities of beta-NADH and beta-NAD at 260 nm. *Clinical Chemistry* **1975**, *21* (7), 884-887.
 124. Perrone, P.; Daverio, F.; Valente, R.; Rajyaguru, S.; Martin, J. A.; Leveque, V.; Le Pogam, S.; Najera, I.; Klumpp, K.; Smith, D. B.; et al. First example of phosphoramidate approach applied to a 4'-substituted purine nucleoside (4'-azidoadenosine): Conversion of an inactive nucleoside to a submicromolar compound versus hepatitis C virus. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (22), 5463-5470.

125. Coleman, T. M.; Wang, G. C.; Huang, F. Q. Superior 5' homogeneity of RNA from ATP-initiated transcription under the T7 ϕ 2.5 promoter -: art. no. e14. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32* (1).
126. Song, M. G.; Bail, S.; Kiledjian, M. Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *Rna* **2013**, *19* (3), 390-399.
127. Hirschmann, F.; Papenbrock, J. The fusion of genomes leads to more options: A comparative investigation on the desulfo-glucosinolate sulfotransferases of *Brassica napus* and homologous proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **2015**, *91*, 10-19.